

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 432**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99924233 .2**
96 Fecha de presentación: **13.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1078092**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

54 Título: **VECTORES DE EXPRESIÓN PARA ESTIMULAR UNA RESPUESTA INMUNE Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
13.05.1998 US 78904
15.05.1998 US 85751 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.01.2012

73 Titular/es:
EPIMMUNE INC.
5820 NANCY RIDGE DRIVE, SUITE 100
SAN DIEGO, CA 92121, US

72 Inventor/es:
FIKES, John, D.;
HERMANSON, Gary, G.;
SETTE, Alessandro;
ISHIOKA, Glenn Y.;
LIVINGSTON, Brian y
CHESNUT, Robert, W.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 432 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores de expresión para estimular una respuesta inmune y procedimientos de uso de los mismos

Declaración de derechos sobre invenciones realizadas bajo investigación y desarrollo con patrocinio federal

5 La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud de la Subvención NIH Núm. AI-42699-01, Subvención NIH Núm. AI38584-03, y Contrato NIH Núm. N01-AI-45241. El Gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas de ácido nucleico que codifica múltiples epitopos CTL y HTL y secuencias dirigidas al MHC.

10 **Antecedentes de la invención**

Las vacunas son de importancia fundamental en la medicina moderna y han sido muy efectivas para combatir ciertas enfermedades humanas. Sin embargo, a pesar de la exitosa implementación de programas de vacunación que han limitado mucho o prácticamente eliminado varias enfermedades humanas debilitantes, existen numerosas enfermedades que afectan a millones en el mundo para las que no se han desarrollado vacunas efectivas.

15 Los principales avances en el campo de la inmunología han llevado a una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune y han provisto perspectivas para el desarrollo de nuevas estrategias de vacuna (Kuby, Immunology, 443-457 (3rd ed., 1997), que se incorporan en la presente memoria por referencia). Estas nuevas estrategias de vacuna han aprovechado el conocimiento obtenido con respecto a los mecanismos por los cuales el material extraño, denominado antígeno, es reconocido por el sistema inmune y eliminado del organismo.
20 Una vacuna efectiva es una que estimula una respuesta inmune a un antígeno de interés.

Las células especializadas del sistema inmunológico son responsables de la actividad protectora necesaria para combatir las enfermedades. Una respuesta inmune involucra dos grupos principales de células, linfocitos o leucocitos, y células que presentan antígeno. El fin de estas células de la respuesta inmune es reconocer el material extraño, tal como un organismo infeccioso o una célula cancerosa y eliminar este material extraño del organismo.

25 Dos tipos principales de linfocitos median diferentes aspectos de la respuesta inmune. Las células B exhiben en su superficie celular proteínas especializadas, llamadas anticuerpos, que se unen específicamente al material extraño, llamado antígeno. Las células B efectoras producen formas solubles del anticuerpo, que circulan en todo el organismo y actúan para eliminar el antígeno del organismo. Esta rama del sistema inmunológico se conoce como la rama humoral. Las células B de memoria actúan para reconocer el antígeno en encuentros futuros al continuar
30 expresando la forma del anticuerpo unida a membrana.

Un segundo tipo principal de linfocitos es la célula T. Las células T también tienen en su superficie celular proteínas especializadas que reconocen el antígeno pero, en contraste con las células B, requieren que el antígeno se una a un complejo de proteína de membrana especializado, el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), en la superficie de una célula que presenta antígenos. Dos clases importantes de las células T, denominadas linfocitos T
35 auxiliares ("HTL") y linfocitos T citotóxicos ("CTL"), a menudo se distinguen sobre la base de la presencia de la proteína CD4 o CD8, respectivamente, en la superficie celular. Esta rama del sistema inmunológico se conoce como rama mediada por células.

La segunda clase importante de células de la respuesta inmune son células que actúan en la presentación del antígeno por procesamiento del antígeno para la unión a las moléculas de MHC expresadas en las células que
40 presentan antígeno. El antígeno procesado que se une a las moléculas de MHC se transfiere a la superficie de la célula, en la que el complejo antígeno-MHC está disponible para unirse a las células T.

Las moléculas de MHC se pueden dividir en moléculas de MHC de clase I y clase II y se reconocen por las dos clases de células T. Casi todas las células expresan las moléculas de MHC clase I, que actúan para presentar el antígeno a los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos normalmente reconocen el antígeno unido a MHC
45 clase I. Un subconjunto de células llamado células que presentan antígeno expresan moléculas de MHC clase II. Los linfocitos T auxiliares normalmente reconocen el antígeno unido a las moléculas de MHC clase II. Las células que presentan antígeno incluyen células dendríticas, macrófagos, células B, fibroblastos, células gliales, células pancreáticas beta, células epiteliales tímicas, células epiteliales tiroideas y células endoteliales vasculares. Estas células que presentan antígeno generalmente expresan las moléculas de MHC clase I y clase II. Asimismo, las
50 células B actúan como células productoras de anticuerpo y que presentan antígeno.

Una vez que un linfocito T auxiliar reconoce un complejo antígeno-MHC clase II en la superficie de una célula que presenta antígeno, el linfocito T auxiliar se activa y produce factores de crecimiento que activan una variedad de células involucradas en la respuesta inmune, que incluyen las células B y linfocitos T citotóxicos. Por ejemplo, bajo la influencia de los factores de crecimiento expresados por los linfocitos T auxiliares activados, se activa un linfocito T

citotóxico que reconoce un complejo de antígeno-MHC clase I. Los CTL controlan y eliminan células que exhiben el antígeno reconocido específicamente por los CTL, tales como células infectadas o células tumorales. En consecuencia, la activación de los linfocitos T auxiliares estimula la activación de las ramas mediada humoral y celular del sistema inmunológico.

- 5 Un aspecto importante de la respuesta inmune, en particular relacionado con la eficacia de la vacuna, es la manera en que el antígeno se procesa de modo que pueda ser reconocido por las células especializadas del sistema inmunológico. Se utilizan distintas vías del procesamiento y presentación del antígeno. Una es una vía citosólica, que hace que el antígeno se una a las moléculas de MHC de clase I. Una vía alternativa es una vía del retículo endoplásmico, que bordea el citosol. Otra es una vía endocítica, que produce que el antígeno se una a las moléculas de MHC clase II. En consecuencia, la presentación en la superficie celular de un antígeno particular por una molécula de MHC clase II o clase I a un linfocito T auxiliar o un linfocito T citotóxico, respectivamente, es dependiente de la vía de procesamiento para este antígeno.

15 La vía citosólica procesa antígenos endógenos que se expresan dentro de la célula. El antígeno es degradado por un complejo de proteasa especializado en el citosol de la célula, y los péptidos antigénicos resultantes se transportan en el retículo endoplásmico, una organela que procesa moléculas de la superficie celular. En el retículo endoplásmico, los péptidos antigénicos se unen a las moléculas de MHC de clase I, que posteriormente se transportan a la superficie celular para la presentación a los linfocitos T citotóxicos del sistema inmunológico.

20 Los antígenos que existen fuera de la célula se procesan por la vía endocítica. Tales antígenos son tomados en la célula por endocitosis, que coloca los antígenos en vesículas especializadas llamadas endosomas y posteriormente en vesículas especializadas llamadas lisosomas, en las que el antígeno es degradado por las proteasas en péptidos antigénicos que se unen a las moléculas MHC clase II. El complejo de péptido antigénico-molécula de MHC clase II posteriormente se transporta a la superficie celular para la presentación a los linfocitos T auxiliares del sistema inmunológico.

25 Se debe considerar una variedad de factores en el desarrollo de una vacuna efectiva. Por ejemplo, el grado de activación de la rama mediada humoral o celular del sistema inmunológico puede determinar la efectividad de una vacuna contra una enfermedad particular. Por otra parte, el desarrollo de la memoria inmunológica por la inducción de la formación de células de memoria puede ser importante para una vacuna efectiva contra una enfermedad particular (Kuby, *supra*). Por ejemplo, la protección de las enfermedades infecciosas causadas por patógenos con períodos de incubación cortos, tales como virus de la gripe, requiere altos niveles de anticuerpo neutralizante generados por la rama humoral debido a que los síntomas de la enfermedad ya están en proceso antes de que se active la memoria. En forma alternativa, la protección de las enfermedades infecciosas causadas por patógenos con períodos de incubación largos, tales como virus de polio, no requiere anticuerpos neutralizantes en el momento de la infección pero en cambio requiere células B de memoria que puedan generar los anticuerpos neutralizantes para combatir el patógeno antes de que pueda infectar los tejidos diana. En consecuencia, la efectividad de una vacuna para prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad particular depende del tipo de respuesta inmune generada por la vacuna.

40 Muchas vacunas tradicionales han dependido de patógenos intactos tales como virus atenuados o inactivados o bacterias para inducir una respuesta inmune. Sin embargo, estas vacunas tradicionales tienen ventajas y desventajas, que incluyen la inversión de un patógeno atenuado a una forma virulenta. El problema de la inversión de una vacuna atenuada se ha tratado con el uso de moléculas del patógeno más que el patógeno completo. Por ejemplo, las estrategias de inmunización han comenzado a incorporar vacunas de vector recombinante y vacunas de péptidos sintéticos (Kuby, *supra*). Recientemente, también se han usado vacunas de ADN (Donnelly et al., *Annu. Rev. Immunol.* 15:617-648 (1997), que se incorporan en la presente memoria por referencia). El uso de las moléculas de un patógeno proporciona vacunas seguras que superan la potencial inversión a una forma virulenta de la vacuna.

50 El direccionamiento de antígenos a las moléculas de MHC clase II para activar los linfocitos T auxiliares se ha descrito mediante secuencias dirigidas a los lisosomas, que dirigen los antígenos a los lisosomas, en los que el antígeno se digiere con la proteasa lisosómica en los péptidos antigénicos que se unen a las moléculas de MHC clase II (Patente U.S. Núm. 5.633.234; Thomson et al., *J. Virol.* 72: 2246-2252 (1998)). Sería ventajoso desarrollar vacunas que administran múltiples antígenos mientras que aprovechan la seguridad provista por la administración de epitopos individuales de un patógeno más que un organismo completo. En particular, sería ventajoso desarrollar vacunas que dirijan efectivamente antígenos a las moléculas de MHC clase II para la activación de los linfocitos T auxiliares.

55 Varios estudios también indican el papel crítico de las células T citotóxicas en la producción y erradicación de las enfermedades infecciosas y cáncer por el sistema inmunológico (Byrne et al., *J. Immunol.* 51: 682 (1984); McMichael et al., *N. Engl. J. Med.* 45 309:13 (1983)). Las vacunas de proteína recombinante no inducen en forma confiable las respuestas de CTL, y por otra parte el uso de vacunas inmunogénicas que consisten en patógenos atenuados en los seres humanos está dificultado, en el caso de varias enfermedades importantes, por problemas de seguridad esenciales. En el caso de enfermedades tales como VIH, HBV, HCV, y malaria, parece conveniente no solo inducir una respuesta CTL vigorosa, sino también centrar la respuesta contra los epitopos altamente conservados a fin de

evitar el escape por mutación y superar la eficacia variable de la vacuna contra diferentes cepas del patógeno diana.

La inducción de una respuesta amplia dirigida simultáneamente contra múltiples epitopos también parece ser crítica para el desarrollo de vacunas eficaces. La infección con VIH es quizás el mejor ejemplo en que un huésped infectado puede beneficiarse de una respuesta multiespecífica. La progresión rápida de la infección con VIH se ha informado en casos en que se induce una respuesta de CTL restringidamente centrada mientras que los que no progresan tienen a mostrar una especificidad más amplia de los CTLs (Goulder et al., Nat. Med. 3: 212 (1997); Borrow et al., Nat. Med. 3:205 (1997)). La naturaleza muy variable de los epitopos de CTL de VIH resultantes de un genoma de alta mutación y la selección por las respuestas de los CTL dirigidos contra solo un epitopo individual o pocos también respalda la necesidad de respuestas amplias de los CTL de epitopos (McMichael et al., Annu. Rev. Immunol. 15:271 (1997)).

Una estrategia potencial para inducir respuestas multiespecíficas contra epitopos conservados es la inmunización con un plásmido minigén que codifica los epitopos de modo cadena de perlas. Se ha descrito la inducción de las respuestas de CTL, HTL, y células B en los ratones por los plásmidos de minigén por varios laboratorios que usan constructos que codifican tanto como 11 epitopos (An et al., J. Virol. 71: 2292 (1997); Thomson et al., J. Immunol. 157: 822 (1996); Whitton et al., J. Virol. 67: 348 (1993); Hanke et al., Vaccine 16:426 (1998); Vitiello et al., Eur. J. Immunol. 27:671-678 (1997)). Los minigenes se han administrado *in vivo* por la infección con adenovirus recombinante o vaccinia, o por la inyección de ADN purificado por medio de la vía intramuscular o intradérmica (Thomson et al., J. Immunol. 160:1717 (1998); Toes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14660 (1997)).

El desarrollo exitoso de las vacunas de ADN de minigén para uso humano requerirá tratar ciertas cuestiones fundamentales que se relacionan con la afinidad de MHC por el epitopo, optimización de los constructos para la máxima inmunogenicidad *in vivo*, y desarrollo de ensayos para analizar *in vivo* la potencia de los constructos de minigén multi-epitopo. Con respecto a la afinidad de unión de MHC de los epitopos, en la actualidad no se conoce si se pueden incluir epitopos de baja y alta afinidad dentro de un constructo de minigén único, y que los intervalos de afinidad por el péptido son permisibles para la inducción de los CTL *in vivo*. Esto es esencialmente importante porque los epitopos dominantes varían en su afinidad y porque sería importante poder administrar mezclas de subepitopos dominantes y subdominantes que se caracterizan por afinidades de unión alta y baja a MHC.

Con respecto a la optimización del constructo de minigén para la máxima inmunogenicidad *in vivo*, existen datos conflictivos respecto de si la posición exacta de los epitopos en un constructo dado o la presencia de regiones flanqueantes, epitopos de las células T auxiliares, y las secuencias señal podrían ser críticas para la inducción de los CTL (Del Val et al., Cell 66:1145 (1991); Bergmann et al., J. Virol. 68:5306 (1994); Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5845 (1995); Shirai et al., J. Infect. Dis. 173:24 (1996); Rahemtulla et al., Nature 353:180 (1991); Jennings et al., Cell. Immunol. 133:234 (1991); Anderson et al., J. Exp. Med. 174:489 (1991); Uger et al., J. Immunol. 158:685 (1997)). Finalmente, con respecto al desarrollo de ensayos que permitan analizar los candidato de vacuna humana, cabe indicar que, hasta la fecha, todos los datos inmunogenicidad *in vivo* de los plásmidos de minigén multiepitope se han realizado con epitopos restringidos de MHC de clase I murinos. Sería ventajoso poder analizar la inmunogenicidad *in vivo* de los minigenes que contienen los epitopos de CTL humano en un sistema modelo animal conveniente.

El documento WO 97/35021 desvela vaccinia recombinante que comprende un promotor unido operativamente a las secuencias que codifican un péptido oligo-epitopo del antígeno específico de próstata (PSA), una señal de tráfico ER y un epitopo auxiliar T universal.

Thomson et al., 1998, J. Virol. 72(3), 2246-2252 desvelan una vaccinia recombinante que comprende un promotor unido operativamente a las secuencias que codifican múltiples epitopos CTL restringidos de clase II del virus de Epstein-Barr y virus de la gripe y señales de tráfico endosómico/lisosómico derivadas de LAMP-1 y la proteína II.

An et al. J. Virol., 1997, 71(3), 2292-2302, desvelan una vacuna minigén multivalente que contiene epitopos de las células B, epitopos de CTL y epitopos de TH) de varios microbios.

El documento WO 95/07707 desvela los péptidos de unión a pan DR tal como el péptido AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla y sus usos terapéuticos.

El documento WO 95/22317 desvela los constructos de minigén que incluyen uno o más epitopos CTL y uno o más epitopos TH.

En consecuencia, existe una necesidad de desarrollar procedimientos para administrar efectivamente una variedad de antígenos HTL (linfocito T auxiliar) y CTL (linfocito T citotóxico) para estimular una respuesta inmune. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La invención en consecuencia se refiere a un vector de expresión definido en las reivindicaciones.

La presente invención posibilita un procedimiento de inducir una respuesta inmune *in vivo* que comprende

administrar a un sujeto mamífero un vector de expresión de la invención.

La presente invención también posibilita un procedimiento de inducir una respuesta inmune *in vivo* que comprende administrar a un sujeto mamífero un vector de expresión de la invención.

5 La invención también posibilita un procedimiento de ensayar la inmunogenicidad humana de un epitopo del péptido de células T *in vivo* a un mamífero no humano, que comprende la etapa de administrar al mamífero no humano un vector de expresión de la invención.

10 En una realización, los epitopos del péptido heterólogo comprenden dos o más epitopos del péptido HTL heterólogo. En otra realización, los epitopos del péptido heterólogo comprenden un epitopo del péptido CTL y un epitopo del péptido HTL universal. En otra realización, los epitopos del péptido heterólogo también comprenden uno a dos o más epitopos del péptido CTL heterólogo. En otra realización, el vector de expresión comprende los epitopos del péptido HTL y CTL.

En una realización, uno de los epitopos del péptido HTL es un epitopo HTL universal. En otra realización, el epitopo HTL universal es un epitopo pan DR. En otra realización, el epitopo pan DR tiene la secuencia AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla (SEQ ID NO:38).

15 En una realización, la secuencia dirigida a MHC comprende una región de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la proteína II, LAMP-I, HLS-DM, HLA-DO, H2-DO, proteína de la matriz de la gripe, antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno del núcleo de hepatitis B, partícula Ty, proteína Ig- α , proteína Ig- β , y secuencia señal de la cadena kappa de Ig.

20 En una realización, el vector de expresión también comprende una segunda secuencia promotora unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica uno o más epitopos del péptido de HTL o CTL heterólogos. En otra realización, el epitopo del péptido CTL comprende un motivo estructural para un supertipo HLA, por el cual el epitopo del péptido CTL se une a dos o más miembros del supertipo con una afinidad mayor de 500 nM. En otra realización, los epitopos del péptido CTL tienen motivos estructurales que proporcionan la afinidad de unión para más de un supertipo de alelo de HLA.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente) del constructo liPADRE que codifica una fusión del gen li murino con una secuencia del epitopo pan DR sustituida con la secuencia CLIP de la proteína li.

30 La Figura 2 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente) del constructo 180T que codifica una fusión del dominio citoplasmático, el dominio de transmembrana y parte del dominio luminal de la proteína li fusionada a los múltiples epitopos de MHC de clase II.

35 La Figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 5 y 6, respectivamente) del constructo liThfull que codifica una fusión del dominio citoplasmático, dominio de transmembrana y una porción del dominio luminal de la proteína li fusionado a múltiples epitopos auxiliares T y residuos de aminoácidos 101 a 215 de la proteína II, que codifica la región de trimerización de la proteína li.

La Figura 4 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 7 y 8, respectivamente) del constructo KappaLAMPTh que codifica una fusión de la secuencia señal kappa de la inmunoglobulina murina fusionada a los múltiples epitopos auxiliares T y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de LAMP-1.

40 La Figura 5 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 9 y 10, respectivamente) del constructo H2M-Th que codifica una fusión de la secuencia señal de H2-M fusionada a los múltiples epitopos de MHC de clase II y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos H2-M.

La Figura 6 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 11 y 12, respectivamente) del constructo H2O-Th que codifica una fusión de la secuencia señal de H2-DO fusionada a los múltiples epitopos de MHC de clase II y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de H2-DO.

45 La Figura 7 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS:13 y 14, respectivamente) del constructo de PADRE-matriz de gripe que codifica una fusión de una secuencia del epitopo pan DR fusionada al extremo amino-terminal de la proteína de la matriz de la gripe.

50 La Figura 8 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS:15 y 16, respectivamente) del constructo PADRE-HBV-s que codifica una fusión de una secuencia del epitopo pan DR fusionada al extremo amino-terminal del antígeno de superficie del virus de hepatitis B.

La Figura 9 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 17 y 18, respectivamente) del constructo de Ig-alfaTh que codifica una fusión de la secuencia señal de la proteína de Ig- α fusionada a los múltiples epitopos de MHC de clase II y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de la proteína de Ig- α .

- La Figura 10 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 19 y 20, respectivamente) del constructo de Ig- betaTh que codifica una fusión de la secuencia señal de la proteína de Ig-β fusionada a los múltiples epítopos de MHC de clase II y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de la proteína de Ig-β.
- 5 La Figura 11 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS:21 y 22, respectivamente) del constructo de SigTh que codifica una fusión de la secuencia señal de la inmunoglobulina kappa fusionada a los múltiples epítopos de MHC de clase II.
- La Figura 12 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 23 y 24, respectivamente) de HLA-DR humano, la proteína (II) de cadena no variante.
- 10 La Figura 13 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS:25 y 26, respectivamente) de glicoproteína 1 de membrana lisosómica humana (LAMP-1).
- La Figura 14 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 27 y 28, respectivamente) de HLA-DMB humano.
- La Figura 15 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 29 y 30, respectivamente) de HLA-DO beta humana.
- 15 La Figura 16 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS:31 y 32, respectivamente) de Ig-α de MB-1 humana.
- La Figura 17 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS:33 y 34, respectivamente) de proteína de Ig-β humana.
- 20 La Figura 18 muestra un diagrama esquemático que ilustra el procedimiento de generación de algunos de los constructos que codifican una secuencia dirigida a MHC clase II fusionada a los múltiples epítopos de MHC de clase II.
- La Figura 19 muestra la secuencia de nucleótidos del vector pEP2 (SEQ ID NO:35).
- La Figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos del vector pMIN.0 (SEQ ID NO:36).
- La Figura 21 muestra la secuencia de nucleótidos del vector pMIN.1 (SEQ ID NO:37).
- 25 Figura 22. Respuesta de CTL representativas en los ratones HLA-A2.1/K^b-H-2^{bxs} inmunizados con pMIN.1 DNA. Se cultivaron los esplenocitos de animales activados en matraces por triplicados y se estimularon dos veces *in vitro* con cada epítopo del péptido. Se analizó la citotoxicidad de cada cultivo en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr contra las células diana Jurkat-A2,1/K^b en presencia (símbolos llenos, línea entera) o ausencia (símbolos abiertos, líneas de puntos) del péptido. Cada símbolo representa la respuesta de un solo cultivo.
- 30 Figura 23. Presentación de epítopos virales a los CTL específicos por células tumorales Jurkat-A2,1/K^b transfectadas con minigén de ADN. Se usaron dos constructos para la transfección, pMIN.1 y pMin.2-GFP. Las células diana transfectadas con pMin.2-GFP se separaron por FACS y la población usada en este experimento contenía 60% de células fluorescentes. Se midió la estimulación CTL por la cuantificación de la cantidad de liberación de IFN-γ (A, B) o por lisis de las células diana marcadas con ⁵¹Cr (C, D, barras rayadas). Los CTL se estimularon con células transfectadas (A, C) o con células Jurkat-A2,1/K^b originales en presencia de 1 μg/ml de péptido (B, D). Los niveles de liberación de IFN-γ y la citotoxicidad para las diferentes líneas CTL en ausencia del epítopo variaron de 72-126 pg/ml y 2-6% respectivamente.
- 35 Figura 24. Síntesis de constructos de minigén modificados para tratar variables críticas para la inmunogenicidad *in vivo*. Las siguientes modificaciones se incorporaron en el constructo pMin. 1 prototipo; A, supresión del epítopo PADRE HTL; B, incorporación del epítopo HBV Pol 551 nativo que contiene una alanina en posición 9; C, supresión de la secuencia señal kappa de Ig; y D, cambio de la posición de los epítopos HBV Env 335 y HBV Pol 455.
- 40 Figura 25. Examen de las variables que pueden influir en la inmunogenicidad de pMin. 1. La actividad inductora de CTL *in vivo* de pMin. 1 se compara con los constructos modificados. Para facilitar la comparación, se compara la respuesta CTL inducida por cada uno de los constructos de minigén de ADN modificados (barras sombreadas) por separado en cada uno de los cuatro paneles con la respuesta inducida por el constructo prototipo pMIN.1 (barras llenas). Se muestra la respuesta media geométrica de los cultivos positivos para CTL de dos a cinco experimentos independientes. Los números mostrados con cada barra indican el número de cultivos positivos/número total analizado para el epítopo particular. La relación de cultivos positivos/analizados totales para los grupos de pMin. 1 se muestra en el panel A y es el mismo para los restantes paneles de la figura (ver Ejemplo V, Materiales y Procedimientos, en cultivos de CTL *in vitro*, para la definición de un cultivo CTL positivo). Las respuestas a Theradigm se obtuvieron por la inmunización de los animales con el lipopéptido y el análisis de los cultivos de esplenocitos con el péptido 18-27 del núcleo HBV.
- 45
- 50

Definiciones

Un epitopo del péptido "HTL" o un "epitopo de MHC II" es un epitopo restringido de MHC clase II, es decir, uno que se une con una molécula de MHC clase II.

5 Un epitopo del péptido "CTL" o un "epitopo de MHC I" es un epitopo restringido de MHC clase I, es decir, uno que se une con una molécula de MHC clase I.

Una "secuencia dirigida a MHC" se refiere a una secuencia peptídica que se dirige a un polipéptido, por ejemplo, que comprende un epitopo del péptido, para una vía citosólica (por ejemplo, una vía de procesamiento del antígeno de MHC clase I), en la vía del retículo endoplásmico, o una vía endocítica (por ejemplo, una vía de procesamiento del antígeno de MHC clase II).

10 El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se hallan en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico normalmente se produce en forma recombinante, que tiene dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para obtener un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificadora de otra fuente. De modo similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se hallan en la misma relación entre sí en la naturaleza, por ejemplo, un polipéptido de fusión que comprende subsecuencias de diferentes polipéptidos, epitopos del péptido del mismo polipéptido que no están naturalmente en una posición adyacente, o repeticiones de un epitopo del péptido único.

20 Como se usa en la presente memoria, la frase "epitopo de MHC clase II universal" o un "epitopo HTL universal" se refiere a un epitopo del péptido de MHC clase II que se une a los productos génicos de múltiples alelos de MHC clase II. Por ejemplo, los alelos DR, DP y DQ son alelos de MHC II humanos. En general, un único conjunto de péptidos se une a un producto génico particular de un alelo de MHC clase II. En contraste, un epitopo de MHC clase II universal es capaz de unirse a los productos génicos de múltiples alelos de MHC clase II. Un epitopo de MHC clase II universal se une a 2 o más alelos de MHC clase II, generalmente 3 o más alelos de MHC clase II, y particularmente 5 o más alelos de MHC clase II. En consecuencia, la presencia de un epitopo de MHC clase II universal en un vector de expresión es ventajosa ya que funciona para aumentar la cantidad de moléculas alélicas de MHC clase II que se pueden unir al péptido y, en consecuencia, el número de linfocitos T auxiliares que se activan.

30 Los epitopos de MHC de clase II universales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, epitopos tales como los "epitopos panDR" también denominado como "PADRE" (Alexander et al., Immunity 1:751-761 1: (1994); WO 95/07707, USSN 60/036,713, USSN 60/037,432, PCT/US98/01373, 09/009,953, y USSN 60/087,192 cada uno de los cuales incorpora en la presente memoria por referencia). Un "péptido de unión al pan DR" o un "PADRE" péptido de la invención es un péptido capaz de unirse al menos a aproximadamente 7 diferentes moléculas de DR, preferentemente 7 de las 12 moléculas de DR más comunes, con máxima preferencia 9 de las 12 moléculas de DR más comunes (DR1, 2w2b, 2w2a, 3, 4w4, 4w14, 5, 7, 52a, 52b, 52c, y 53), o de modo alternativo, 50% de un panel de las moléculas de DR representativos de mayor de o igual a 75% de la población humana, preferentemente mayor de o igual a 80% de la población humana. Los epitopos pan DR pueden unirse a una cantidad de alelos DR y son fuertemente inmunogénicos para la células T. Por ejemplo, se halló que los epitopos pan DR son más efectivos para inducir una respuesta inmune que los epitopos naturales MHC de clase II (Alexander, *supra*). Un ejemplo de un epitopo PADRE es el péptido AlaLysPheValA-laAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla (SEQ ID NO:38).

40 Con respecto a una secuencia de aminoácidos particular, un "epitopo" es un conjunto de residuos de aminoácidos que se involucra en el reconocimiento por una inmunoglobulina particular, o en el contexto de las células T, los residuos necesarios para el reconocimiento por las proteínas del receptor celular T y/o receptores del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). En un contexto del sistema inmunológico, *in vivo* o *in vitro*, un epitopo tiene las características colectivas de una molécula, tal como estructura del péptido primaria, secundaria y terciaria, y carga, que en conjunto forma un sitio reconocido por una inmunoglobulina, receptor celular T o molécula de HLA. A lo largo de esta descripción epitopo y péptido con frecuencia se usan en forma indistinta. Se aprecia, sin embargo, que las moléculas de proteína o péptido aisladas o purificadas más grandes que y que comprenden un epitopo de la invención están dentro de los límites de la invención.

50 Como se usa en la presente memoria, "alta afinidad" con respecto a las moléculas de HLA de clase I se define como la unión de una IC₅₀ (o K_D) de menos de 50 nM. "Afinidad intermedia" es la unión con una IC₅₀ (o K_D) de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 500 nM. "Alta afinidad" con respecto a la unión de moléculas de HLA clase II se define como la unión con una K_D de menos de 100 nM. "Afinidad intermedia" es la unión con una K_D de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 nM. Los ensayos para determinar la unión se describen en detalle, por ejemplo, en publicaciones PCT WO 94/20127 y WO 94/03205. En forma alternativa, la unión se expresa con respecto a un péptido de referencia. Como un ensayo particular es más, o menos sensible, las IC_{50m} de los péptidos analizados pueden cambiar. Sin embargo, la unión relativa del péptido de referencia no cambiará significativamente. Por ejemplo, en un ensayo que corre en condiciones de modo que la IC₅₀ del péptido de referencia aumenta 10 veces, los valores de IC₅₀ de los péptidos de ensayo cambiarán aproximadamente 10 veces. En consecuencia, para evitar ambigüedades, la evaluación de si un péptido es bueno, intermedio, débil o negativo para la unión se basa

generalmente en su IC50, con respecto a la IC50 de un péptido estándar.

5 A lo largo de esta descripción, los resultados se expresan en términos de "IC50". La IC50 es la concentración del péptido en un ensayo de unión en la que se observa el 50% de inhibición de la unión de un péptido de referencia. Dadas las condiciones en que se corren los ensayos (es decir, concentraciones de proteínas de HLA y péptido marcado limitantes), estos valores se aproximan a los valores de KD. Cabe mencionar que los valores de IC50 pueden cambiarse, a menudo drásticamente, si las condiciones del ensayo varían y dependen de los reactivos particulares usados (por ejemplo, preparación de HLA, etc.). Por ejemplo, las concentraciones excesivas de las moléculas de HLA aumentarán la IC50 medida aparente de un ligando dado.

10 Los términos "idéntico" o por ciento de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias peptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje de residuos de aminoácidos especificado que son iguales, cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima respecto de una ventana de comparación, medida por medio de algoritmos de comparación de secuencia por medio de parámetros del programa predeterminados o por alineamiento manual e inspección visual.

15 Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren al material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que acompañan normalmente tal como se halla en la naturaleza. En consecuencia, los péptidos aislados de acuerdo con la invención preferentemente no contienen materiales normalmente asociados con los péptidos en su ambiente in situ.

20 "Complejo de histocompatibilidad mayor" o "MHC" es un agrupamiento de genes que cumple un papel en el control de las interacciones celulares responsables de las respuestas inmunes fisiológicas. En los seres humanos, el complejo MHC también se conoce como el complejo HLA. Para una descripción detallada de los complejos MHC y HLA, ver Paul, *Fundamental Immunology* (3rd ed. 1993).

"Antígeno leucocitario humano" o "HLA" es una proteína del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I o clase II humano (ver, por ejemplo, Stites, et al., *Immunology*, (8th ed., 1994).

25 Un "supertipo o familia de HLA", como se usa en la presente memoria, describe conjuntos de las moléculas de HLA agrupados sobre la base de las especificidades de unión del péptido compartido. Las moléculas de HLA de clase I que comparten alguna afinidad de unión similar por los péptidos que portan ciertos motivos de aminoácido se agrupan en los supertipos HLA. Los términos superfamilia de HLA, familia del supertipo HLA, familia de HLA, y moléculas del supertipo tipo xx de HLA (en el que xx indica un tipo de HLA particular), son sinónimos.

30 El término "motivo" se refiere al patrón de residuos en un péptido de longitud definida, usualmente un péptido de aproximadamente 8 a aproximadamente 13 aminoácidos para un motivo de HLA de clase I y de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 aminoácidos para un motivo HLA de clase II, que es reconocido por una molécula de HLA particular. Los motivos peptídicos son normalmente diferentes para cada proteína codificada por cada alelo de HLA humano y difiere en el patrón de los residuos de anclaje primarios y secundarios.

35 Un "supermotivo" es una especificidad de unión al péptido compartida por las moléculas de HLA codificadas por dos o más alelos HLA. En consecuencia, un supermotivo preferentemente se reconoce con afinidad alta o intermedia (como se define en la presente memoria) con dos o más antígenos HLA.

"Unión de reacción cruzada" indica que un péptido está unido con más de una molécula de HLA; un sinónimo es unión degenerada.

40 El término "péptido" se usa en forma indistinta con "oligopéptido" en la presente memoria para designar una serie de residuos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí, normalmente por enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo adyacentes de los aminoácidos. Los oligopéptidos inductores de CTL preferidos de la invención son 13 residuos o menos de longitud y usualmente consisten en entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 residuos, preferentemente 9 o 10 residuos. Los oligopéptidos inductores de HTL son menos de aproximadamente 50 residuos de longitud y consisten en entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 residuos, más usualmente entre aproximadamente 12 y 25, y a menudo entre aproximadamente 15 y 20 residuos.

45 Un "péptido inmunogénico" o "epitopo del péptido" es un péptido que comprende un motivo o supermotivo específico de alelo de modo que el péptido se unirá a una molécula de HLA e inducirá una respuesta de CTL y/o HTL. En consecuencia, los péptidos inmunogénicos de la invención son capaces de unirse a una molécula de HLA apropiada y a partir de este momento inducen una respuesta de células T citotóxicas, o una respuesta de células T auxiliares, al antígeno del cual deriva el péptido inmunogénico.

Una "respuesta inmune protectora" se refiere a una respuesta CTL y/o HTL a un antígeno derivado de un agente infeccioso o un antígeno tumoral, que impide o al menos detiene parcialmente los síntomas o progresión de la enfermedad. La respuesta inmune también puede incluir una respuesta de anticuerpo que ha sido facilitada por la estimulación de las células T auxiliares.

55 El término "residuo" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un oligopéptido por un

enlace amida o mimético de enlace amida.

"Péptido sintético" se refiere a un péptido que no es natural, sino que es fabricado por el hombre por medio de procedimientos tales como síntesis química o tecnología de ADN recombinante.

5 La nomenclatura usada para describir los compuestos de péptido sigue la práctica convencional en la que el grupo amino se presenta a la izquierda (el extremo N-terminal) y el grupo carboxilo a la derecha (el extremo C-terminal) de cada residuo de aminoácido. Cuando las posiciones del residuo de aminoácido se refieren a un epitopo del péptido se numeran en una dirección amino a carboxilo, con la posición uno que está en la posición más cercana al extremo amino terminal del epitopo, o el péptido o proteína de la cual puede ser parte. En las fórmulas que representan las formas de realización específicas seleccionadas de la presente invención, los grupos amino- y carboxilo-terminal, si bien no se muestran específicamente, están en la forma que se asume pueden estar en los valores de pH fisiológico, a menos que se especifique lo contrario. En las fórmulas estructurales de aminoácidos, cada residuo se representa generalmente por denominaciones estándares de tres letras o letra única. La forma L de un residuo de aminoácido está representada por una letra única mayúscula o una primera letra mayúscula de un símbolo de tres letras, y la forma D para los aminoácidos que tienen formas D está representada por una letra única minúscula o un símbolo de tres letras minúscula. La glicina no tiene átomo de carbono asimétrico y se denomina simplemente como "Gly" o G.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "vector de expresión" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de expresar un antígeno de interés tal como un epitopo de MHC clase I o clase II en una célula diana apropiada. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido o virus, que incluye virus de ADN o ARN. El vector de expresión contiene tal elemento promotor para expresar un antígeno de interés en la célula o tejido apropiado a fin de estimular una respuesta inmune deseada.

Descripción detallada de la invención

15 Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T auxiliares (HTLs) son críticos para la inmunidad contra los patógenos infecciosos; tales como virus, bacterias, y protozoos; células tumorales; enfermedades autoinmunes y similares. La presente invención proporciona minígenos que codifican epitopos del péptido que inducen una respuesta de CTL y/o HTL. Los minígenos de la invención también incluyen una secuencia dirigida a MHC. Se puede analizar una variedad de minígenos que codifican diferentes epitopos para determinar la inmunogenicidad por medio de un HLA de ratón transgénico. Los epitopos normalmente son una combinación de al menos dos o más epitopos de HTL, o un epitopo de CTL más un epitopo HTL universal, y opcionalmente incluyen epitopos HTL y/o CTL adicionales. Se pueden incluir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, veinte, treinta, cuarenta o aproximadamente cincuenta epitopos diferentes, sean HTL y/o CTL, en el minigén, junto con la secuencia dirigida a MHC. Los epitopos pueden tener diferente restricción de HLA. Los epitopos para analizar incluyen los derivados de virus tales como VIH, HBV, HCV, HSV, CMV, HPV, y HTLV; antígenos de cáncer tales como p53, Her2/Neu, MAGE, PSA, virus del papiloma humano, y CEA; parásitos tales como *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Giardia*, *Entamoeba*; enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, miastenia gravis, y lupus eritematoso; hongos tales como *Aspergillus* y *Candida*; y bacterias tales como *Escherichia coli*, estafilococos, *Chlamydia*, micobacterias, estreptococos, y *Pseudomonas*. Los epitopos que serán codificados por el minigén se seleccionan y analizan por medio de los procedimientos descritos en las solicitudes de PCT publicadas WO 93/07421, WO 94/02353, WO 95/01000, WO 97/04451, y WO 97/05348.

Epitopos de HTL y CTL

40 Los vectores de expresión de la invención codifican uno o más epitopos de MHC clase II y/o clase I y una secuencia dirigida a MHC. Los epitopos de MHC clase II o clase I múltiples presentes en un vector de expresión pueden derivar del mismo antígeno, o los epitopos de MHC pueden derivar de antígenos diferentes. Por ejemplo, un vector de expresión puede contener uno o más epitopos de MHC que pueden derivar de dos antígenos diferentes del mismo virus o de dos antígenos diferentes de diferentes virus. Por otra parte, se puede usar cualquier epitopo de MHC en los vectores de expresión de la invención. Por ejemplo, se puede usar cualquier epitopo de MHC único o una combinación de los epitopos de MHC mostrados en las Tablas 1 a 8 en los vectores de expresión de la invención. Otros epitopos del péptido pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica, por ejemplo, por el uso de una computadora para seleccionar epitopos que contienen motivos o supermotivos específicos del alelo HLA. Los vectores de expresión de la invención también pueden codificar uno o más epitopos de MHC de clase II universales, por ejemplo, PADRE.

45 Los epitopos de MHC de clase II universales se pueden combinar ventajosamente con otros epitopos de MHC de clase I y clase II para aumentar el número de células que se activan en respuesta a un antígeno dado y proporcionan una cobertura de población más amplia de alelos reactivos a MHC. En consecuencia, los vectores de expresión de la invención pueden codificar epitopos de MHC específicos para un antígeno, epitopos de MHC de clase II universales, o una combinación de epitopos de MHC específicos y al menos un epitopo de MHC clase II universal.

50 Los epitopos de MHC de clase I en general son de aproximadamente 5 a 15 aminoácidos de longitud, en particular aproximadamente 8 a 11 aminoácidos de longitud. Los epitopos de MHC de clase II en general son de

aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de longitud, en particular aproximadamente 13 a 21 aminoácidos de longitud. Un epitopo de MHC de clase I o II se puede derivar de cualquier antígeno de interés deseado. El antígeno de interés puede ser un antígeno viral, receptor de superficie, antígeno tumoral, oncogén, enzima, o cualquier patógeno, célula o molécula para la que se desea una respuesta inmune. Los epitopos se pueden seleccionar sobre la base de su capacidad de unir uno o múltiples alelos de HLA, y también se pueden seleccionar por medio de la técnica "análogo" que se describe a continuación.

Secuencias dirigidas

Los vectores de expresión de la invención codifican uno o más epitopos de MHC unidos operativamente a una secuencia dirigida a MHC. El uso de una secuencia dirigida a MHC aumenta la respuesta inmune a un antígeno, con respecto a la administración del antígeno solo, por la dirección del epitopo del péptido al sitio de ensamblaje de la molécula de MHC y transporte a la superficie celular, de este modo se proporciona un número aumentado de complejos de molécula de MHC-epitopo del péptido disponible para la unión y activación de las células T.

Las secuencias dirigidas a MHC clase I se usan en la presente invención, por ejemplo, las secuencias que se dirigen al péptido del epitopo de MHC clase I a una vía citosólica o a al retículo endoplásmico (ver, por ejemplo, Rammensee et al., *Immunogenetics* 41:178-228 (1995)). Por ejemplo, la vía citosólica procesa los antígenos endógenos que se expresan dentro de la célula. Sin estar ligado a teoría particular alguna, se considera que las proteínas citosólicas son degradadas al menos parcialmente por una actividad de endopeptidasa de un proteasoma y a continuación se transportan al retículo endoplásmico por la molécula TAP (transportador asociado con procesamiento). En el retículo endoplásmico, el antígeno se une a las moléculas de MHC clase I. Las secuencias señal del retículo endoplásmico saltean la vía de procesamiento citosólica y dirigen directamente los antígenos endógenos al retículo endoplásmico, en el que se produce la degradación proteolítica en los fragmentos del péptido. Tales secuencias dirigidas a MHC clase I son bien conocidas en la técnica, e incluyen por ejemplo, secuencias señal tales como las de Ig kappa, activador del plasminógeno tisular o insulina. Un péptido señal preferido es la secuencia de la cadena kappa de la Ig humana. Las secuencias señal del retículo endoplásmico también se pueden usar para dirigir los epitopos de MHC de clase II al retículo endoplásmico, el sitio del ensamblaje de la molécula de MHC clase I.

Las secuencias dirigidas a MHC clase II también se usan en la invención, por ejemplo, los que dirigen un péptido a la vía endocítica. Estas secuencias de direccionamiento normalmente se dirigen a los antígenos extracelulares para ingresar en la vía endocítica, lo que produce que el antígeno se transfiera al compartimento lisosómico en el que el antígeno se escinde proteolíticamente en péptidos antigénicos para la unirse a las moléculas de MHC clase II. Como en el procesamiento normal del antígeno exógeno, una secuencia que dirige un epitopo de MHC clase II a los endosomas de la vía endocítica y/o posteriormente a los lisosomas, en los que el epitopo de MHC clase II se puede unir a una molécula de MHC clase II, es una secuencia dirigida a MHC clase II. Por ejemplo, el grupo de las secuencias dirigidas a MHC clase II útiles en la invención son secuencias dirigidas a los lisosomas, que localizan los polipéptidos en los lisosomas. Debido a que las moléculas de MHC clase II normalmente se unen a los péptidos antigénicos derivados del procesamiento proteolítico de los antígenos sometidos a endocitosis en los lisosomas, una secuencia dirigida a los lisosomas pueden actuar como una secuencia dirigida a MHC clase II. Las secuencias dirigidas a los lisosomas son bien conocidas en la técnica e incluyen secuencias halladas en las proteínas lisosómicas LAMP-1 y LAMP-2 descritas por August et al. (Patente U.S. Núm. 5.633.234, expedida el 27 de mayo de 1997).

Otras proteínas lisosómicas que contienen secuencias dirigidas a los lisosomas incluyen HLA-DM. HLA-DM es una proteína endosómica/lisosómica que actúa en la facilitación de la unión de los péptidos antigénicos a las moléculas de MHC clase II. Debido a que se ubica en el lisosoma, HLA-DM tiene una secuencia dirigida a los lisosomas que puede actuar como una secuencia dirigida a la molécula de MHC clase II (Copier et al., *J. Immunol.* 157:1017-1027 (1996)).

La proteína lisosómica residente HLA-DO también puede funcionar como una secuencia dirigida a los lisosomas. En contraste a las proteínas lisosómicas residentes anteriormente descritas LAMP-1 y HLA-DM, que codifican los motivos que contienen Tyr específicos que dirigen las proteínas a los lisosomas, HLA-DO se dirige a los lisosomas por la asociación con HLA-DM (Liljedahl et al., *EMBO J.* 15:4817-4824 (1996)). En consecuencia, se pueden usar las secuencias de HLA-DO que causan la asociación con HLA-DM y, por consiguiente, la translocación de HLA-DO a los lisosomas como secuencias dirigidas a MHC clase II. De modo similar, el homólogo murino de HLA-DO, H2-DO, se puede usar para derivar una secuencia dirigida a MHC clase II. Un epitopo de MHC clase II se puede fusionar a HLA-DO o H2-DO y se dirige a los lisosomas.

En otro ejemplo, los dominios citoplasmáticos de las subunidades Ig- α e Ig- β del receptor de las células B median la internalización del antígeno y aumentan la eficiencia de la presentación del antígeno (Bonnerot et al., *Immunity* 3:335-347 (1995)). En consecuencia, los dominios citoplasmáticos de las proteínas de Ig- α e Ig- β pueden actuar como secuencias dirigidas a MHC clase II que dirigen un epitopo de MHC clase II a la vía endocítica para el procesamiento y unión a las moléculas de MHC clase II.

Otro ejemplo de una secuencia dirigida a MHC clase II que dirige los epitopos de MHC de clase II a la vía endocítica

es una secuencia que dirige los polipéptidos secretados, en la que el polipéptido puede entrar en la vía endosómica. Estas secuencias dirigidas a MHC clase II que dirigen los polipéptidos por secretar imitan la vía normal por la que se procesan los antígenos extracelulares, exógenos en los péptidos que se unen a las moléculas de MHC clase II. Cualquier secuencia señal que actúa para dirigir un polipéptido a través del retículo endoplásmico y por último se secreta, puede actuar como una secuencia dirigida a MHC clase II a condición que el polipéptido secretado pueda entrar a la vía endosómica/lisósomica y se escinda en los péptidos que pueden unirse a las moléculas de MHC clase II. Un ejemplo de tal fusión se muestra en la Figura 11, en la que la secuencia señal de inmunoglobulina kappa se fusiona a los múltiples epitopos de MHC de clase II.

En otro ejemplo, la proteína Ii se une a las moléculas de MHC clase II en el retículo endoplásmico, en el que actúa para evitar que los péptidos presentes en el retículo endoplásmico se unan a las moléculas de MHC clase II. En consecuencia, la fusión de un epitopo de MHC clase II a la proteína Ii dirige el epitopo de MHC clase II al retículo endoplásmico y una molécula de MHC clase II. Por ejemplo, la secuencia CLIP de la proteína Ii se puede eliminar y reemplazar con una secuencia del epitopo MHC de clase II de modo que el epitopo de MHC clase II se dirige al retículo endoplásmico, en el que el epitopo se une a una molécula de MHC clase II.

En algunos casos, los antígenos mismos pueden servir como secuencias dirigidas a MHC clase II o I y se pueden fusionar a un epitopo de MHC clase II universal para estimular una respuesta inmune. Si bien los antígenos virales citoplásmicos generalmente se procesan y presentan como complejos con moléculas de MHC de clase I, las proteínas citoplásmicas de vida larga tales como la proteína de la matriz de la gripe pueden entrar en la vía de procesamiento de la molécula de MHC clase II (Gueguen & Long, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14692-14697 (1996)). Por ende, las proteínas citoplásmicas de vida larga pueden actuar como una secuencia dirigida a MHC clase II. Por ejemplo, un vector de expresión que codifica la proteína de la matriz de la gripe fusionada a un epitopo de MHC clase II universal se puede usar ventajosamente para dirigir el antígeno de influenza y el epitopo de MHC clase II universal a la vía de MHC clase II para estimular una respuesta inmune para la influenza.

Otros ejemplos de antígenos que funcionan como secuencias dirigidas a MHC clase II incluyen los polipéptidos que forman espontáneamente partículas. Los polipéptidos se secretan de la célula que los produce y forman espontáneamente partículas, que son captadas en una célula que presenta antígeno por endocitosis tal como endocitosis mediada por receptor o es absorbida por fagocitosis. Las partículas se escinden proteolíticamente en péptidos antigénicos después de ingresar en la vía endosómica/lisósomica.

Tal polipéptido que forma espontáneamente partículas es antígeno de superficie de HBV (HBV-S) (Diminsky et al., Vaccine 15:637-647 (1997); Le Borgne et al., Virology 240:304-315 (1998)), cada uno de los cuales incorpora en la presente memoria por referencia. Otro polipéptido que forma espontáneamente partículas es el antígeno del núcleo de HBV (Kuhrober et al., International Immunol. 9:1203-1212 (1997)). Otro polipéptido más que forma espontáneamente partículas es la proteína Ty de levadura (Weber et al., Vaccine 13:831-834 (1995)), que se incorpora en la presente memoria, por ejemplo, por un vector de expresión que contiene el antígeno HBV-S fusionado a un epitopo de MHC clase II universal se puede usar ventajosamente para dirigir el antígeno HBV-S y el epitopo de MHC clase II universal a la vía de MHC clase II para estimular una respuesta inmune al HBV.

Afinidad de unión de los epitopos del péptido por las moléculas de HLA

El gran grado de polimorfismo de HLA es un factor importante a tomar en cuenta en la estrategia basada en epitopos para el desarrollo de vacunas. Para tratar este factor, preferentemente se utiliza la selección del epitopo que abarca la identificación de péptidos capaces de unirse con afinidad alta o intermedia a múltiples moléculas de HLA, con máxima preferencia estos epitopos se unen con afinidad alta o intermedia a dos o más moléculas de HLA específicas del alelo.

Los péptidos inductores de CTL de interés para las composiciones de vacunas preferentemente incluyen los que tienen una afinidad de unión para las moléculas de HLA de clase I de menos de 500 nM. Los péptidos inductores de HTL preferentemente incluyen los que tienen una afinidad de unión para las moléculas de HLA de clase II de menos de 1000 nM. Por ejemplo, la unión de péptido se evalúa por el análisis de la capacidad de un péptido candidato de unirse a una molécula de HLA purificada *in vitro*. Los péptidos que exhiben afinidad alta o intermedia por lo tanto se consideran para el análisis posterior. Los péptidos seleccionados se prueban en otros miembros de la familia del supertipo. En formas de realización preferidas, los péptidos que exhiben la unión de reactividad cruzada posteriormente se usan en las vacunas o en análisis de detección celular.

La afinidad de unión a HLA mayor normalmente se correlaciona con mayor inmunogenicidad. La mayor inmunogenicidad se puede manifestar en varias maneras diferentes. La inmunogenicidad corresponde a si se induce alguna respuesta inmune, y al vigor de cualquier respuesta particular, así también como la medida de la población en que se induce una respuesta. Por ejemplo, un péptido podría inducir una respuesta inmune en un conjunto diverso de la población, aun en el caso en que no se produce una respuesta vigorosa. De acuerdo con estos principios, se ha hallado que cerca de 90% de los péptidos de unión alta son inmunogénicos, en contraste con aproximadamente 50% de los péptidos que se unen con afinidad intermedia. Además, los péptidos de afinidad de unión más alta producen respuestas inmunogénicas más vigorosas. Como resultado, se requieren menos péptidos para inducir un efecto biológico similar si se usa un péptido de unión de afinidad alta. En consecuencia, en formas de

realización preferidas de la invención, los epitopos de unión alta particularmente útiles.

La relación entre la afinidad de unión por las moléculas de HLA de clase I y la inmunogenicidad de los epitopos del péptido diferenciados sobre los antígenos unidos se ha determinado por primera vez en la técnica por los presentes inventores. Se analizó la correlación entre la afinidad de unión y la inmunogenicidad en dos abordajes experimentales diferentes (Sette et al., *J. Immunol.* 153:5586-5592 (1994)). En el primer abordaje, la inmunogenicidad de los potenciales epitopos que varían en afinidad de unión HLA en un intervalo de 10.000 veces se analizó en ratón transgénico HLA-A*0201. En el segundo abordaje, se evaluó la antigenicidad de aproximadamente 100 epitopos potenciales diferentes derivados de del virus de hepatitis B (HBV), todos los cuales portan los motivos de unión A*0201 por el uso de PBL (linfocitos de sangre periférica) de pacientes con hepatitis aguda. De acuerdo con estos abordajes, se determinó que un umbral de afinidad de aproximadamente 500 nM (preferentemente 50 nM o menos) determina la capacidad de un epitopo del péptido para inducir una respuesta de CTL. Estos datos son válidos para las mediciones de afinidad de unión de clase I para los péptidos procesados naturalmente y para los epitopos de las células T sintetizadas. Estos datos también indican el papel importante de la selección determinante en la configuración de las respuestas de las células T (ver, por ejemplo, Schaeffer et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4649-4653, 1989).

También se ha delineado un umbral de afinidad asociado con la inmunogenicidad en el contexto de las moléculas de DR de HLA clase II (ver, por ejemplo, Southwood et al. *J. Immunology* 160:3363-3373 (1998), y USSN 60/087192, presentado el 5/29/98). A fin de definir un umbral biológicamente significativo de la afinidad de unión de DR, se compiló una base de datos de las afinidades de unión de 32 epitopos restringidos de DR por su elemento de restricción (es decir, la molécula de HLA que se une al motivo). En aproximadamente la mitad de los casos (15 de 32 epitopos), la restricción de DR se asoció con afinidades de unión altas, es decir afinidades de unión de menos de 100 nM. En la otra mitad de los casos (16 de 32), la restricción de DR se asoció con afinidad intermedia (afinidades de unión en el intervalo de 100-1000 nM). En solo uno de los 32 casos la restricción de DR se asoció con una IC50 de 1000 nM o mayor. En consecuencia, se puede definir a 1000 nM como un umbral de afinidad asociado con inmunogenicidad en el contexto de las moléculas de DR.

Motivos y supermotivos de unión al epitopo del péptido

En los últimos años se ha acumulado evidencia para demostrar que una gran fracción de las moléculas de HLA clase I y clase II se pueden clasificar en relativamente pocos supertipos, cada uno caracterizado por repertorios de unión de péptidos con gran superposición y estructuras de consenso de los principales sitios de unión del péptido.

Para los análisis del sitio de las moléculas de HLA, se analizaron los residuos que comprenden los sitios B y F de las moléculas de HLA de clase I que se describieron en los estudios cristalográficos (Guo et al., *Nature* 360:364 (1992); Saper et al., *J. Mol. Biol.* 219: 277 (1991); Madden et al., *Cell* 75: 693 (1993); Parham et al., *Immunol. Rev.* 143: 141 (1995)). En estos análisis, se consideró que los residuos 9, 45, 63, 66, 67, 70, y 99 constituyen el sitio B; y se estimó que el sitio B determina la especificidad para el residuo del aminoácido en la segunda posición de los ligandos del péptido. De modo similar, se consideró que los residuos 77, 80, 81, y 116 determinan la especificidad del sitio F; se estimó que el sitio F determina la especificidad para el residuo C-terminal de un ligando del péptido unido por la molécula de HLA clase I.

A través del estudio de los análogos del antígeno sustituidos con aminoácido único y la secuenciación de los péptidos procesados naturalmente, unidos en forma endógena, se han identificado residuos críticos necesarios para la unión específica de alelo de las moléculas de HLA. La presencia de estos residuos se correlaciona con la afinidad de unión para las moléculas de HLA. La identificación de motivos y/o supermotivos que se correlacionan con la unión de afinidad alta e intermedia es un tema importante con respecto a la identificación de los epitopos inmunogénicos del péptido para la inclusión en una vacuna. Kast et al. (*J. Immunol.* 152:3904-3912 (1994)) han demostrado que los péptidos portadores del motivo representan el 90% de los epitopos que se unen a moléculas de HLA de clase I específicas del alelo. En este estudio se evaluaron todos los péptidos posibles de 9 aminoácidos de longitud y superposición en ocho aminoácidos (240 péptidos), que cubren la secuencia completa de las proteínas E6 y E7 del virus de papiloma humano tipo 16, por la unión a cinco moléculas de HLA específicas del alelo que se expresan con alta frecuencia entre los diferentes grupos étnicos. Este conjunto sin sesgo de péptidos permitió una evaluación del valor predictivo de los motivos de HLA clase I. A partir del conjunto de 240 péptidos, se identificaron 22 péptidos que se unen a las moléculas de HLA específicas del alelo con afinidad alta o intermedia. De estos 22 péptidos, 20, (es decir, 91%), eran portadores del motivo. En consecuencia, este estudio demuestra el valor de los motivos para la identificación de los epitopos del péptido para la inclusión en una vacuna: la aplicación de las técnicas de identificación basadas en el motivo elimina la selección del 90% de los potenciales epitopos en una secuencia de la proteína del antígeno diana.

Los péptidos de la presente invención también pueden incluir epitopos que se unen a moléculas DR de MHC clase II. Existe una diferencia significativa entre las moléculas de HLA clase I y clase II. Esta diferencia corresponde al hecho de que, si bien existe una restricción de tamaño estricta y de la posición del motivo con respecto al sitio de unión para los péptidos que se unen a las moléculas de clase I, existe un mayor grado de heterogeneidad tanto en el tamaño como la posición del marco de unión del motivo, con respecto a los extremos N y C terminales, para los ligandos del péptido de clase II.

Esta heterogeneidad aumentada de los ligandos del péptido de HLA clase II se debe a la estructura del surco de unión de la molécula de HLA clase II que, a diferencia de su contraparte de clase I, está abierta en ambos extremos. El análisis cristalográfico de los complejos de HLA clase II DRB*0101-péptido mostró que los residuos que ocupan la posición 1 y posición 6 de los péptidos complejados con DRB*0101 comprometen dos sitios complementarios en las moléculas DRBa*0101, con la posición P1 que corresponde al residuo de anclaje más crítico y el sitio hidrófobo más profundo (ver, por ejemplo, Madden, *Ann. Rev. Immunol.* 13:587 (1995)). Otros estudios también han señalado a la posición P6 como un residuo de anclaje crucial para la unión a otras diversas moléculas de DR.

En consecuencia, los péptidos de la presente invención se identifican con cualquiera de varios motivos de aminoácidos específicos para HLA clase I o II (ver, por ejemplo, Tablas I-III de USSN 09/226,775, y 09/239,043). Si la presencia del motivo corresponde a la capacidad de unir a varios antígenos de HLA específicos del alelo se denomina como un supermotivo. Las moléculas de HLA específicas del alelo que se unen a los péptidos que poseen un supermotivo de aminoácido particular se denominan colectivamente como un "supertipo" de HLA.

Análogos del péptido estimulador de la respuesta inmune

En general, las respuestas de CTL y HTL no se dirigen contra todos los epitopos posibles. Más bien, ellos están restringidos a unos pocos determinantes "inmunodominantes" (Zinkemagel et al., *Adv. Immunol.* 27: 5159 (1979); Bennink et al., *J. Exp. Med.* 168:1935-1939 (1988); Rawle et al., *J. Immunol.* 146: 3977-3984 (1991)). Se ha reconocido que la inmunodominancia (Benacerraf et al., *Science* 175: 273-279 (1972)) se podría explicar por la capacidad de un epitopo dado de unirse selectivamente a una proteína de HLA particular (teoría de selección determinante) (Vitiello et al., *J. Immunol.* 131:1635 (1983)); Rosenthal et al., *Nature* 267: 156-158 (1977)), o son reconocidos selectivamente por la especificidad del TCR existente (receptor celular T) (teoría del repertorio) (Klein, *Immunology, The Science of Self on self Discrimination*, pp. 270-310 (1982)). Se ha demostrado que factores adicionales, en mayor parte ligados a los eventos de procesamiento, también pueden cumplir un papel clave en el establecimiento, más allá de la inmunogenicidad estricta, de cuál de los diversos determinantes potenciales se presentará como inmunodominante (Sercarz et al., *Annu. Rev. Immunol.* 11:729-766 (1993)).

El concepto de dominancia y subdominancia es relevante para la inmunoterapia de las enfermedades infecciosas y cáncer. Por ejemplo, en el curso de la enfermedad viral crónica, puede ser importante el reclutamiento de epitopos subdominantes para la eliminación exitosa de la infección, especialmente si las especificidades de CTL o HTL dominantes se han inactivado por tolerancia funcional, supresión, mutación de virus y otros mecanismos (Franco et al., *Curr. Opin. Immunol.* 7:524-531 (1995)). En el caso del cáncer y los antígenos tumorales, los CTL que reconocen al menos algunos de los péptidos de unión de afinidad más alta se podrían inactivar funcionalmente. Los péptidos de afinidad de unión más baja se reconocen con preferencia en estos momentos y en consecuencia se pueden preferir en las vacunas anti-cáncer terapéuticas o profilácticas.

En particular, se ha observado que un número significativo de epitopos derivados de antígenos asociados con tumores no virales conocidos (TAA) se unen a HLA clase I con afinidad intermedia (IC50 en el intervalo de 50-500 nM). Por ejemplo, se ha hallado que 8 de 15 péptidos TAA conocidos reconocidos por los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) o CTL se unen en el intervalo de 50-500 nM. (Estos datos están en contraste con las estimaciones de que 90% de los antígenos virales conocidos se unieron con moléculas de HLA de clase I con IC50 de 50 nM o menos, mientras que solo aproximadamente 10% se unieron en un intervalo de 50-500 nM (Sette et al., *J. Immunol.*, 153:558-5592 (1994)). En el establecimiento del cáncer este fenómeno se debe probablemente a la eliminación, o inhibición funcional de los CTL que reconocen varios de los péptidos de unión más alta, presumiblemente debido a los eventos de tolerización de las células B.

Sin pretender estar ligado por la teoría, se considera que ya que las células T para los epitopos dominantes se pueden haber suprimido clonalmente, la selección de los epitopos subdominantes puede permitir el reclutamiento de las células T existentes, que a continuación conducirá a una respuesta terapéutica o profiláctica. Sin embargo, la unión de las moléculas de HLA a los epitopos subdominantes a menudo es menos vigorosa que la de los dominantes. Por consiguiente, se necesita poder modular la afinidad de unión de los epitopos inmunogénicos particulares para una o más moléculas de HLA, y de este modo modular la respuesta inmune inducida por el péptido, por ejemplo para preparar péptidos análogos que inducen una respuesta más vigorosa. Esta capacidad puede aumentar mucho la utilidad de las vacunas basadas en péptido y los agentes terapéuticos.

En consecuencia, si bien los péptidos con reactividad cruzada adecuada entre todos los alelos de una superfamilia se identifican por los procedimientos de detección descritos anteriormente, la reactividad cruzada no siempre es tan completa como sea posible y en ciertos casos pueden ser útiles los procedimientos para aumentar la reactividad cruzada de los péptidos; más aún, tales procedimientos también se pueden usar para modificar otras propiedades de los péptidos tales como afinidad de unión o estabilidad del péptido. Habiendo establecido las reglas generales que rigen la reactividad cruzada de los péptidos para los alelos de HLA dentro de un motivo o supermotivo dado, se puede realizar la modificación (es decir, equivalente) de la estructura de los péptidos de interés particular a fin de obtener una capacidad de unión a HLA más amplia (o modificada de otro modo). Más específicamente, los péptidos que exhiben los patrones de reactividad cruzada más amplia, se pueden producir de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Los presentes conceptos relacionados con la generación de análogos se exponen con mayor detalle en el documento USSN 09/226.775 en trámite.

En breves palabras, la estrategia empleada utiliza los motivos o supermotivos que correlacionan con la unión a ciertas moléculas de HLA clase I y II. Los motivos o supermotivos se definen por tener anclajes primarios, y en muchos casos anclajes secundarios (ver Tablas I-III del documento USSN 09/226,775). Los péptidos análogos se pueden crear por la sustitución de residuos de aminoácidos en el anclaje primario, anclaje secundario, o en las posiciones de los anclajes primario y secundario. En general, los análogos se obtienen para los péptidos que ya portan un motivo o supermotivo. Los residuos del anclaje secundario preferidos de los supermotivos y motivos que se han definido para los péptidos de unión de HLA clase I y clase II se muestran en la Tablas II y III, respectivamente, del documento USSN 09/226.775.

Para numerosos motivos o supermotivos de acuerdo con la invención, se definen los residuos que son perjudiciales para la unión a las moléculas de HLA específicas del alelo o miembros de los supertipos de HLA que se unen al respectivo motivo o supermotivo (ver Tablas II y III del documento USSN 09/226.775). Por consiguiente, la eliminación de tales residuos que son perjudiciales para la unión se puede realizar de acuerdo con los procedimientos descritos en esta. Por ejemplo, en el caso del supertipo A3, cuando todos los péptidos que tienen tales residuos perjudiciales se eliminan de la población de péptidos analizados, la incidencia de reactividad cruzada aumenta de 22% a 37% (I., Sidney et al., Hu. Immunol. 45:79 (1996)). En consecuencia, una estrategia para aumentar la reactividad cruzada de los péptidos dentro de un supermotivo dado es simplemente suprimir uno o más de los residuos perjudiciales presentes dentro de un péptido y sustituir un residuo "neutro" pequeño tal como Ala (que puede no influir en el reconocimiento de las células T del péptido). Se espera una probabilidad aumentada de reactividad cruzada si, junto con la eliminación de residuos perjudiciales dentro de péptido, se insertan residuos "preferidos" asociados con unión de alta afinidad a una molécula de HLA específica del alelo o a múltiples moléculas de HLA dentro de una superfamilia.

Para asegurar que un péptido análogo, cuando se usa como una vacuna, induce realmente una respuesta de CTL en el epitopo nativo *in vivo* (o, en el caso de los epitopos de clase II, una falla para inducir las células T auxiliares que reacciona en forma cruzada con los péptidos tipo salvaje), el péptido análogo se puede usar para inmunizar las células T *in vitro* de individuos del alelo de HLA apropiado. A partir de este momento, se evalúa la capacidad de las células inmunizadas de inducir la lisis de las células sensibilizadas con el péptido de tipo salvaje. En los sistemas de clase I y clase II será conveniente usar como dianas, las células que han sido infectadas o transfectadas con los genes apropiados para establecer si el antígeno producido en forma endógena también es reconocido por las células T relevantes.

Otra realización de la invención es crear análogos de los péptidos de unión débil, para asegurar de este modo las cantidades adecuadas de ligadores celulares con reactividad cruzada. Los péptidos clase I que exhiben afinidades de unión de 500-50000 nM, y portan un residuo de anclaje primario aceptable pero subóptimo en una o ambas posiciones se pueden "fijar" por la sustitución de los residuos de anclaje preferidos de acuerdo con el supertipo respectivo. Los péptidos análogos posteriormente se pueden analizar para determinar la actividad de unión cruzada.

Otra realización para generar análogos de péptidos efectivos involucra la sustitución de residuos que presentan un impacto adverso sobre la estabilidad o solubilidad del péptido en, por ejemplo, un ambiente líquido. Esta sustitución puede ocurrir en cualquier posición del epitopo del péptido. Por ejemplo, una cisteína (C) se puede sustituir a favor de ácido gamma-amino butírico. Debido a su naturaleza química, la cisteína tiene propensión a formar puentes disulfuro y alterar suficientemente el péptido en forma estructural de modo que se reduce la capacidad de unión. La sustitución con ácido gamma-amino butírico de C no solo alivia este problema, sino que mejora realmente la capacidad de unión y unión cruzada en ciertos casos (Sette et al, In: Persistent Viral Infections (Ahmed & Chen, eds., 1998)). La sustitución de cisteína con ácido gamma-amino butírico puede ocurrir en cualquier residuo de un epitopo del péptido, es decir, en posiciones de anclaje o no anclaje.

Vectores de expresión y construcción de un minigén

Los vectores de expresión de la invención contienen al menos un elemento promotor que es capaz de expresar una unidad de transcripción que codifica el antígeno de interés, por ejemplo, un epitopo de MHC clase I o un epitopo de MHC clase II y una secuencia dirigida a MHC en las células apropiadas de un organismo de modo que el antígeno se expresa y dirige a la molécula de MHC apropiada. Por ejemplo, si el vector de expresión se administra a un mamífero tal como un ser humano, un elemento promotor que funciona en una célula humano se incorpora en el vector de expresión. Un ejemplo de un vector de expresión útil para la expresar los epitopos de MHC de clase II fusionados a las secuencias dirigidas a los epitopos de MHC clase II y MHC de clase I descritos en la presente memoria es el vector de pEP2 descrito en el Ejemplo IV.

Esta invención depende de las técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que divulgan los procedimientos de uso generales en esta invención incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Krieglger, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994); Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait, ed., 1984); Kuipers, Nucleic acids Research 18(17):5197 (1994); Dueholm, J. Org. Chem. 59:5767-5773 (1994); Methods in Molecular Biology, volumen 20 (Agrawal, ed.); y Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-- Hybridization with Nucleic Acids Probes, por ejemplo, Parte I, capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" (1993)).

Los minigenes están compuestos de dos o varios epitopos diferentes (ver, por ejemplo, Tablas 1-8). El ácido nucleico que codifica los epitopos se ensambla en un minigén de acuerdo con técnicas estándares. En general, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los epitopos del minigén se aíslan mediante técnicas de amplificación con cebadores de oligonucleótido o se sintetizan químicamente. También se pueden usar técnicas de clonación recombinante cuando sea apropiado. Se seleccionan secuencias de oligonucleótidos que amplificar (cuando se usa PCR para ensamblar el minigén) o codificar (cuando se usan oligonucleótidos sintéticos para ensamblar el minigén) los epitopos deseados.

Las técnicas de amplificación que usan cebadores se usan normalmente para amplificar y aislar secuencias que codifican los epitopos de elección de ADN o ARN (ver patentes U.S. 4.683,195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)). Se pueden usar procedimientos tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y reacción en cadena de ligasa (LCR) para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos del epitopo directamente del ARNm, del ADNc, de las bibliotecas genómicas o bibliotecas de ADNc. Los sitios de endonucleasa de restricción se pueden incorporar en los cebadores. Los minigenes amplificados por la reacción de PCR se pueden purificar a partir de los geles de agarosa y se clonan en un vector apropiado.

Los oligonucleótidos sintéticos también se pueden usar para construir minigenes. Este procedimiento se realiza mediante una serie de oligonucleótidos superpuestos, que representan tanto las cadenas sentido como no sentido del gen. Estos fragmentos de ADN a continuación se aparean, ligan y clonan. Los oligonucleótidos que no están disponibles en el comercio se pueden sintetizar químicamente de acuerdo con el procedimiento de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito primero por Beaucage & Caruthers, Tetrahedron 13EP 1 078 092 B1Letts. 22:1859-1862 (1981), por medio de un sintetizador automatizado, como se describe en Van Devanter et. al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984). La purificación de los oligonucleótidos se realiza por electroforesis en gel de acrilamida nativo o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson & Reanier, J. Chrom. 255:137-149 (1983).

Los epitopos del minigén normalmente se subclonan en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, así como otras secuencias regulatorias tales como potenciadores y sitios de poliadenilación. Los promotores adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. y Ausubel et al. Los sistemas de expresión eucarióticos para las células de mamífero son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el comercio. Tales elementos promotores incluyen por ejemplo, citomegalovirus (CMV), virus de sarcoma Rous LTR y SV40.

El vector de expresión normalmente contiene una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales necesarios para la expresión del minigén en las células huésped. El casete de expresión atípico contiene de este modo un promotor unido operativamente al minigén y señales requeridas la poliadenilación eficiente del transcripto. Los elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores e intrones con sitios dadores y aceptores de empalme funcionales.

Además de una secuencia promotora, el casete de expresión también puede contener una región de terminación de la transcripción corriente abajo del gen estructural para proporcionar la terminación eficiente. La región de terminación se puede obtener del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener de genes diferentes.

El vector de expresión particular usado para transportar la información genética en la célula no es particularmente crítica. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucarióticas. Los vectores de expresión que contienen elementos regulatorios de los virus eucarióticos se usan normalmente en vectores de expresión eucarióticos, por ejemplo, vectores SV40, vectores del virus de papiloma, y vectores derivados del virus de Epstein Bar. Otros ejemplos de vectores eucarióticos incluyen pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permite la expresión de las proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus de sarcoma Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se muestran como efectivos para la expresión en células eucarióticas. En una realización, se usa el vector pEP2 en la presente invención.

Otros elementos que normalmente se incluyen en los vectores de expresión también incluyen un replicón que actúa en *E. coli*, un gen que codifica la resistencia a antibióticos para permitir la selección de las bacterias que albergan los plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de las secuencias eucarióticas. El gen de resistencia antibiótica particular elegido no es crítico, cualquiera de los diversos genes conocidos en la técnica son adecuados. Las secuencias procarióticas se eligen preferentemente de modo que no interfieran en la replicación del ADN en las células eucarióticas, si fuera necesario.

Administración *in vivo*

La invención también permite procedimientos para estimular una respuesta inmune por la administración de un vector de expresión de la invención a un individuo. La administración de un vector de expresión de la invención para estimular una respuesta inmune es ventajosa porque los vectores de expresión de la invención dirigen los epitopos de MHC a las moléculas de MHC, de este modo aumenta la cantidad de CTL y HTL activados por los antígenos

codificados por el vector de expresión.

En forma inicial, los vectores de expresión de la invención se identifican en ratón para determinar los vectores de expresión que tienen actividad óptima para estimular una respuesta inmune deseada. En consecuencia los estudios iniciales se llevan a cabo, cuando sea posible, con genes de ratón de las secuencias dirigidas a MHC. Los procedimientos de determinar la actividad de los vectores de expresión de la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la absorción de ³H-timidina para medir la activación de las células T y la liberación de ⁵¹Cr para medir la actividad de CTL como se describe a continuación en los Ejemplos II y III. Los experimentos similares a los descritos del Ejemplo IV se realizan para determinar los vectores de expresión que tienen actividad en la estimulación de una respuesta inmune. Los vectores de expresión que tienen actividad se analizan adicionalmente en seres humanos. Para evitar las potenciales respuestas inmunológicas adversas en las secuencias de ratón codificadas, los vectores de expresión que tienen actividad se modifican de modo que las secuencias dirigidas a MHC de clase II se derivan de los genes humanos. Por ejemplo, la sustitución de las regiones análogas de los homólogos humanos de los genes que contienen varias secuencias dirigidas a MHC de clase II se sustituyen en los vectores de expresión de la invención. Los ejemplos de tales homólogos humanos de los genes que contienen secuencias dirigidas a MHC clase II se muestran en las Figuras 12 a 17. Los vectores de expresión que contienen secuencias dirigidas a MHC clase II humanas, tales como las que se describen en el siguiente Ejemplo I, se analizan para determinar la actividad en la estimulación de una respuesta inmune en los seres humanos.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un vector de expresión de la invención. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, que incluyen solución salina regulada fisiológicamente, alcohol/soluciones acuosas u otros solventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites tales como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables.

Un portador farmacéuticamente aceptable puede contener compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar el vector de expresión o aumentar la absorción del vector de expresión. Tales compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, polipéptidos de bajo peso molecular, agentes antimicrobianos, gases inertes u otros estabilizantes o excipientes. Los vectores de expresión se pueden complejar adicionalmente con otros componentes tales como péptidos, polipéptidos y carbohidratos. Los vectores de expresión también se pueden complejar con partículas o perlas que se pueden administrar a un individuo, por ejemplo, por medio de una pistola de vacunación. Los expertos en la técnica pueden saber que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable, que incluye un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía administración del vector de expresión.

La invención además posibilita procedimientos de administración de una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de la invención para estimular una respuesta inmune. Los vectores de expresión se administran por procedimientos bien conocidos en la técnica como se describen por Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648 (1997)); Felgner et al. (Patente U.S. Núm. 5.580.859, expedida el 3 de diciembre de 1996); Felgner (Patente U.S. Núm. 5.703.055, expedida el 30 de diciembre de 1997); y Carson et al. (Patente U.S. Núm. 5.679.647, expedida el 21 de octubre de 1997), cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia. En una realización, el minigén se administra como ácido nucleico desnudo.

Una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de la invención se puede administrar para estimular una respuesta inmune en un sujeto por varias vías que incluyen, por ejemplo, oral, intravaginal, rectal, o parenteral, tales como intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intracisternal o por absorción pasiva o facilitada a través de la piel por medio de, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. Además, la composición se puede administrar por inyección, intubación o por vía tópica, esta última puede ser pasiva, por ejemplo, por aplicación directa de un ungüento o polvo, o activa, por ejemplo, mediante un spray nasal o inhalante. Un vector de expresión también se puede administrar como un spray tópico, en tal caso un componente de la composición es un propelente apropiado. La composición farmacéutica también se puede incorporar, si se desea, en liposomas, microesferas u otras matrices poliméricas (Felgner et al., Patente U.S. Núm. 5.703.055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III (2nd ed. 1993)). Los liposomas, por ejemplo, que consisten en fosfolípidos u otros lípidos, son portadores no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables que son relativamente simples de preparar y administrar.

Los vectores de expresión de la invención se pueden administrar en los espacios intersticiales de los tejidos de un organismo animal (Felgner et al., Patentes U.S. Núm. 5.580.859 y 5.703.055). La administración de los vectores de expresión de la invención al músculo es un procedimiento de administración particularmente efectivo, que incluye inyecciones intradérmicas y subcutáneas y la administración transdérmica. La administración transdérmica, tal como por iontoforesis, también es un procedimiento efectivo para administrar vectores de expresión de la invención al músculo. También se puede emplear la administración epidérmica de los vectores de expresión de la invención. La administración epidérmica involucra la irritación mecánica o química de la capa más externa de la epidermis para estimular una respuesta inmune al irritante (Carson et al., Patente U.S. Núm. 5.679.647).

Otros procedimientos efectivos de administrar un vector de expresión de la invención para estimular una respuesta

5 inmune incluye la administración en mucosa (Carson et al., Patente U.S. Núm. 5.679.647). Para la administración en la mucosa, el procedimiento de administración más efectivo incluye la administración intranasal de un aerosol apropiado que contiene el vector de expresión y una composición farmacéutica. Los supositorios y preparaciones tópicas también son efectivos para la administración de los vectores de expresión en los tejidos de la mucosa genital, vaginal y sitios oculares. En forma adicional, los vectores de expresión se pueden complejar con partículas y administrar con una pistola de vacunación.

10 La dosis que se administra es dependiente del procedimiento de administración y en general estará entre aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 200 µg. Por ejemplo, la dosis puede ser de aproximadamente 0,05 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, en particular aproximadamente 0,005-5 mg/kg. Una dosis efectiva se puede determinar, por ejemplo, por la medición de la respuesta inmune después de la administración de un vector de expresión. Por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos para los epitopos de MHC de clase II o epitopos de MHC de clase I codificados por el vector de expresión se puede medir por procedimientos bien conocidos en la técnica, que incluyen ELISA u otros ensayos inmunológicos. Además, la activación de las células T auxiliares o una respuesta de CTL se puede medir por procedimientos bien conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, al captación de ³H-timidina para medir la activación de las células T y la liberación de ⁵¹Cr para medir la actividad de CTL (ver los siguientes Ejemplos II y III).

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un vector de expresión de la invención se pueden administrar a los mamíferos, en particular seres humanos, para fines profilácticos o terapéuticos. Los ejemplos de enfermedades que se pueden tratar o prevenir por medio de los vectores de expresión de la invención incluyen la infección con VIH así como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

20 En aplicaciones terapéuticas, los vectores de expresión de la invención se administran a un individuo que ya padece de cáncer, enfermedad autoinmune o está infectado con un virus. Los que están en fase de incubación o fase aguda de la enfermedad se pueden tratar con vectores de expresión de la invención, que incluyen los que expresan todos los epitopos de MHC clase II universal, por separado o en conjunto con otros tratamientos, según sea apropiado.

25 En aplicaciones terapéuticas y profilácticas, las composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores de expresión de la invención se administran a un paciente en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune efectiva para un antígeno y para mejorar los signos o síntomas de una enfermedad. La cantidad del vector de expresión para administrar que es suficiente para mejorar los signos o síntomas de una enfermedad se denomina dosis terapéuticamente efectiva. La cantidad del vector de expresión suficiente para obtener una dosis terapéuticamente efectiva dependerá de la composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de la invención, la manera de administración, el estado y gravedad de la enfermedad tratada, el peso y estado general de salud del paciente y el criterio del médico que los prescribe.

30 Si bien la precedente invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo a los fines de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

35 El siguiente ejemplo se proporciona solo a modo de ilustración y no a manera de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se pueden cambiar o modificar para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplo I: Construcción de los vectores de expresión que contienen los epitopos de MHC de Clase II

Este ejemplo muestra la construcción de vectores de expresión que contienen epitopos de MHC de clase II que se pueden usar para dirigir antígenos a las moléculas de MHC clase II.

45 Los vectores de expresión que comprenden constructos de ADN se prepararon por medio de oligonucleótidos superpuestos, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y técnicas de biología molecular estándar (Dieffenbach & Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., 1989), cada una de los cuales incorpora en la presente memoria por referencia).

50 Para generar li de tipo salvaje de longitud completa, la cadena no variante de longitud completa se amplificó, clonó y secuenció y se usó en la construcción de los tres constructos de la cadena no variante. Excepto cuando sea indicado, la fuente de ADNc para todos los constructos listados a continuación fue ADNc de bazo de ratón Marathon-Ready de machos Balb/c (Clontech; Palo Alto CA). Los pares de cebadores fueron el oligonucleótido GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTC (SEQ ID NO: 40), que se designa murli-F y contiene un sitio NheI seguido por la secuencia de Kozak de consenso y el extremo 5' del ADNc li; y el oligonucleótido GGTACCTCACAGGGTGACTTGACCCAG (SEQ ID NO: 41), que se denomina murli-R y contiene un sitio KpnI y el extremo 3' de la secuencia codificadora li.

55 Para la reacción de PCR, se combinaron 5 µl de ADNc de bazo y 250 nM de cada cebador en una reacción de 100

5 μ l con 0,25 mM de cada dNTP y 2,5 unidades de Pfu polimerasa en buffer de Pfu polimerasa que contiene 10 mM de KCl, 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM de Tris-cloruro, pH 8,75, 2 mM de MgSO_4 , 0,1% de TRITON X-100 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina sérica bovina (BSA). Se usó una máquina de PCR Perkin/Elmer 9600 (Perkin Elmer; Foster City CA) y las condiciones de ciclado fueron: 130 ciclos de 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 52°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto. La reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa 1%, y se cortó el producto de 670 pares de bases, se purificó por centrifugación a través de un filtro Millipore Ultrafree-MC (Millipore; Bedford MA) y se clonó en pCR-Blunt de Invitrogen (San Diego, CA). Los clones individuales se identificaron por secuenciación y se usó un clon correcto (denominado bli#3) como molde para los constructos auxiliares.

10 Se prepararon los constructos de ADN que contienen las secuencias del epitopo pan DR y las secuencias dirigidas a MHC II derivadas de la proteína Ii. La proteína murina Ii se ha descrito previamente (Zhu & Jones, Nucleic Acids Res. 17:447-448 (1989)), que se incorpora en la presente memoria por referencia. En breves palabras, el IIPADRE contiene la secuencia Ii de longitud completa con PADRE que reemplaza precisamente la región CLIP. El constructo de ADN codifica los aminoácidos 1 a 87 de la cadena no variante, seguido por 13 aminoácido de la secuencia PADRE (SEQ ID NO:38) y el resto de la secuencia de ADN de la cadena no variante (aminoácidos 101-215). El constructo se amplificó en 2 mitades superpuestas que se unieron para producir el constructo final. Los dos cebadores usados para amplificar la mitad 5' fueron murli-F y el oligonucleótido CAGGGTCCAGGCAGCCACGAAGCTTGGCCACAGGTTTGGCAGA (SEQ ID NO:42), que se denomina IIPADRE-R. El cebador IIPADRE-R incluye los nucleótidos 303-262 de IIPADRE. La mitad 3' se amplificó con el cebador GGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATGTCCATGGATAAC (SEQ ID NO:43), que se denomina IIPADRE-F e incluye los nucleótidos 288-330 de IIPADRE; y murli-R. Las condiciones de PCR fueron las mismas que se describieron anteriormente, y las dos mitades se aislaron por electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente.

25 Se combinaron diez microlitros de cada producto de PCR en 100 μ l de una reacción de PCR con una temperatura de apareamiento de 50°C durante cinco ciclos para generar un molde de longitud completa. Se añadieron los cebadores murli-F y murli-R y se llevaron a cabo más ciclos. El producto IIPADRE de longitud completa se aisló, clonó, y secuenció como se describió anteriormente. Este constructo contiene el gen Ii murino con una secuencia del epitopo pan DR sustituido con la secuencia CLIP de Ii (Figura 1).

30 Se construyó un constructo de ADN, denominado I80T, que contiene el dominio citoplasmático, el dominio de transmembrana y parte del dominio luminal de Ii fusionado a una cadena de múltiples epitopos de MHC de clase II (Figura 2). En breves palabras, la cadena de múltiples epitopos de MHC de clase II se construyó con tres oligonucleótidos superpuestos (oligos). Cada oligo superpuesto a su vecino por 15 nucleótidos y el epitopo final de la cadena MHC clase II se ensambló por la extensión de los oligonucleótidos superpuestos entre conjuntos de reacciones por medio de PCR. Los tres oligonucleótidos fueron: oligo 1, nucleótidos 241-310,

CTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAA
CGAAGCTGGAAGAACCC (SEQ ID NO:44);

35 oligo 2, nucleótidos 364-295,

TTCTGGTCAGCAGAAAGAACAGGATAGGAGCGTTTGGAGGGCGATAAGCTGG
AGGGGTTCTTCCAGCTTC (SEQ ID NO:45);

y oligo 3, nucleótidos 350-42,

TTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCGTG
GCTGCCTGGACCCTGAAG (SEQ ID NO:46).

40 Para la primera reacción de PCR, 5 μg de oligos 1 y 2 se combinaron en 100 μ l de una reacción que contiene Pfu polimerasa. Se usó una máquina de PCR Perkin/Elmer 9600 y la temperatura de apareamiento usada fue 45°C. El producto de PCR se purificó en gel, y en una segunda reacción que contiene el producto de PCR se aparearon los oligos 1 y 2 con el oligo 3 y extendieron durante 10 ciclos antes de la purificación en gel del producto de longitud completa que se usará como un "mega-cebador".

45 El constructo I80T se obtuvo por la amplificación bli#3 con murli-F y el mega-cebador. Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 95°C durante 5 minutos, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 37°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto. Se añadió cebador Help-epR y se realizaron 25 ciclos adicionales con la

temperatura de apareamiento elevada a 47°C. El cebador Help-epR GGTACCTCAAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGGCA (SEQ ID NO:47) corresponde a los nucleótidos 438-405. El producto de 180T longitud completa se aisló, clonó, y secuenció como anteriormente.

5 El constructo 180T (Figura 2) codifica los residuos de aminoácidos 1 a 80 de li, que contiene el dominio citoplásmico, el dominio de transmembrana y parte del dominio luminal, fusionados a una cadena de múltiples epitopos de MHC de clase II que corresponden a: residuos de aminoácidos 323-339 de ovoalbúmina (IleSerGlnAlaValHisAlaAlaHisAlaGluLeuAsnGluAlaGlyArg; SEQ ID NO:48); residuos de aminoácidos 128 a 141 del antígeno del núcleo de HBV (aminoácidos ThrProProAlaTyrArgProProAsnAlaProlleLeu; SEQ ID NO: 49); residuos de aminoácidos 182 a 196 de HBV env (aminoácidos PhePheLeuLeuThrArglleLeuThr-35 IleProGlnSerLeuAsp; SEQ ID NO:50); y la secuencia de pan DR denominada SEQ ID NO:38.

10 Se generó un constructo de ADN que contiene el dominio citoplásmico, dominio de transmembrana y una porción del dominio luminal de li fusionados a la cadena del epitopo de MHC clase II que se muestra en la Figura 2 y los residuos de aminoácidos 101 a 215 de li que codifican la región de trimerización de li (Figura 3). Este constructo, denominado liThfull, codifica los primeros 80 aminoácidos de la cadena no variante seguidos por la cadena del epitopo de MHC clase II (que reemplaza los CLIP) y el resto de la cadena no variante (aminoácidos 101-21 S). En breves palabras, el constructo se generó como dos mitades superpuestas que se aparearon y extendieron por PCR para producir el producto final.

15 El extremo 5' de liThfull se obtuvo por la amplificación 180T con murli-F (SEQ ID NO:40) y Th-Pad-R. El cebador Th-Pad-R AGCGGCAGCCTTCAGGGTC (SEQ ID NO:51) corresponde a los nucleótidos 429-411. La mitad 3' se obtuvo por la amplificación de bli#3 con liPADRE-F y murli-R (SEQ ID NO: 41). El cebador liPADRE-F GGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATGTCCATGGATAAC (SEQ ID NO:52) corresponde a los nucleótidos 402-444. Cada producto de PCR se purificó en gel y se mezcló, a continuación se desnaturizó, apareó y extendió por cinco ciclos de PCR. Se añadieron los cebadores murli-F (SEQ ID NO: 40) y murli-R (SEQ ID NO:41) y se realizaron otros 25 ciclos. El producto de longitud completa se purificó en gel, clonó y secuenció.

20 Todos los constructos restantes que se describen a continuación se obtuvieron esencialmente de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 18. En breves palabras, los pares de cebadores 1F más 1R, designados a continuación para cada constructo específico, se usaron para amplificar la secuencia señal específica y contenían una cola de 15 pares de bases superpuestos idénticas al extremo 5' de la cadena del epitopo de MHC clase II. El par cebador Th-ova-F, ATCAGCCAGGCTGTGCACGC (SEQ ID NO:53), más Th-Pad-R (SEQ ID NO:51) se usaron para amplificar la cadena del epitopo de MHC clase II. Una superposición de 15 pares de bases y la cola de transmembrana y citoplásmica específica que contienen las señales de direccionamiento se amplificaron con los pares de cebadores 2F más 2R.

25 Los tres trozos de cada ADNc se amplificaron mediante las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 52°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto. Cada uno de los fragmentos se purificó en gel de agarosa, y la secuencia señal y los fragmentos de la cadena de MHC clase II se combinaron y unieron por cinco ciclos en una segunda PCR. Después de cinco ciclos, se añadieron los cebadores 1F y Th-Pad-R durante 25 ciclos adicionales y el producto de PCR se purificó en gel. Esta secuencia señal más el fragmento de la cadena del epitopo de MHC clase II se combinó con el fragmento de la cola de transmembrana más citoplásmica para la PCR final. Después de cinco ciclos, se añadieron los cebadores 1F más 2R durante 25 ciclos adicionales y el producto se purificó en gel, clonó y secuenció.

30 Se generó un constructo de ADN que contiene la secuencia señal kappa de la inmunoglobulina murina fusionada a la cadena del epitopo auxiliar T mostrado en la Figura 2 y los dominios de transmembrana y citoplásmicos de LAMP-1 (Figura 4) (Granger et al., J. Biol. Chem. 265: 12036-12043 (1990)), que se incorpora por referencia (LAPP-1 de ratón, Núm. de acceso GenBank M32015). Este constructo, denominado kappaLAMP-Th, contiene la secuencia señal kappa de la inmunoglobulina de ratón de consenso y se amplificó de un plásmido que contiene inmunoglobulina kappa de longitud completa representada en la figura 18. El cebador 1F usado fue el oligonucleótido denominado KappaSig-F, GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAG (SEQ ID NO:54).

El cebador 1R usado fue el oligonucleótido denominado Kappa-Th-R, CACAGCCTGGCTGATTCCTCTGGACCC (SEQ ID NO:55).

35 El cebador 2F usado fue el oligonucleótido denominado PAD/LAMP-F, CTGAAGGCTGCCGCTAACAACATGTTGATCCCC (SEQ ID NO:56). El cebador 2R usado fue el oligonucleótido denominado LAMP-CYTOR, GGTAC-15 CCTAGATGGTCTGATAGCC (SEQ ID NO:57).

40 Se generó un constructo de ADN que contiene la secuencia señal de H2-M fusionada a la cadena del epitopo de MHC clase II que se muestra en la Figura 2 y los dominios de transmembrana y citoplásmicos de H2-M (Figura 5). El gen H2-M de ratón se ha descrito previamente, Peleraux et al., Immunogenetics 43:204-214 (1996)), y se incorpora en la presente memoria por referencia. Este constructo se denominó H2M-Th y se construyó como se ilustra en la Figura 18. El cebador 1F usado fue el oligonucleótido denominado H2-Mb-1F, GCC GCT AGC GCC GCC ACC ATG GCT GCA CTC TGG (SEQ ID NO:58). El cebador 1R usado fue el oligonucleótido denominado H2-Mb-1R, CAC

AGC CTG GCT GAT CCC CAT ACA GTG CAG (SEQ ID NO:59). El cebador 2F usado fue el oligonucleótido denominado H2-Mb-2F, CTG AAG GCT GCC GCT AAG GTC TCT GTG TCT (SEQ ID NO:60). El cebador 2R usado fue el oligonucleótido denominado H2-Mb-2R, GCG GGT ACC CTA ATG CCG TCC TTC (SEQ ID NO:61).

5 Se generó el constructo de ADN que contiene la secuencia señal de H2-DO fusionada a la cadena del epitopo de MHC clase II que se muestra en la Figura 2 y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de H2-DO (Figura 6). El gen H2-DO de ratón se ha descrito previamente (Larhammar et al., J. Biol. Chem. 260: 14111-14119 (1985)), el cual se incorpora en la presente memoria por referencia (Acceso GenBank Núm. M19423). Este constructo, denominado H2O-Th, se construyó como se ilustra en la Figura 18. El cebador 1F usado fue el oligonucleótido denominado H2-Ob-1F, GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG30 GGC GCT GGG AGG (SEQ ID NO:62). El cebador 10 1R usado fue el oligonucleótido denominado H2- Ob-1R, TGC ACA GCC TGG CTG ATG GAA TCC AGC CTC (SEQ ID NO:63). El cebador 2F usado fue el oligonucleótido denominado H2-Ob-2F, CTG AAG GCT GCC GCT ATA CTG AGT GGA GCT (SEQ ID NO:64). El cebador 2R usado fue el oligonucleótido denominado H2-Ob-2R, GCC GGT ACC TCA TGT GAC ATG TCC CG (SEQ ID NO:65).

15 Se genera el constructo de ADN que contiene una secuencia del epitopo pan DR (SEQ ID NO:38) fusionada al extremo amino-terminal de la proteína de la matriz de la gripe (Figura 7). Este constructo, denominado PADRE-matriz de gripe, contiene el epitopo de MHC clase II PADRE universal fijado al extremo amino terminal de la secuencia codificadora de la matriz de la gripe. El constructo se obtiene por medio de un cebador largo en el cebador del extremo 5'. El cebador del extremo 5' es el oligonucleótido GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCGCTATGA 20 GTCTTCTAACGAGGTCGA (SEQ ID NO: 66). cebador del extremo 3' es el oligonucleótido TTCACTTGAATCGCTGCATCTGCACCCCA40 (SEQ ID NO:67). El virus de la gripe del America Type Tissue Collection (ATCC) se usa como una fuente para región codificadora de la matriz (Perdue et al. Science 279: 393-396 (1998)), que se incorpora en la presente memoria por referencia (Acceso GenBank Núm. AF036358).

25 Se generó un constructo de ADN que contiene una secuencia del epitopo pan DR (SEQ ID NO: 38) fusionada al extremo amino terminal del antígeno de HBVS (Figura 8). Este constructo se denomina PADRE-HBV-s y se generó por el apareamiento de dos oligonucleótidos superpuestos para añadir PADRE en el extremo amino terminal del antígeno de superficie de la hepatitis B (Michel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7708-7712 (1984); Michel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5307-5311 (1995)), cada uno de los cuales incorpora en la presente memoria por referencia. Un oligonucleótido fue GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAGTTCG 30 GGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTC (SEQ ID NO:68). NO: El segundo oligonucleótido fue CTCGAGAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGGCAGCCACGAACTTGGCCATGGTGGCGGCG (SEQ ID NO: 69). Cuando se aparearon, los oligos tienen extremos cohesivos NheI y XhoI. Los oligos se calentaron a 100°C y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente para aparearse. Un ligamiento de tres partes unió PADRE con un fragmento de XhoI-KpnI que contiene el antígeno HBV-s en los sitios NheI más KpnI del vector de expresión.

35 Se generó un constructo de ADN que contiene la secuencia señal de Ig- α fusionada a la cadena del epitopo de MHC clase II que se muestra en la Figura 2 y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de Ig- α (Figura 9). El gen de Ig- α de ratón se ha descrito previamente (Kashiwamura et al., J. Immunol. 145:337-343 (1990)), que se incorpora en la presente memoria por referencia (Acceso GenBank Núm. M31773). Este constructo, denominado Ig-alfaTh, se construyó como se ilustra en la Figura 18. El cebador 1F usado fue el oligonucleótido denominado Ig alfa-1F, GCG 40 GCT AGC GCC GCC ACC ATG CCA GGG GGT CTA (SEQ ID NO: 70). El cebador 1R usado fue el oligonucleótido denominado Igalfa-1R, GCA CAG CCT GGC TGA TGG CCT GGC ATC CGG (SEQ ID NO:71). El cebador 2F usado fue el oligonucleótido denominado Igalfa-2F, CTG AAG GCT GCC GCT GGG ATC ATC TTG CTG (SEQ ID NO:72). El cebador 2R usado fue el oligonucleótido denominado Igalfa-2R, GCG GGT ACC TCA TGG CTT TTC CAG CTG (SEQ ID NO:73).

45 Se generó un constructo de ADN que contiene la secuencia señal de Ig- β fusionada a la cadena de MHC clase II que se muestra en la Figura 2 y los dominios de transmembrana y citoplasmáticos de Ig- β (Figura 10). La secuencia de Ig- β es el gen B29 de ratón y se ha descrito previamente (Hermanson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6890-6894 (1988)), el que se incorpora en la presente memoria por referencia (Acceso GenBank Núm. J03857). Este constructo, denominado Ig-betaTh, se construyó como se ilustra en la Figura 18. El cebador 1F usado fue el oligonucleótido denominado B29-1F (33 mer) GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG GCC ACA CTG GTG (SEQ ID 50 NO: 74). El cebador 1R usado fue el oligonucleótido denominado B29-1R (30 mer) CAC AGC CTG GCT GAT CGG CTC ACC TGA GAA (SEQ ID NO:75). El cebador 2F usado fue el oligonucleótido denominado B292F (30 mer) CTG AAG GCT GCC GCT ATT ATC TTG ATC CAG (SEQ ID NO: 76). El cebador 2R usado fue el oligonucleótido denominado B29-2R (27 mer), GCC GGT ACC TCA TTC CTG GCC TGG ATG (SEQ ID NO:77).

55 Se generó un constructo de ADN que contiene la secuencia señal de la secuencia señal de la inmunoglobulina kappa fusionada a la cadena del epitopo de MHC clase II que se muestra en la Figura 2 (Figura 11). Este constructo se denomina SigTh y se generó por medio del constructo kappaLAMP-Th (que se muestra en la Figura 4) y la amplificación con el par cebador KappaSig-F (SEQ ID NO:54) más Help-epR (SEQ ID NO:47) para crear SigTh. SigTh contiene la secuencia señal de la inmunoglobulina kappa fusionada a la Cadena del epitopo T auxiliar y 60 terminó con un codón de detención de la traducción.

Los constructos que codifican secuencias humanas que corresponden a los constructos descritos anteriormente que tienen las secuencias de ratón se preparan por la sustitución de las secuencias humanas con las secuencias de ratón. En breves palabras, para el constructo liPADRE, que corresponde a la Figura 1, los residuos de aminoácidos 1-80 de la secuencia del gen HLA-DR II humano (Figura 12) (Acceso GenBank Núm. X00497 M14765) se sustituye con las secuencias de ratón II, que se fusionan a PADRE, seguido por los residuos de aminoácidos 114-223 de la cadena no variante HLA-DR. Para el constructo 180T, que corresponde a la Figura 2, los residuos de aminoácidos 1-80 de la secuencia humana de II son seguidos por una cadena del epitopo de MHC clase II. Para el constructo liThfull, que corresponde a la Figura 3, los residuos de aminoácidos 1-80 de la secuencia humana de II, que se fusionan a una cadena del epitopo de MHC clase II, son seguidos por los residuos de aminoácidos 114-223 de la cadena no variante humana.

Para el constructo LAMP-Th, similar al de la Figura 4, la secuencia señal codificada por los residuos de los aminoácidos 1-19 (nucleótidos 11-67) de LAMP-1 humana (Figura 13) (Acceso GenBank Núm. J04182), que están fusionados a la cadena del epitopo de MHC clase II, son seguidos por la región de transmembrana (nucleótidos 1163-1213) y cola citoplásmica (nucleótidos 1214-1258) codificadas por los residuos de aminoácidos 380-416 de LAMP-1 humano.

Para el constructo HLA-DM-Th, que corresponde a la Figura 5, la secuencia señal codificada por los residuos de aminoácidos 1-17 (nucleótidos 1-51) de HLA-DMB humana (Figura 14) (Acceso GenBank Núm. U15085), que están fusionados a la cadena del epitopo de MHC clase II, son seguidos por la región de transmembrana (nucleótidos 646-720) y cola citoplásmica (nucleótidos 721-792) codificadas por los residuos de aminoácidos 216-263 de HLA-DMB humano.

Para el constructo HLA-DO-Th, que corresponde a la Figura 6, la secuencia señal codificada por los residuos de aminoácidos 1-21 (nucleótidos 1-63) de HLA-DO humano (Figura 15) (Acceso GenBank Núm. L29472 J02736 N00052), que se fusiona a la cadena del epitopo de MHC clase II, es seguido por la región de transmembrana (nucleótidos 685-735) y cola citoplásmica (nucleótidos 736-819) codificadas por los residuos de aminoácidos 223-273 de HLA-DO humano.

Para el constructo Ig-alfa, que corresponde a la Figura 9, la secuencia señal codificada por los residuos de aminoácidos 1-29 (nucleótidos 1-87) de Ig- α MB-1 humana (Figura 16) (Acceso GenBank Núm. U05259), que se fusiona a la cadena del epitopo de MHC clase II, es seguida por la región de transmembrana (nucleótidos 424-498) y cola citoplásmica (nucleótidos 499-6781) codificadas por los residuos de aminoácidos 142-226 de Ig- α MB-1 humana.

Para el constructo Ig-betaTh, que corresponde a la Figura 10, la secuencia señal codificada por los residuos de aminoácidos 1-28 (nucleótidos 17-100) de Ig- β B29 humana (Figura 17) (Acceso GenBank Núm. M80461), que se fusiona a la la cadena del epitopo de MAC clase II, es seguida por la región transmembrana (nucleótidos 500-547) y cola citoplásmica (nucleótidos 548-703) codificada por los residuos de aminoácidos 156-229 de human Ig- β .

El constructo SigTh que se muestra en la Figura 11 se puede usar en ratón y ser humano. De modo alternativo, una secuencia señal derivada de un gen humano apropiado que contiene una secuencia señal se puede sustituir con la secuencia kappa de inmunoglobulina de ratón en el kappa secuencia en el constructo SigTh.

El constructo de PADRE-matriz de gripe que se muestra en la Figura 7 y el constructo PADRE-HBVs que se muestra en la Figura 8 se pueden usar en ratón y ser humano.

Algunos de los constructos de ADN descritos anteriormente se clonaron en el vector pEP2 (Figura 19; SEQ ID NO:35). El vector pEP2 se construyó para contener promotores de CMV duales. El vector pEP2 usó el esqueleto de pADNc3,1 (-)Myc-His A de Invitrogen y pIRES1hyg de Clontech. Se realizaron cambios en ambos vectores antes de mover la unidad de transcripción CMV55 de pIRES1hyg en el vector pADNc modificado.

El vector pADNc3,1(-)Myc-HisA (<http://www.invitrogen.com>) se modificó. En breves palabras, se eliminó el fragmento Pvull (nucleótidos 1342-3508). Se cortó un fragmento BspHI que contiene el gen de resistencia a la ampicilina (nucleótidos 4404-5412). El gen de resistencia a la ampicilina se reemplazó con el gen de resistencia a kanamicina de pUC4K (GenBank1925 acceso #X06404). pUC4K se amplificó con el conjunto cebador: TCTGATGTTACATTGCACAAG (SEQ ID NO:78) (nucleótidos 1621-1601) y GCGCACTCATGATGCTCTGCCAGTGTACAACC (SEQ ID NO:79) (nucleótidos 682-702 más la adición de un sitio de restricción BspHI en el extremo 5'). El producto de PCR se digirió con BspHI y se ligó en el vector digerido con BspHI. Se suprimió la región entre el sitio PmeI del nucleótido 905 y el sitio EcoRV del nucleótido 947. El vector se digirió posteriormente con PmeI (cortes en nucleótido 1076) y Apal (cortes en el nucleótido 1004), se cargó Klenow en los extremos cohesivos y se ligó. El sitio KpnI del nucleótido 994 se suprimió por digestión con KpnI y se cargó en los extremos con ADN polimerasa Klenow, y se ligó. La secuencia del intrón A de CMV (Acceso GenBank M21295, nucleótidos 635-1461) se añadió por la amplificación del AAN CMV con el conjunto cebador: GCGTCTAGAGTAAGTAC CGCCTATAGACTC (SEQ ID NO: 80) (nucleótidos 635-655 más un sitio XbaI en el extremo 5') y CCGGCTAGCCTGCAGAAAAGACCCATGGAA (SEQ ID NO:81) (nucleótidos 1461-1441 más un sitio NheI en el extremo 3'). El producto de PCR se digirió con XbaI y NheI y se ligó en el sitio NheI del vector (nucleótido 895 del vector de pADNc original) de modo que el sitio NheI esté en el extremo 3' del intrón.

Para modificar el vector pIRES1hyg (Acceso GenBank U89672, Clontech), se suprimió el sitio KpnI (nucleótido 911) por corte y cargado con Klenow. El plásmido se cortó con NotI (nucleótido 1254) y XbaI (nucleótido 3196) y se insertó un oligo poliligador en el sitio. El poliligador se formó por el apareamiento de los dos siguientes oligos:

GGCCGCAAGGAAAAAATCTAGAGTCGGCCATAGACTAATGCCGGTACCG (SEQ ID NO:82)

5 y

CTAGCGGTACCGGCATTAGTCTATGGCCCGACTCTAGATTTTTTCCTTGC (SEQ ID NO:83). El plásmido resultante se cortó con HincII y el fragmento entre los sitios HincII 234 y 3538 se aisló y se ligó en el vector de pADNc modificado. Este fragmento contiene un promotor de CMV, intrón, poliligador, y señal de poliadenilación.

10 El fragmento pIRES1hyg y el fragmento de pADNc se combinaron para formar pEP2. El vector pADNc3,1 (-)Myc-His A se digirió parcialmente con PvuII para aislar un fragmento lineal con el corte corriente debajo de la señal de poliadenilación de pADNc (el otro sitio PvuII es el intrón de CMV). El fragmento HincII del vector pIRES1hyg modificado se ligó en el vector cortado PvuII. La señal de poliadenilación del pADNc derivado de la unidad de transcripción se eliminó por digestión con EcoRI (pADNc nucleótido 955) y XhoI (pIRES1hyg nucleótido 3472) y reemplazó con una secuencia de poliadenilación sintética. La señal de poliadenilación sintética se describió en Levitt et al., Genes and Development 3:1019-1025 (1989).

15 Dos oligos se aparearon para producir un fragmento que contenía un poliligador y señal de poliadenilación con extremos cohesivos EcoRI y XhoI. Los oligos fueron:

**AATTCGGATATCCAAGCTTGATGAATAAAAGATCAGAGCTCTAGTGATCTGTGT
GTTGGTTTTTTTGTGTGC (SEQ ID NO:84)**

y

20 **TCGAGCACACAAAAACCAACACACAGATCACTAGAGCTCTGATCTTTTTATT
CATCAAGCTTGGATATCCG (SEQ ID NO:85).**

El vector resultante se denomina pEP2 y contiene dos unidades de transcripción separadas. Ambas unidades de transcripción usan el mismo promotor de CMV pero cada uno contiene diferentes intrón, poliligador, y secuencias de poliadenilación.

25 El vector pEP2 contiene dos unidades de transcripción. La primera unidad de transcripción contiene el promotor de CMV inicialmente a partir de pADNc (nucleótidos 210-862 en la Figura 19), secuencia del intrón A CMV (nucleótidos 900-1728 en la Figura 19), sitio de clonación del poliligador (nucleótidos 1740-1760 en la Figura 19) y señal de poliadenilación sintética (nucleótidos 1764-1769 en la Figura 19). La segunda unidad de transcripción, que inicialmente se derivó de pIRES1hyg, contiene el promotor de CMV (nucleótidos 3165-2493 en la Figura 19), secuencia del intrón (nucleótidos 2464-2173 en la Figura 19), sitio de clonación del poliligador (nucleótidos 2126-2095 en la Figura 19) y señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (nucleótidos 1979-1974 en la Figura 19). El gen de resistencia a kanamicina está codificada en los nucleótidos 4965-4061 (Figura 19).

Los constructos de ADN descritos anteriormente se digirieron con NheI y KpnI y se clonaron en los sitios XbaI y KpnI de pEP2 (la segunda unidad de transcripción).

35 También se construyeron vectores adicionales. Para analizar el efecto de la co-expresión de los epitopos de MHC de clase I con los epitopos de MHC de clase II, se generó un inserto, denominado AOS, que contiene nueve epitopos de MHC de clase I. El inserto de AOS se construyó inicialmente en el vector pMIN.0 (Figura 20; SEQ ID NO:36). En breves palabras, inserto de AOS contiene nueve epitopos de MHC de clase I, seis restringidos de HLA-A2 y tres restringidos de HLA-A11, y el epitopo de MHC clase II universal PADRE. El vector pMIN.0 contiene epitopos de HBV, VIH y un epitopo de ovoalbúmina de ratón. Los epitopos de MHC de clase I aparecen en pMIN.0 en el siguiente orden:

secuencia señal kappa de Ig de ratón de consenso (pMIN. 0 residuos de aminoácidos 1-20, nucleótidos 16-81) MQVQIQLFLLLLWVPGSRG (SEQ ID NO:86) codificada por los nucleótidos ATG CAG GTG CAG ATC CAG AGC CTG TTT CTG CTC CTC CTG TGG GTG CCC GGG TCC AGA GGA (SEQ ID NO:87);

ES 2 371 432 T3

- HBV pol 149-159 (A11 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 21-31, nucleótidos 82-114) HTLWKAGILYK (SEQ ID NO: 88) codificada por los nucleótidos CAC ACC CTG TGG AAG GCC GGAATC CTG TAT AAG (SEQ ID NO:89);
- 5 epitopo de PADRE-MHC clase II universal (pMIN.0 residuos de aminoácidos 32-45, nucleótidos 115-153) AKFVAAW TLKAAA (SEQ ID NO:38) codificada por los nucleótidos GCC AAG TTC GTG GCT GCC TGG ACC CTG AAG GCT GCC GCT (SEQ ID NO:90);
- núcleo de HBV 18-27 (A2 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 46-55, nucleótidos 154-183) FLPSDFFPSV (SEQ ID NO:91) codificada por los nucleótidos TTC CTG CCT AGC GAT TTC TTT CCT AGC GTG (SEQ ID NO:92);
- 10 VIH env 120-128 (A2 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 56-64, nucleótidos 184-210) KLTPLCVTL (SEQ ID NO:93) codificada por los nucleótidos AAG CTG ACC CCA CTG TGC GTG ACC CTG (SEQ ID NO:94);
- HBV pol 551-559 (A2 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 65-73, nucleótidos 211-237) YMDDVVLGA (SEQ ID NO:95) codificada por los nucleótidos TAT ATG GAT GAC GTG GTG CTG GGA GCC (SEQ ID NO:96);
- 15 ovoalbúmina de ratón 257-264 (K b restringido) (pMIN. 0 residuos de aminoácidos 74-81, nucleótidos 238-261) SIINFEKL (SEQ ID NO:97) codificada por los nucleótidos AGC ATC ATC AAC TTC GAG AAG CTG (SEQ ID NO:98);
- HBV pol 455-463 (A2 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 82-90, nucleótidos 262-288) GLSRYVARL (SEQ ID NO:99) codificada por los nucleótidos GGA CTG TCC AGA TAC GTG GCT AGG CTG (SEQ ID NO:100);
- 20 VIH pol 476-84 (A2 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 91-99, nucleótidos 289-315) ILKEPVHGV (SEQ ID NO:25 101) codificada por los nucleótidos ATC CTG AAG GAG CCT GTG CAC GGC GTG (SEQ ID NO: 102);
- núcleo de HBV 141-151 (A11 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 100-110, nucleótidos 316-348) STLPETTVVRR (SEQ ID NO: 103) codificada por los nucleótidos TCC ACC CTG CCA GAG ACC ACC GTG GTG AGG AGA (SEQ ID NO:104);
- 25 VIH env 49-58 (A11 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 111-120, nucleótidos 349-378) TVYYGVVWVK (SEQ30 ID NO:105) codificada por los nucleótidos ACC GTG TAC TAT GGA GTG CCT GTG TGG AAG (SEQ ID NO:106);
- y HBV env 335-343 (A2 restringido) (pMIN.0 residuos de aminoácidos 121-129, nucleótidos 378-405) WLSLLVPFV (SEQ ID NO:107) codificada por los nucleótidos TGG CTG AGC CTG CTG GTG CCC TTT GTG (SEQ ID NO:108).
- 30

El vector pMIN.0 contiene un sitio de restricción KpnI (pMIN.0 nucleótidos 406-411) y un sitio de restricción NheI (pMIN.0 nucleótidos 1-6). El vector pMIN.0 contiene una secuencia de Kozak de consenso (nucleótidos 7-18) (GCCGCCACCATG; SEQ ID NO: 109) y secuencia señal de la cadena liviana de Ig kappa murina seguido por una cadena de 10 epitopos de MHC de clase I y un epitopo de MHC clase II universal. La secuencia de pMIN.0 codifica un marco de lectura abierto fusionado a la marca del epitopo del anticuerpo Myc e His codificado por el vector pADNc 3,1 Myc-His. El vector pMIN.0 se construyó con ocho oligonucleótidos:

35

Oligo Min1

**GAGGAGCAGAAACAGGCTCTGGATCTGCACCTGCATTCCCATGGTGGCGGCGC
TAGCAAGCTTCTTGCGC (SEQ ID NO:110);**

Oligo Min2

**CCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCGGGTCCAGAGGACACACCCTGTGGA
AGGCCGGAATCCTGTATA (SEQ ID NO:111);**

40

Oligo Min3

**TCGCTAGGCAGGAAAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGGCAGCCACGAACTTGG
CCTTATACAGGATTCCGG (SEQ ID NO:112);**

Oligo Min4

CTTTCCTGCCTAGCGATTTCTTTCCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGA
CCCTGTATATGGATGAC (SEQ ID NO:113);

Oligo Min5

CGTACCTGGACAGTCCCAGCTTCTCGAAGTTGATGATGCTGGCT
CCCAGCACCCAGTCATCCATATACAG (SEQ ID NO:114);

5 Oligo Min6

GGACTGTCCAGATACGTGGCTAGGCTGATCCTGAAGGAGCCTGTGCACGGCGT
GTCCACCCTGCCAGAGAC (SEQ ID NO:115);

Oligo Min7

GCTCAGCCACTTCCACACAGGCACTCCATAGTACACGGTCCTCCTCACCACGG
TGGTCTCTGGCAGGGTG (SEQ ID NO:116);

Oligo Min8

GTGGAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGGGTACCTGATCTAGAGC
(SEQ ID NO:117).

10

Los cebadores adicionales fueron cebador flanqueante 5', GCG CAA GAA GCT TGC TAG CG (SEQ ID NO: 118) y cebador flanqueante 3', GCT CTA GAT CAG GTA CCC CAC (SEQ ID NO:119).

15

La construcción del minigén original pMIN.0 se llevó a cabo por medio de ocho oligos superpuestos que promedian aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, que se sintetizaron y purificaron por Operon Technologies Inc. Cada oligo está superpuesto a su vecino en 15 nucleótidos, el minigén multi-epitopo final se ensambló por la extensión de los oligos superpuestos en tres conjuntos de reacciones mediante PCR (Ho et al., Gene 77:51-59 (1989).

20

Para la primera reacción de PCR, 5 µg de cada uno de los dos oligos se aparearon y extendieron: 1+2, 3+4, 5+6, y 7+8 se combinaron en reacciones de 100 µl que contienen 0,25 mM de cada dNTP y 2,5 unidades de Pfu polimerasa en buffer de Pfu polimerasa que contiene 10 mM de KCl, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 20 mM de Tris-cloruro, pH 8,75, 2 mM de MgSO₄, 0,1% de TRITON X-100 y 100 mg/ml de BSA. Se usó una máquina de PCR Perkin/ Elmer 9600 y la temperatura de apareamiento usada fue 5°C por debajo de la Tm calculada más baja de cada par cebador. Los productos diméricos de longitud completa se purificaron en gel y se mezclaron dos reacciones que contienen el producto de 1-2 y 3-4, y el producto de 5-6 y 7-8, se aparearon y extendieron durante 10 ciclos. La mitad de las dos reacciones se mezclaron posteriormente y se realizaron 5 ciclos de apareamiento y extensión antes de añadir los cebadores flanqueantes para amplificar el producto de longitud completa durante 25 ciclos adicionales. El producto de longitud completa se purificó en gel y se clonó en pCR-romo (Invitrogen) y los clones individuales se identificaron por secuenciación. El inserto Min se aisló como un fragmento Nhe-KpnI y se clonó en los mismos sitios de pADNc3,1 (-)/Myc-His A (Invitrogen) para la expresión. La proteína de Min contiene las marcas del epitopo de anticuerpo Myc e His en su extremo carboxilo terminal.

30

Para todas las reacciones de PCR descritas, se realizó un total de 30 ciclos por medio de Pfu polimerasa y las siguientes condiciones: 95°C durante 15 segundos, temperatura de apareamiento for 30 segundos, 72°C durante un minuto. La temperatura de apareamiento usada fue 5°C por debajo de la Tm calculada más baja de cada par de cebadores.

35

Se realizaron tres cambios en pMIN.0 para producir pMIN.1 (Figura 21; SEQ ID NO: 37, también mencionado como pMIN-AOS). Se eliminó el epitopo ova de ratón, el residuo de anclaje de la alanina de posición 9 (#547) de HBV pol 551-560 se convirtió en una valina que aumentó 40 veces la afinidad de unión *in vitro* y se introdujo un codón de detención de la traducción en el extremo de la secuencia codificadora multi-epitopo. Los cambios se realizaron por la

amplificación de dos fragmentos superpuestos y la combinación de ellos para producir el producto de longitud completa.

La primera reacción usó el cebador T7 del vector 5' pADNc y el cebador MinovaR (nucleótidos 247-218) TGGACAGTCCCCTCCCAGCACCACGTCAT (SEQ ID NO: 120). La mitad 3' se amplificó con los cebadores: Min-ovaF (nucleótidos 228-257) GCTGGGAGTGGGACTGTCCAGGTACGTGGC (SEQ ID NO:121) y Min-StopR (nucleótidos 390-361) GGTACCTCACAAAAGGGCACCAGCAGGC (SEQ ID NO:122)

Los dos fragmentos se purificaron en gel, mezclaron, desnaturalizaron, aparearon y cargaron con cinco ciclos de PCR. El fragmento de longitud completa se amplificó con los cebadores flanqueantes T7 y Min-Stop durante 25 ciclos más. El producto se purificó en gel, se digirió con NheI y KpnI y se clonó en pADNc3,1 para la secuenciación y expresión. El inserto de pMIN.1 se aisló como un fragmento NheI-KpnI y se clonó en pEP2 para obtener pEP2-AOS.

Ejemplo II: Ensayo para la activación de células T auxiliares

Este ejemplo muestra procedimientos para ensayar la actividad de las células T auxiliares. Un procedimiento para ensayar la actividad de las células T auxiliares usa células de bazo de un organismo inmunizado. En breves palabras, un sedimento de células de bazo se suspende con 2-3 ml de buffer de lisis de eritrocitos que contiene 8,3 g/litro de cloruro de amonio en 0,001 M de Tris-HCl, pH 7,5. Las células se incuban en buffer de lisis durante 3-5 min a temperatura ambiente con agitación en vórtex ocasional. Se añade un volumen en exceso de 50 ml de medio R10 a las células, y las células sedimentan. Las células se resuspenden y sedimentan una o dos veces más en medio R2 o medio R10.

El pellet celular se suspende en medio R10 y se cuenta. Si la suspensión celular se agrega, se elimina los agregados por filtración o se deja que los agregados decanten por gravedad. La concentración celular se lleva a 107/ml, y se añaden 100 µl de células de bazo a placas de parte inferior plana de 96 pocillos.

Se preparan diluciones del péptido apropiado, tal como epitopo pan DR (SEQ ID NO:145), en medio R1030 a razón de 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 µg/ml, y se añaden 100 µl de péptido a los pocillos duplicados o triplicados de las células de bazo. La concentración de péptido final es 50, 5, 0,5, 0,05 y 0,005 µg/ml. Los pocillos control reciben 100 µl de medio R10.

Las placas se incuban durante 3 días a 37°C. Después de 3 días, se añaden 20 µl de 50 µCi/ml ³H-timidina por pocillo. Las células se incuban durante 18-24 horas y posteriormente se recolectan en filtros de fibra de vidrio. La incorporación de ³H-timidina en el ADN de las células proliferantes se mide en un contador beta.

Un segundo ensayo para determinar actividad de las células T auxiliares usa células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se estimulan *in vitro* como se describió en Alexander et al., *supra* y Sette (WO 95/07,707), adaptado de Manca et al., J. Immunol, 146:1964-1971 (1991), que se incorpora en la presente memoria por referencia. En breves palabras, los PBMC se recolectan de donadores sanos y se purifican sobre Ficoll-Plaque (Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ). Los PBMC se siembran en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos a razón de 4 x 10⁶ células/ml. Los péptidos se añaden a una concentración final de 10 µg/ml. Los cultivos se incuban a 37°C en 5% de CO₂.

En el día 4, se añade interleuquina-2 recombinante (IL-2) a una concentración final de 10 ng/ml. Los cultivos se alimentan cada 3 días por la aspiración de 1 ml de medio y el reemplazo con medio fresco que contiene IL-2. Se realizan dos estimulaciones adicionales de las células T con antígeno en aproximadamente los días 14 y 28. Las células T (3 x 10⁵/pocillo) se estimulan con péptido (10 µg/ml) por medio de células PBMC autólogas (2 x 10⁶ células irradiadas/pocillo) (irradiadas con 7500 rads) como las células que presentan antígeno en un total de tres pocillos de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos. Además, en el día 14 y 28, se determinan las respuestas de las células T proliferativas en las siguientes condiciones: 2 x 10⁴ células T/pocillo; 1 x 10⁵ PBMC irradiados/pocillo como las células que presentan antígeno; concentración de péptido que varía entre 0,01 y 10 µg/ml de concentración final. La proliferación de las células T se mide 3 días después por la adición de ³H-timidina (1 µCi/pocillo) 18 horas antes de recolectar las células. Las células se recolectan en filtros de vidrio y se mide la incorporación de ³H-timidina en el contador de placa beta. Estos resultados demuestran procedimientos para ensayar la actividad de las células T auxiliares por la medición de la incorporación de ³H-timidina.

Ejemplo III: Ensayo para la respuesta de linfocitos T citotóxicos

Este ejemplo muestra un procedimiento para ensayar la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Una respuesta de CTL se mide esencialmente como se describió previamente (Vitiello et al., Eur. J. Immunol. 27:671-678 (1997), que se incorpora en la presente memoria por referencia). En breves palabras, después de aproximadamente 10-35 días posteriores a la inmunización con ADN, los esplenocitos de un animal se aíslan y cocultivan a 37°C con blastos singeneicos de LPS revestidos con péptido, irradiados (3000 rad) (1 x 10⁶ a 1,5 x 10⁶ células/ml) en 10 ml de R10 en matraces T25. Los blastos LP se obtienen por la activación de esplenocitos (1 x 10⁶ a 1,5 x 10⁶ células/ml) con 25 µg/ml de lipopolisacáridos (LPS) (Sigma cat. no. L-2387; St. Louis, MO) y 7 µg/ml de dextran sulfato (Pharmacia Biotech) en medio R10 en matraces T75 durante 3 días a 37°C. Los linfoblastos posteriormente se resuspenden a una concentración de 2,5 x 10⁷ a 3,0 x 10⁷/ml, se irradian (3000 rad), y se revisten con los péptidos apropiados (100

µg/ml) durante 1 h a 37°C. Las células se lavan una vez, se resuspenden en el medio R10 a la concentración deseada y se añaden a la preparación de células receptoras. Los cultivos se ensayan para determinar actividad citolítica en el día 7 en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr.

- 5 En el ensayo de liberación de ⁵¹Cr, las células diana se marcan durante 90 min a 37°C con 150 µl de ⁵¹cromato de sodio (⁵¹Cr) (New England Nuclear; Wilmington DE), se lavan tres veces y se resuspenden en la concentración apropiada en medio R10. En el ensayo, 10⁴ células diana se incuban en presencia de diferentes concentraciones de células efectoras en un volumen final de 200 µl en placas de parte inferior en U de 96 pocillos en presencia o ausencia de 10 µg/ml péptido. Los sobrenadantes se extraen después de 6 h a 37°C, y se determina el por ciento de lisis específica por la fórmula: por ciento de lisis específica = 100 x10 (liberación experimental – liberación espontánea), (liberación máxima - liberación espontánea). Para facilitar la comparación de respuestas de diferentes experimentos, los datos de por ciento de liberación se transforman a las 30 unidades líticas por 10⁶ células (LU30/10⁶), con 1 LU30 definido como el número de células efectoras requeridas para inducir 30% de lisis de 10⁴ células diana en un ensayo de 6 horas. Los valores LU representan el LU30/10⁶ obtenido en presencia de péptido menos LU30/10⁶ en ausencia del péptido. Estos resultados demostraron procedimientos para ensayar la actividad de CTL por la medición de la liberación de ⁵¹Cr de las células.

Ejemplo IV: Proliferación de células T en ratones inmunizados con los vectores de expresión que codifican los epitopos de MHC Clase II y secuencias dirigidas a MHC Clase II

Este ejemplo demuestra que los vectores de expresión que codifican epitopos de MHC de clase II y secuencias dirigidas a MHC Clase II son efectivos para activar las células T.

- 20 Los constructos usados en el ensayo de proliferación de células T se describen en el Ejemplo I y se clonaron en el vector pEP2, un vector de expresión conducido por CMV. Los péptidos usados para la estimulación *in vitro* de las células T son: Ova 323-339, ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 123); HBVcore128, TPPAYRPPNAPILF (SEQ ID NO: 124); HBVenv182, FLLTRILTIPQSLD (SEQ ID NO: 125); y PADRE, AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:38).

- 25 El ensayo de proliferación de células T se realizó esencialmente como se describió en el Ejemplo II. En breves palabras, ratones B6D2 F1 de 12 a 16 semanas (2 ratones por constructo) se inyectaron con 100 µg del vector de expresión indicado (50 µg por pata) en el músculo tibial anterior. Después de once días, los bazos se recolectaron de los ratones y se separaron en una suspensión celular única por homogenización en Dounce. Se contaron los esplenocitos y un millón de esplenocitos se incubaron en una placa de 96 pocillos. Cada muestra se realizó por triplicado. Se añadieron diez µg/ml del péptido correspondiente codificado por los vectores de expresión respectivos a cada pocillo. Un pocillo contenía esplenocitos sin péptido añadido para control negativo. Las células se cultivaron a 30 37°C, 5% de CO₂ durante tres días.

- Después de tres días, se añadió un µCi de ³H-timidina a cada pocillo. Después de 18 horas a 37°C, las células se recolectaron en filtros de vidrio y se midió la incorporación de ³H en un contador de placa LKB R. Los resultados del ensayo de proliferación de células T se muestran en la Tabla 9. La proliferación de las células T específicas de antígeno se presenta como el índice de estimulación (SI); este se define como la relación de incorporación de ³H-timidina promedio en presencia de antígeno dividido por la incorporación de ³H-timidina en ausencia de antígeno.

- 40 El inmunógeno "PADRE + IFA" es un control positivo en el que se inyectó el péptido PADRE en adyuvante de Freund incompleto en los ratones y se comparó con la respuesta observada con la inyección de los constructos del epitopo de MHC clase II que contienen una secuencia PADRE. Como se muestra en la Tabla 9, la mayor parte de los vectores de expresión analizados fueron efectivos para activar la proliferación de las células T40 en respuesta a la adición del péptido PADRE. La actividad de varios vectores de expresión fue comparable con la que se observa con la inmunización con el péptido PADRE en adyuvante de Freund incompleto. Los vectores de expresión que contienen los epitopos de MHC clase I y clase II, pEP2-AOS y pADNc-AOS, también fueron efectivos para activar la proliferación de las células T en respuesta a la adición del péptido PADRE.

- 45 Estos resultados muestran que los vectores de expresión que codifican epitopos de MHC de clase II fusionados a una secuencia dirigida a MHC de clase II son efectivos para activar la proliferación de las células T y son útiles para estimular una respuesta inmune.

Ejemplo V: Ensayo *in vivo* mediante ratones transgénicos

A. Materiales y procedimientos

- 50 Los péptidos se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos de síntesis de fase sólida F-moc estándares que se ha descrito previamente (Ruppert et al., Cell 74:929 (1993); Sette et al., Mol. Immunol. 31:813 (1994)). La pureza del péptido se determinó por HPLC analítica de fase inversa y la pureza fue habitualmente >95%. La síntesis y purificación de la vacuna Theradigm- lipopéptido de HBV se describe en (Vitiello et al., J. Clin. Invest. 95:341 (1995)).

Ratones

- 55 Los ratones transgénicos HLA-A2.1 usados en este estudio fueron de la generación F1 derivados por cruzamiento

de ratones transgénicos que expresan un gen quimérico que consiste en los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ de HLA-A2.1 y el dominio $\alpha 3$ de H-2K^b con ratones SJL/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Esta cepa se mencionará de aquí en adelante como HLA-A2.1/K^b-H-2^{bxs}. La cepa HLA-A2.1/K^b transgénica original se generó con un ancestro C57BL/6 por medio del transgén y procedimientos descritos en (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173:1007 (1991)). Los ratones transgénicos HLA-A11/K^b usados en el presente estudio fueron idénticos a los que se describen en (Alexander et al., J. Immunol. 159:4753 (1997)).

Líneas celulares, purificación de MHC y ensayos de unión del péptido

Las células diana para los ensayos de citotoxicidad específica del péptido fueron células Jurkat transfectadas con el gen quimérico HLA-A2.1/K^b (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173:1007 (1991)) y las células tumorales 221 transfectadas con HLA-A11/K^b (Alexander et al., J. Immunol. 159:4753 (1997)).

Para medir la presentación de epitopos procesados en forma endógena, las células Jurkat-A2,1/k^b se transfectaron con los minigenes pMin.1 o pMin.2-GFP y posteriormente se analizaron en un ensayo de citotoxicidad contra las líneas CTL específicas del epitopo. Para la transfección, las células Jurkat-A2.1/K^b se resuspendieron a razón de 10⁷ células/ml y se añadieron 30 μ g de ADN a 600 μ l de suspensión celular. Después de la electroporación las células se incubaron en una cubeta de 0,4 cm a 0,25 kV, 960 μ Fd, en hielo durante 10 min y posteriormente se cultivaron durante 2 d en medio de cultivo RPMI. Las células se cultivaron posteriormente en medio que contiene 200 U/ml de higromicina B (Calbiochem, SanDiego CA) para seleccionar los transfectantes estables. Se usó FACS para enriquecer la fracción de células que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) de 15% a 60% (datos no mostrados).

Los procedimientos para medir la unión cuantitativa de los péptidos a las moléculas de HLA-A2.1 y A11 se describen en Ruppert et al., Cell 74:929 (1993); Sette et al., Mol. Immunol. 31:813 (1994); Alexander et al., J. Immunol. 159:4753 (1997).

Todas las líneas celulares tumorales y los CTL esplénicos de los ratones activados se cultivaron en medio de cultivo (CM) que consistió en medio RPMI 1640 con Hepes (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10% de FBS, 4 mM de L-glutamina, 5 X 10⁻⁵ M de 2-ME, 0,5 mM de piruvato de sodio, 100 μ g/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina.

Construcción de plásmidos de ADN multi-epitopo del minigén

Se construyeron pMIN.0 y pMIN.1 (es decir, pMIN-AOS) como se describió anteriormente y en USSN 60/085,751.

pMIN.1-No PADRE y pMin. 1-Anclaje. pMIN.1 se amplificó por medio de dos fragmentos superpuestos que posteriormente se combinaron para producir el producto de longitud completa. La primera reacción usó el cebador T7 del vector 5' pADNc y el cebador ATCGCTAGGCAGGAACCTTATACAGGATTCC (SEQ ID NO:126) para pMIN.1-No PADRE o TGGACAGTCCGGCTCCCAGCACACCGT (SEQ ID NO:127) para pMIN.1-Anclaje. La mitad 3' se amplificó con los cebadores TTCCTGCCTAGCGATTTC (SEQ ID NO:128) (No PADRE) o GCTGGGAGCCGGACTGTCCAGGTACGT (SEQ ID NO:129) (Anclaje) y Min-StopR. Los dos fragmentos generados de la amplificación de los extremos 5' y 3' se purificaron por gel, mezclaron, desnaturalizaron, aparearon y cargaron con cinco ciclos de PCR. El fragmento de longitud completa se amplificó adicionalmente con los cebadores flanqueantes T7 y Min-StopR durante 25 ciclos más.

pMIN.1-No Sig. La secuencia señal de Ig se suprimió de pMin.1 por la amplificación con el cebador GCTAGCGCCGCCACCATGCACACCCTGTGGAAGGC CGGAATC (SEQ ID NO: 130) y los cebadores pADNc rev (Invitrogen). El producto se clonó en pCR-romo y se secuenció.

pMIN.1-Switch. Tres fragmentos superpuestos se amplificaron de pMIN.1, se combinaron y extendieron. El fragmento 5' se amplificó con el cebador T7 del vector y el cebador primer GGGCACCAGCAGGCTCAGCCACACTCCCAGCACACGTC (SEQ ID NO: 131). El segundo fragmento superpuesto se amplificó con los cebadores AGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGATCCTGAAGGAGCCTGTGC (SEQ ID NO:132) y AGAGCCACGTACCTGGACAGTCCCTTCCACACA GCACTCCAT (SEQ ID NO:133). El cebador TGTCCAGGTACGTGGCTAGGCTGTGAGGTACC (SEQ ID NO: 134) y el cebador del vector pADNc rev (Invitrogen) se usaron para amplificar el tercer fragmento (3'). Los fragmentos 1, 2, y 3 se amplificaron y se purificaron por gel. Los fragmentos 2 y 3 se mezclaron, aparearon, amplificaron y se purificaron por gel. El fragmento 1 se combinó con el producto de 2 y 3, y se extendió, purificó en gen y se clonó en pADNc3.1 para la expresión.

pMin.2-GFP. La secuencia señal se suprimió de pMIN.0 por amplificación PCR con Min.O-No Sig-5' más los cebadores pADNc rev (Invitrogen) GCTAGCGCCGCCACCATGCACACCCTGTGGAAGGCCGGAATC (SEQ ID NO: 135). El producto se clonó en pCR-romo y se secuenció. El inserto que contiene el marco de lectura abierto del constructo de secuencia señal-multi-epitopo suprimido se cortó con NheI más HindIII y se ligó en los mismos sitios de pEGFPN1 (Clontech). Este constructo fusiona la región codificadora del constructo de la señal suprimida de pMIN.0 en el extremo N-terminal de la proteína fluorescente verde (GFP).

Inmunización de ratones

Para la inmunización con ADN, los ratones se pretrataron por la inyección de 50 μ l de 10 μ M de cardiotoxina (Sigma Chem. Co., #C9759) en forma bilateral en el músculo tibial anterior. Cuatro o cinco días después, se inyectaron 100 μ g de ADN diluidos en PBS en el mismo músculo.

5 Se descongeló Theradigm-lipopéptido HBV (10 mg/ml en DMSO) que estaba conservado a - 20°C, durante 10 min a 45°C antes de diluir a 1:10 (v/v) con PBS a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la adición de PBS, la suspensión de lipopéptido se agitó en vórtex vigorosamente y se inyectaron 100 μ l s.c. en la base de la cola (100 μ g/ratón).

10 Se analizó la inmunogenicidad de los epitopos individuales de CTL por la mezcla de cada epitopo de CTL (50 μ g/ratón) con el péptido del núcleo de HBV 128-140 (TPPAYRPPNAPIL (SEQ ID NO: 124), 140 μ g/ratón) que sirvió para inducir las células I-A^b-restringido-Th. El cóctel de péptido posteriormente se emulsionó en adyuvante de Freund incompleto (Sigma Chem. Co.) y se inyectaron 100 μ l de emulsión de péptido s.c. en la cola.

Cultivos de CTL y ensayos de citotoxicidad *in vitro*

15 Once a 14 días después de la inmunización, los animales se sacrificaron y se preparó una suspensión celular única de esplenocitos. Los esplenocitos de los animales activados con ADNc se estimularon *in vitro* con cada uno de los epitopos del péptido representados en el minigén. Los esplenocitos (2,5-3,0 X 10⁷/matraz) se cultivaron en matraces rectos de 25 cm² en presencia de 10 μ g/ml de péptido y 10⁷ células de bazo irradiadas que han sido activadas durante 3 días con LPS (25 μ g/ml) y dextran sulfato (7 μ g/ml). Los cultivos triplicados se estimularon con cada epitopo. Cinco días después, los cultivos se alimentaron con CM fresco. Después de 10 días de cultivo *in vitro*, 2-4 X 10⁶ de CTL de cada matraz se reestimularon con 10⁷ de esplenocitos activados con LPS/dextran sulfato tratados con 20 μ g/ml de péptido durante 60-75 min a 37°C, posteriormente se irradiaron 3500 rad. Los CTL se reestimularon en placas de 6 pocillos en 8 ml de CM libre de citoquina. Dieciocho horas después, los cultivos recibieron citoquinas contenidas en sobrenadante de esplenocitos activados con A (10-15% de concentración final, v/v) y se alimentaron o expandieron en el tercer día con CM que contiene 10-15% de precipitado de citoquina. Cinco días después de la reestimulación, se midió la actividad de CTL de cada cultivo por la incubación de cantidades variadas de CTL con 25 μ g/ml de células diana marcadas con ⁵¹Cr en presencia o ausencia de péptido. Para disminuir la citotoxicidad no específica de las células NK, también se añadieron células YAC-1 (ATCC) con una relación celular de YAC-1: diana marcadas con ⁵¹Cr de 20:1. Se midió la actividad CTL contra el epitopo Pol 551 de HBV por la estimulación de los esplenocitos activados con ADN *in vitro* con el péptido que contiene A nativo y se analiza para determinar actividad citotóxica contra el mismo péptido.

30 Para comparar más fácilmente las respuestas, las curvas de datos de relación de E:T estándar versus % de citotoxicidad se convirtieron en LU por 10⁶ células efectoras con una LU definida como la actividad lítica requerida para obtener 30% de lisis de células diana en una relación E:T 100: 1. La actividad de CTL específica (σ LU) se calculó por la sustracción del valor de LU obtenido en ausencia de péptido del valor de LU obtenido con el péptido. Un cultivo dado se calificó como negativo para la inducción CTL si se cumplieron los siguientes criterios: 1) Δ LU >2; 35 2) LU(+ péptido) - LU(- péptido) > 3; y 3) a >10% de diferencia en el % de citotoxicidad analizado con y sin péptido en las dos relaciones E:T más altas (en el comienzo las relaciones E:T eran habitualmente entre 25-50:1).

40 Se generaron líneas CTL de esplenocitos activados con pMIN.1 a través de estimulaciones semanales repetida de los CTLs con esplenocitos activados LPS/DxS tratados con péptido por medio de las condiciones de cultivos de 6 pocillos descritas anteriormente con la excepción de que los CTL se expandieron en CM que contiene citoquinas según sea necesario durante el período de estimulación de siete días.

Ensayo de citoquinas

45 Para medir la producción de IFN- γ en respuesta a las células diana transfectadas con minigén, se cultivaron 4 X 10⁴ CTLs con un número equivalente de células Jurkat-A2.1/K^b transfectadas con minigén en placas de 96 pocillos de fondo plano. Después de una noche de incubación a 37°C, se recolectó el sobrenadante del cultivo de cada pocillo y analizó en cuanto a concentración de IFN- γ utilizando un ELISA en sandwich. Se revistieron pocillos de microtitulación Immulon II (Dynatech, Boston, MA) durante una noche a 4°C con 0,2 μ g de anticuerpo de captura IFN- γ anti-ratón, R4-6A2 (Pharmingen). Después de lavar los pocillos con PBS/Tween-20 0,1% y bloquear con BSA 1%, los pocillos revestidos con anticuerpo se incubaron con muestras de sobrenadante del cultivo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió un anticuerpo secundario anti-IFN- γ , XMG1.2 (Pharmingen) a los pocillos y se dejó 50 incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron desarrollados a continuación mediante incubaciones con Avidina-DH y finalmente con peroxidasa de rábano H biotinilada (kit Vectastain ABC, Vector Labs, Burlingame, CA) y sustrato TMB peroxidasa (Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD). La cantidad de citoquinas presente en cada muestra se calculó utilizando un estándar de rIFN- γ (Pharmingen).

b. Resultados

55 Selección de epitopos y diseño del constructo del minigén

En la primera serie de experimentos, la cuestión era si podía inducirse una respuesta equilibrada y multiespecífica de CTL por constructos simples de ADNc de minigén que codifican varios epitopos restringidos de HLA de clase I

dominantes. En consecuencia, se seleccionaron nueve epitopos de CTL sobre la base de su importancia en la inmunidad por CTL durante la infección por HBV y HIV en seres humanos, su conservación de secuencia entre subtipos virales, y su afinidad de unión a MHC de clase I (Tabla 10). De estos nueve epitopos, seis están restringidos de HLA-A2.1 y tres mostraron restricción de HLA-A11. Un epitopo, HBV Pol 551, fue estudiado en dos formas alternativas: la secuencia de tipo salvaje o un análogo (HBV Pol 551-V) diseñado para una mayor afinidad de unión.

Como se indica en la Tabla 10, varios laboratorios independientes han informado que estos epitopos son parte de la respuesta dominante de CTL durante la infección por HBV o HIV. Todos los epitopos considerados mostraron conservación superior al 75% en la secuencia primaria de aminoácidos entre los diferentes subtipos de HBV y clados de HIV. La afinidad de unión a MHC de los péptidos también fue considerada en la selección de los epitopos. Estos experimentos se dirigieron a la viabilidad de la inmunización con epitopos que poseen una amplia gama de afinidades y, como se muestra en la Tabla 10, los seis epitopos restringidos de HLA de HBV y los seis de HIV cubrieron un amplio espectro de afinidades de unión a MHC que abarcan más de dos órdenes de magnitud, con concentraciones de IC₅₀% que van de 3 nM a 200 nM.

La inmunogenicidad de los seis epitopos de CLT restringidos de A2.1 y los tres restringidos de A11 en ratones transgénicos fue verificada por la co-inmunización con un péptido de células T auxiliares en una formulación de IFA. Todos los epitopos indujeron respuestas de CTL significativas en el intervalo de 5 a 73 ΔLU (Tabla 10). Como se mencionó anteriormente, para mejorar la unión a MHC y la inmunogenicidad de HBV Pol 551, el residuo A C-terminal de este epitopo fue sustituido por V resultando en un notable incremento de 40 veces en la afinidad de unión a HLA-A2.1 (Tabla 10). Aunque la secuencia parental fue débilmente o no inmunogénica en ratones transgénicos HLA, el análogo HBV Pol 551-V indujo niveles significativos de actividad de CTL cuando se administró en IFA (Tabla 10). Sobre la base de estos resultados, el análogo V del epitopo HBV Pol 551 fue seleccionado para el constructo del minigén inicial. En todos los experimentos descritos en esta memoria descriptiva, las respuestas de CTL se midieron con células diana revestidas con el epitopo HBV Pol 551 nativo, independientemente de si se utilizó el epitopo análogo V o nativo para la inmunización.

Por último, como estudios anteriores indicaron que la inducción de células T auxiliares mejoraba significativamente la magnitud y duración de las respuestas de CTL (Vitiello et al, J. Clin. Invest. 95:341 (1995); Livingston et al, J. Immunol. 159:1383 (1997)), el epitopo universal de células Th PADRE también se incorporó en el minigén. PADRE ha demostrado previamente tener una alta afinidad de unión a MHC en una amplia gama de haplotipos de MHC de clase II de ratones y seres humanos (Alexander et al., Immunity 1:751 (1994)). En particular, se ha demostrado previamente que PADRE es altamente inmunogénico en ratones H-2^b que se utilizan en el presente estudio (Alexander et al., Immunity 1:751 (1994)).

pMin.1, el constructo de minigén de ADNc prototipo que codifica nueve epitopos de CTL y PADRE, fue sintetizado y subclonado en el vector pcDNA3.1. La posición de cada uno de los nueve epitopos en el minigén fue optimizada para evitar la unión de epitopos de MHC de clase I de ratón H-2^b y HLA-A2.1. La secuencia señal de Ig κ de ratón también se incluyó en el extremo 5' del constructo para facilitar el procesamiento de los epitopos de CTL en el retículo endoplásmico (RE) según lo informado por otros (Anderson et al., J. Exp. Med. 174:489 (1991)). Para evitar aún más la estructura conformacional en el producto del gen polipéptido traducido que pueda afectar el procesamiento de los epitopos de CTL, se introdujo un codón de detención ATG en el extremo 3' del constructo del minigén corriente arriba de la región de codificación para los epitopos c-myc y poli-hys en el vector pcDNA3.1.

Inmunogenicidad de pMin.1 en ratones transgénicos

Para evaluar la capacidad del constructo del minigén pMin.1 de inducir CTL *in vivo*, ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b-H-2^{bxs} fueron inmunizados intramuscularmente con 100 μg de ADNc desnudo. Como una forma de comparar el nivel de CTLs inducidos por la inmunización con ADNc, se inmunizó también a un grupo control de animales con Theradigm-HBV, un lipopéptido palmitoliado que consiste del epitopo de CTL de HBV Núcleo 18 relacionado con el epitopo de células Th de toxina del tétanos 830-843.

Se estimularon esplenocitos de animales inmunizados dos veces con cada uno de los epitopos péptidos codificado en el minigén, a continuación, se analizaron en cuanto a actividad citotóxica específica del péptido en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Un panel representativo de respuestas de CTL de esplenocitos estimulados con pMin.1, mostrado en la Figura 22, indica claramente que se generaron niveles significativos de inducción de CTL por la inmunización con el minigén. La mayoría de los cultivos estimulados con los diferentes epitopos superó el 50% de lisis específica de las células diana en una relación E:T de 1:1. Los resultados de cuatro experimentos independientes, compilados en la Tabla 11, indican que el constructo de pMin.1 es de hecho altamente inmunogénico en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b-H-2^{bxs}, lo que induce una amplia respuesta de CTL dirigida contra cada uno de sus seis epitopos restringidos de A2 0.1.

Para comparar de forma más conveniente los niveles de inducción de CTL entre los diferentes epitopos, los valores de citotoxicidad % para cada cultivo de esplenocitos se convirtieron en ΔLU y se determinó el ΔLU medio de actividad de CTL en cultivos positivos para cada epitopo (véase el Ejemplo V, materiales y procedimientos, para criterios positivos). Los datos, expresados de esta manera en la Tabla 11, confirman la amplitud de la inducción de

CTL provocada por la inmunización con pMin.1 ya que se observaron respuestas de CTL extremadamente altas, que oscilan entre 50 a 700 flu, contra los seis epitopos restringidos de A2.1. Más importante aún, las respuestas de varios cientos de Δ LU observados en cinco de los seis epitopos se acercaron o superaron la del lipopéptido Theradigm-HBV, una formulación de vacuna conocida por su alta potencia de inducción de CTL (Vitiello et al., J. Clin. Invest. 95:341 (1995), Livingston et al, J. Immunol 159:1383 (1997)). El epitopo de HBV Env 335 fue el único epitopo que muestra una respuesta de Δ LU media más baja en comparación con el lipopéptido (Tabla 11, 44 vs 349 Δ LU).

Procesamiento de epitopos de minigén bv células transfectadas

La disminución de la respuesta de CTL observada contra HBV Env 335 fue algo inesperado ya que este epitopo tenía buena afinidad de unión a A2.1 (IC50%, 5 nM) y también fue inmunogénico cuando se administró en IFA. La respuesta baja puede deberse, al menos en parte, al procesamiento ineficiente de este epitopo del polipéptido minigén por las células presentadoras de antígenos después de la inmunización con ADNc *in vivo*. Para responder a esta posibilidad, se transfectaron células tumorales Jurkat-A2. 1.K^b con ADNc de pMin.1 y la presentación del epitopo de HBV Env 335 por células transfectadas se comparó con epitopos restringidos de A2.1 más inmunogénicos utilizando líneas de CTL específicas. La presentación de epitopos se estudió también utilizando células tumorales transfectadas con una constructo de ADNc control, pMin.2-GFP, que codifica un minigén multi-epitopo similar fusionado con GFP que permite la detección de la expresión del minigén en células transfectadas por FACS.

La presentación de epitopos de las células Jurkat transfectadas se analizó utilizando líneas de CTL específicas, empleándose para la lectura la citotoxicidad o la producción de IFN- γ . Se encontró que los niveles de respuesta de CTL se correlacionaban directamente con la inmunogenicidad *in vivo* de los epitopos. Los epitopos altamente inmunogénicos *in vivo*, como HBV Núcleo 18, HIV Pol 476, y HBV Pol 455, fueron presentados de manera eficiente a las líneas de CTL por células transfectadas con pMin.1 o pMin.2-GFP según se midió por la producción de IFN- γ (Figura 23A, > 100 pg/ml para cada epitopo) o actividad citotóxica (Figura 23C, lisis específica >30%). En contraste con estos niveles elevados de actividad *in vitro*, la estimulación de la línea de CTL específica para HBV Env 335 contra ambas poblaciones de células transfectadas resultó en menos de 12 pg/ml de IFN- γ y 3% de lisis específica. Aunque la línea de CTL específica para HBV Env 335 no reconoció el epitopo procesado naturalmente de manera eficiente, esta línea mostró una respuesta equivalente a las células diana cargadas con péptido en comparación con líneas de CTL específicas para los otros epitopos (Figura 23B, D). En conjunto, estos resultados sugieren un procesamiento y/o presentación defectuosos asociados con el epitopo HBV Env 335 que pueden contribuir a su inmunogenicidad disminuida *in vivo*.

Efecto del epitopo de células T auxiliares PADRE en la inmunogenicidad del minigén

Después de haber obtenido una respuesta de CTL amplia y equilibrada en ratones transgénicos inmunizados con un ADNc de minigén que codifica múltiples epitopos restringidos de HLA-A2.1, se examinaron otras variables posibles que podrían influir en la inmunogenicidad del constructo prototipo. Este tipo de análisis podría llevar a la optimización racional y rápida de constructos futuras. Más específicamente, se sintetizó una constructo de ADNc basado en el prototipo pMin.1 en la que el epitopo PADRE fue eliminado para examinar la contribución de las células T auxiliares en la inmunogenicidad del minigén (Figura 24A).

Los resultados de los análisis de inmunogenicidad indicaron que la eliminación del epitopo de células Th PADRE resultó en una reducción significativa en la frecuencia de precursores de CTL específicos contra cuatro de los epitopos del minigén (HBV Núcleo 18, HIV Env 120, HBV Pol 455, y HBV Env 335) como lo indica el 17 a 50% de cultivos positivos para CTL observado contra estos epitopos en comparación con la frecuencia de 90 a 100% en animales inmunizados con el constructo de pMin.1 prototipo (Figura 25). Por otra parte, en dos de los epitopos, HBV Núcleo 18 y HIV Env 120, la magnitud de la respuesta en los cultivos positivos inducidos por pMin.1-No PADRE fue de 20 a 30 veces menor que la del constructo de pMin.1 (Figura 25A).

Efecto de la modulación de la afinidad de unión a MHC en la inmunogenicidad del epitopo

A continuación, se sintetizó una constructo en el que el residuo de anclaje en V HBV Pol 551 fue sustituido por alanina, el residuo nativo, para tratar el efecto de la disminución de la unión a MHC en la inmunogenicidad del epitopo (Figura 24B).

A diferencia de la eliminación del epitopo de células Th, la disminución de la capacidad de unión a MHC del epitopo HBV Pol 551 en 40 veces a través de la modificación del residuo de anclaje no pareció afectar la inmunogenicidad del epitopo (Figura 25B). La respuesta de CTL contra el epitopo HBV Pol 551, así como a los otros epitopos, medida por LU o frecuencia de cultivos positivos para CTL, fue muy similar entre las constructos que contenían el residuo A nativo o V mejorado en el sitio de anclaje de unión a MHC. Este hallazgo refuerza la noción de que los minigenes de epitopos mínimos pueden proporcionar de manera eficiente epitopos de muy diferentes afinidades de unión a MHC. Además, este hallazgo es particularmente relevante para mejorar la inmunogenicidad del epitopo a través de diferentes procedimientos de administración, especialmente a la luz del hecho de que el epitopo HBV Pol 551 de tipo salvaje fue esencialmente no inmunogénico cuando se administró en una emulsión de IFA menos potente.

Efecto de la secuencia señal en la inmunogenicidad del constructo del minigén

Se eliminó la secuencia señal del constructo de pMin.1, lo que impide el procesamiento del polipéptido del minigén en el ER (Figura 24C). Cuando se examinó la inmunogenicidad del constructo de pMin.1-No Sig, se encontró una disminución global de la respuesta contra cuatro epitopos de CTL. Dos de estos epitopos, HIV Env 120 y HBV Env 335, mostraron una disminución en la frecuencia de cultivos positivos para CTL en comparación con pMin.1 mientras que el resto de los epitopos, HBV Pol 455 y HIV Pol 476, mostraron una disminución de 16 veces (de 424 a 27 Δ LU) y 3 veces (709 a 236 Δ LU) en la magnitud de la respuesta media de CTL, respectivamente (Figura 25C). Estos hallazgos sugieren que permitir el procesamiento en el ER de algunos de los epitopos codificados en el constructo prototipo de pMin.1 puede mejorar la inmunogenicidad, en comparación con los constructos que permiten solamente el procesamiento citoplasmático del mismo panel de epitopos.

Efecto del reordenamiento del epitopo y creación de nuevos epitopos de unión

En el constructo final examinado, se analizó la inmunogenicidad del epitopo HBV Env 335 para determinar si puede estar influida por su posición en el terminal 3' del constructo del minigén (Figura 24D). Por lo tanto, la posición del epitopo Env en el constructo de ADNc se cambió con un epitopo más inmunogénico, HBV Pol 455, situado en el centro del minigén. Cabe señalar que esta modificación también creó dos epitopos potencialmente nuevos. Como se muestra en la Figura 25D, la transposición de las dos epitopos pareció afectar la inmunogenicidad de no sólo los epitopos transpuestos, sino también más en general la de otros epitopos. El cambio de los epitopos resultó en la obliteración de la inducción de CTL contra el HBV Env 335 (sin cultivos positivos detectados de cada seis). La respuesta de CTL inducida por el epitopo HBV Pol 455 terminal también se redujo, pero sólo ligeramente (424 vs 78 Δ LU media). Además de los epitopos cambiados, la inducción de CTL contra otros epitopos en el constructo de pMin.1-Switch también se redujo notablemente en comparación con el constructo prototipo. Por ejemplo, no se observó una respuesta de CTL contra el epitopo HIV Env 120 y esta disminuyó significativamente contra los epitopos HBV Núcleo 18 (4 de 6 cultivos positivos, disminución en Δ LU media de 306 a 52) y HBV Pol 476 (disminución en Δ LU media de 709 a 20) (Figura 25D).

Como se mencionó anteriormente, debe señalarse que el cambio de los dos epitopos había creado nuevos epitopos de unión. De hecho, en el constructo pMin.1-Switc, se crearon dos nuevos epitopos de CTL potenciales a partir de secuencias de epitopos de HBV Env 335 - HIV Pol 476 (LLVPPFVIL (SEQ ID NO: 135), restringida a H-2K^b) y HBV Env 335-HBV Pol 551 (VLGVWLSLLV (SEQ ID NO: 136), restringida a HLA-A2.1). Aunque estos epitopos de unión no han sido examinados para determinar si son o no inmunogénicos en efecto, esto puede explicar la baja inmunogenicidad de los epitopos HBV Env 335 y HIV Pol 476. Estos hallazgos sugieren que evitar los epitopos de unión puede ser importante en el diseño de minigenes multi-epitopo así como la capacidad para confirmar su inmunogenicidad *in vivo* en un sistema de ensayo biológico como ratones transgénicos HLA.

Inducción de CTLs contra epitopos de A11 codificados en pMin.1

Para examinar aún más la flexibilidad del enfoque de la vacuna de minigén para inducir una respuesta de CTL amplia no sólo contra múltiples epitopos sino también contra epitopos restringidos de diferentes alelos de HLA, se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A11/K^b para determinar si los tres epitopos A11 en el constructo pMin.1 eran inmunogénicos para CTLs, como fue el caso de los epitopos restringidos de A2.1 en el mismo constructo. Como se resume en la Tabla 12, se observó la inducción significativa de CTL en la mayoría de los cultivos contra los tres epitopos restringidos de HLA-A11 y el nivel de inmunidad por CTL inducida para los tres epitopos, en el intervalo de 40 a 260 Δ LU, superó al de los péptidos suministrados en IFA (Tabla 10). De este modo, nueve epitopos de CTL con restricciones variables de HLA incorporadas en una constructo de minigén prototipo demostraron inducción de CTL significativa *in vivo*, lo que confirma que los plásmidos de ADN de minigén pueden servir como medio de administración de múltiples epitopos, de diversas restricciones de HLA y afinidades de unión a MHC, al sistema inmunológico de una forma inmunogénica y que pueden utilizarse cepas adecuadas de ratones transgénicos para medir la inmunogenicidad del constructo de ADN *in vivo*.

Las CTLs fueron inducidas también contra tres epitopos A11 en ratones transgénicos A11/K^b. Estas respuestas sugieren que la administración de múltiples epitopos de CTL que confiere una amplia cobertura a la población puede ser posible en los seres humanos y que los animales transgénicos de haplotipos apropiados pueden ser herramientas útiles en la optimización de la inmunogenicidad *in vivo* de ADN del minigén. Además, puede utilizarse animales como los monos que tienen moléculas de HLA conservadas con reactividad cruzada con epitopos de CTL y HTL reconocidos por moléculas de MHC humano para determinar la inmunogenicidad humana de epitopos de HTL y CTL (Bertoni et al, J. Immunol. 161:4447-4455 (1998)).

Este estudio representa la primera descripción de la utilización de ratones transgénicos HLA para cuantificar la inmunogenicidad *in vivo* de vacunas de ADN, mediante el examen de la respuesta a epitopos restringidos de antígenos de HLA humanos. Se requieren estudios *in vivo* para abordar las variables fundamentales para el desarrollo de vacunas, que no son evaluadas fácilmente mediante ensayos *in vitro*, como la vía de administración, formulación de la vacuna, biodistribución en tejidos, y la participación de órganos linfoides primarios y secundarios. Debido a su simplicidad y flexibilidad, los ratones transgénicos HLA representan una alternativa atractiva, al menos para los estudios iniciales de desarrollo de vacunas, en comparación con estudios más complicados y costosos en

5 especies animales superiores, como primates no humanos. Los estudios de presentación *in vitro* descritos anteriormente apoyan también el uso de ratones transgénicos HLA para la detección de constructos de ADN que contengan epitopos humanos en la medida en que se observe una correlación directa entre la inmunogenicidad *in vivo* y la presentación *in vitro*. Por último, se observaron respuesta de CTL fuertes contra seis epitopos virales restringidos de A 2.1 y en tres epitopos restringidos de A11 codificados en el constructo pMin.1 prototipo. Para cinco de los epitopos restringidos de A 2.1, la magnitud de la respuesta de CTL se aproximó a la observada con el lipopéptido, Theradigm-HBV, que anteriormente ha demostrado inducir una fuerte respuesta de CTL en seres humanos (Vitiello et al, J. Clin Invest. 95:341 (1995); Livingston et al, J. Immunol 159:1383 (1997)).

Tabla 1

Epitopes de HTL derivados de HBV			
Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
1298.06	KQAFTFSPYKAFLC	HBV POL 661	
F107.03	LQSLTNLLSSNLSWL	HBV POL 412	
1280.06	AGFPLLTRILTIPQS	HBV ENV 180	
1280.09	GTSFVYVPSALNPAD	HBV POL 774	
CF-08	VSFGVWIRTPPAYRPPNAPI	HBV NUC 120	
27.0280	GVWIRTPPAYRPPNA	HBV NUC 123	
1186.25	SFGVWIRTPPAYRPP	HBV NUC 121	
27.0281	RHYLHTLWKAGILYK	HBV POL 145	
F107.04	PFLLAQFTSAICSVV	HBV POL 523	
1186.15	LVPFVQWFVGLSPTV	HBV ENV 339	
1280.15	LHLYSHPIILGFRKI	HBV POL 501	
1298.04	KQCFRKLVPNRPIDW	HBV POL 615	
1298.07	AANWILRGTSFVYVP	HBV POL 764	
857.02	PHHTALRQAILCWGELMTLA	HBV NÚCLEO 50	
35.0100	LCQVFADATPTGWGL	HBV POL 683	
35.0096	ESRLVDFSQFSRGN	HBV POL 387	
35.0093	VGPLTVNEKRRLKLI	HBV POL 96	
1186.18	NLSWLSLDVSAAFYH	HBV POL 422	

10

Tabla 2

Epitopes de CTL derivados de HBV				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
A2	924.07	FLPSDFFPSV	HBV núcleo 18-27	
	1013.0102	WLSLLVPFV	HBVadr-ENV (S Ag 335-343)	
	777.03	FLLTRILTI	HBV ENV ayw 183	
	927.15	ALMPYACI	HBV ayw pol 642	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de CTL derivados de HBV				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	1168.02	GLSRYVARL	HBV POL 455	
	927.11	FLLSLGIHL	HBV pol 562	
A3	1147.16	HTLWKAGILYK	HBV POL 149	
	1083.01 1090.11	STLPETTVVRR	HBV núcleo 141	
		SAICSVVRR	HBV pol 531	
	1090.10	QAFTFSPTYK	HBV pol 665	
	1069.16	NVSIPWTHK	HBV pol 47	
	1069.20 1142.05	LVVDFSQFSR	HBV pol 388	
		KVGNFTGLY	HBV adr POL 629	
	1069.15	TLWKAGILYK	HBV pol 150	
B7	1145.04	IPSSWAF	HBV ENV 313	
	988.05	LPSDFFPSV	HBV núcleo 19-27	
A2	1147.04	TPARVTGGVF	HBV POL 354	
	1069.06	LLVPFVQWFV	HBV env 338-347	
	1147.13	FLLAQFTSAI	HBV POL 513	
	1147.14	VLLDYQGMLPV	HBV ENV 259	
	1132.01	LVPFVQWFV	HBV ENV 339	
	1069.05	LLAQFTSAI	HBV pol 504-512	
	927.42	NLSWLSLDV	HBV pol 411	
	927.41	LLSSNLSWL	HBV pol 992	
	927.46	KLHLYSHPI	HBV pol 489	
	1069.071	FLLAQFTSA	HBV pol 503	
	1142.07	GLLGWSPQA	HBV ENV 62	
	927.47	HLYSHPHL	HBV ayw pol 1076	
	1069.13	PLLPIFFCL	HBV env 377-385	
	1013.1402	VLQAGFFLL	HBVadr-ENV 177	
	1090.14	YMDDVVLGA	HBV pol 538-546	
A3	26.0539	RLVDFSQFSR	HBV pol 376	
	26.0535	GWIRTPPAYR	HBV X nuc fus 299	
A3	26.0153	SSAGPCALR	HBV X 64	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de CTL derivados de HBV				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	1.0993	KVFVLGGCR	HBV adr "X" 1548	
	26.0149	CALRFTSAR	HBV X 69	
	26.0023	VSFGVWIR	HBV x nuc fus 296	
	26.0545	TLPETTVVRRR	HBV x nuc fus 318	
	20.0131	SVVRRAFPH	HBV POL 524	
	1.0219	FVLGGCRHK	HBV adr "X" 1550	
	26.0008	FFFSPTYK	HBV pol 656	
	20.0130	AFTESPTYK	HBV POL 655	
B7	1147.05	FPHCLAFSYM	HBV POL 530	
	1147.08	YPALMPLYA	HBV POL 640	
	1147.06	LPVCAFSSA	HBV X 58	
	1147.02	HPAAMPHELL	HBV POL 429	
	26.0570	YPALMPLYACI	HBV pol 640	
	19.0014	YPALMPLY	HBV POL 640	
	1145.08	FPHCLAFSY	HBV POL 541	
Otros	1090.02	A YRPPNAPI	HBV NUC 131	
	1.0519	DLLDTASALY	HBV Adr NÚCLEO 419	
	13.0129	EYLVSFVWVI	HBV NUC 117	
	20.0254	FAAPRTQCGY	HBV POL 631	
	2.0060	GYPALMPLY	HBV ALL 1224	
	1069.04	HTLWKAGILY	HBV pol 149	
	1069.08	ILLCLIFLL	HBV env 249-258	
	1.0166	KVGNFTGLY	HBV adr POL 629	
	1069.23	KYTSFPWLL	HBV POL 745	
	1069.01	LLDTASALY	HBV núcleo 59	
	2.0239	LSLDVSAAFY	HBV ALL 1000	
	2.0181	LYSHPHLGF	HBV POL 492	
	1039.01	MMWYWGPSLY	HBV 360	
	2.0126	MSTTDLEAY	IIBV adr 1521	
	1069.03	PLDKGIKPY	HBV pol 124	
	1090.09	PTTGRTSLY	HBV pol 808	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de CTL derivados de HBV				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	20.0138	PWTHKVGNF	HBV POL 51	
	20.0135	RWMCLRRFI	HBV ENV 236	
	20.0269	RWMCLRRFH	HBV ENV 236	
	20.0139	SFCGSPYSW	HBV POL 167	
Otros	1069.02	SLDVSAAFY	HBV pol 427	
	20.0136	SWLSLLVPF	HBV ENV 334	
	20.0271	SWPKFAVNL	HBV POL 392	
	20.0137	SWWTSLNFL	HBV ENV 197	
	2.0173	SYQHFRKLLL	HBV POL 4	
	13.0073	WFIHSCLTF	HBV NUC 102	
	1.0774	WLWGMIDIDPY	HBV adw NÚCLEO 416	
	1039.06	WMMWYWGPSLY	HBV env 359	
	924.14	FLPSDFFPSI	HBv 18-27 I10 var.	
	1090.77	YMDDVVLGV	HBV pol 538-546 sub	
	941.01	FLPSDYFPSV	HBC18-27 análogo	
	1083.02	STLPETYVRR	HBV core141-151 análogo	
	1145.05	FPIPSSWAF	HBV ENV 313 análogo	
	1145.11	FPHCLAFSL	HBV POL 541 análogo	
	1145.24	FPHCLAFAL	HBV POL 541 análogo	
	1145.06	IPITSSWAF	HBV ENV 313 análogo	
	1145.23	IPIPMSWAF	HBV ENV 313 análogo	
	1145.07	IPILSSWAF	HBV ENV 313 análogo	
	1145.09	FPVCLAFSY	HBV POL 541 análogo	
	1145.10	FPHCLAFAY	HBV POL 541 análogo	

Tabla 3

Epitopes de HTL derivados de HCV				
Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:	
	AAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLGFGAY	HCV NS3 1242-1267		
P98.03	AAYAAQGYKVLVNLNPSVAAT	HCV NS3 1242		
P98.04	GYKVLVNLNPSVAATLGFGAY	HCV NS3 1248		

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de HTL derivados de HCV			
Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
P98.05	GYKVLVLNPSVAAT	HCV NS3 1248	
1283.21	GYKVLVLNPSVAATL	HCV NS3 1253	
1283.20	AQGYKVLVLNPSVAA	HCV NS3 1251	
	GEGAVQWMNRLIAFASRGNHVS	HCV NS4 1914-1935	
F134.08	GEGAVQWMNRLIAFASRGNHV	HCV NS4 1914	
1283.44	MNRLIAFASRGNHVS	HCV NS4 1921	
1283.16	SKGWRLAPITAYAQ	HCV NS3 1025	
1283.55	GSSYGFQYSPGQ RVE	HCV NS5 2641	
F134.05	NFISGIQYLAGLSTLPGNPA	HCV NS4 1772	
1283.61	ASCLRKLGVPPLRVW	HCV NS5 2939	
1283.25	GRHLIFCHSKKCCDE	HCV NS3 1393	
35.0107	TVDFSLDPTFTIETT	HCV 1466	
35.0106	VVVVATDALMTGYTG	HCV 1437	

Tabla 4

Epitopes de CTL derivados de HCV				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
A2	1090.18	FLLLDARV	HCV NS1/E2 728	
	1073.05	LLFNILGGWV	HCV NS4 1812	
	1013.02	YLVAYQATV	HCV NS3 1590	
	1013.1002	DLMGYIPLV	HCV Núcleo 132	
	1090.22	RLIVFPDLGV	HCV NS5 2611	
	24.0075	VLVGGVLAA	HCV NS4 1666	
	24.0073	WMNRLIAFA	IICV NS4 1920	
	1174.08	HMWNFISGI	HCV NS4 1769	
	1073.06	ILAGYGAGV	IICV NS4 1851	
	24.0071	LLFLLLADA	HCV NS1/E2 726	
	1073.07	YLLPRRGPRL	HCV Núcleo 35	
	1.0119	YLVTRHADV	HCV NS3 1136	
	A3	1.0952	KTSERSQPR	HCV Núcleo 51
1073.10		GVAGALVAFK	HCV NS4 1863	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de CTL derivados de HCV				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	1.0123	LIFCHSKKK	HCV NS3 1391	
	1.0955	QLFTFSPRR	HCV E1 290	
	1073.11	RLGVRATRK	HCV Núcleo 43	
	1073.13	RMYVGGVEHR	HCV NS1/E2 635	
	24.0090	VAGALVAFK	HCV NS4 1864	
	F104.01	VGIYLLPNR	HCV NS5 3036	
B7	1145.12	LPGCSFSIF	HCV Núcleo 168	
	29.0035	IPFYGKAI	HCV 1378	
Otros	1069.62	CTCGSSDLY	HCV NS3 1128	
	24.0092	FWAKHMWNF	HCV NS4 1765	
	13.0019	LSAFSLHSY	HCV NS5 2922	
A3	24.0086	LGFGAYMSK	HCV NS3 1267	
	1174.21	RVCEKMALY	HCV NS5 2621	
	1174.16	WMNSTGFTK	HCV NS1/E2 557	
1073.04		TLHGPTPLLY	HCV NS3 1622	
B7	16.0012	FPYLVAYQA	HCV NS3 1588	
	15.0047	YPCTVNFH	HCV NS1/E2 623	
Otros	24.0093	EVDGVR LHRY	HCV NS5 2129	
	3.0417	LTCGFADLMGY	HCV 126	
	1073.01	NIVDVQYLY	HCV E1 700	
	1.0509	GLSAFSLHSY	HCV NS5 2921	
	1073.17	MYVGDLCGSVF	HCV E1 275	
	1073.18	MYVGGVEHRL	HCV NS1/E2 633	
	13.075	QYLAGLSTL	HCV NS4 1778	
	1145.13	FPGCSFSIF	HCV Núcleo 168	
	1145.25	LPGCMFSIF	HCV Núcleo 168	
	1292.24	LPGCSFSH	HCV Núcleo 169	
	1145.14	LPVCSFSIF	HCV Núcleo 168	
	1145.15	LPGCSFSYF	HCV Núcleo 168	

ES 2 371 432 T3

Tabla 5

Epitopes de HTL derivados de VIH			
Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	GEIYKRWHLGLNKIVRMYSPTSILD	HIV1 GAG 294-319	
	KRWHLGLNKIVRMYSPTSILD	HIV gag 298-319	
27.0313	KRWHLGLNKIVRMY	HIV1 GAG 298	
27.0311	GEIYKRWHLGLNKI	HIV1 GAG 294	
27.0354	WEFVNTPLVWKLWYQ	HIV1 POL 596	
27.0377	QKQITKIQNFRVYYR	HIV1 POL 956	
	EKVYLAWVPAHKGIGG	HIV1 POL 711-726	
1280.03	KVYLAWVPAHKGIGG	HIV POL 712	
27.0361	EKVYLAWVPAHKGIG	HIV1 POL 711	
	PIVQNIQGGQMVHQAI SPRTLNA	HIV1 gag 165-186	
27.0304	QGQMVHQAI SPRTLN	HIV1 GAG 171	
27.0297	QHLLQLTVWGIKQLQ	HIV1 ENV 729	
27.0344	SPAIFQSSMTKILEP	HIV1 POL 335	
F091.15	IKQFINMWQEVGKAMY	HIV1 ENV 566	
27.0341	FRKYTAFTIPSINNE	HIV1 POL 303	
27.0364	HSNWRAMASDFNLPP	IHIV1 POL 758	
27.0373	KTAVQMAVFIHNFKR	HIV1 POL 915	
	DRVHPVHAGPIAPGQMREPRGS	HIV GAG 245	
	AFSPEVPMFSALSEGATPQDLN TML	HIV gag 195-216	
	AFSPEVPMFSALSEGATPQDL	HIV gag 195-216	
200.06	SALSEGATPQDLN TML	HIV gag 205	
27.0307	SPEVPMFSALSEGA	HIV gag 197	
27.0310	LQEIQGWMTNPPPIPVEIYKR	HIV gag 275	
	QEQGWMTNPPPIPV	HIV gag 276	
35.0135	YRKILRQRKIDRLID	HIV VPU 31	
35.0131	WAGIKQEFGIPYNPQ	HIV POL 874	
35.0127	EVNIVTDSQYALGH	HIV POL 674	
35.0125	AETFYVDGAANRETK	HIV POL 619	
35.0133	GAVVIQDNSDIKVVP	HIV POL 989	

ES 2 371 432 T3

Tabla 6

Epitopes de HTL derivados de VIH				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
A2	25.0148	MASDFNLPPV	HIV1 POL 70	
	1069.32	VLAEAMSQV	HIV gag 397	
	1211.04	KLTPLCVTL	HIV ENV 134	
	25.0062	KLVGKLNWA	HIV1 POL 87	
	25.0039	LTFGWCFKL	HIV1 NEF 62	
	941.031	ILKEPVHGV	HIV1 pol 476-484	
	25.0035	MTNPPPIPV	HIV1 GAG 34	
	25.0057	RILQQLLFI	HIV1 VPR 72	
A3	1.0944	AVFIHNFKR	HIV POL 1434	
	1.1056	KIQNFRVYYR	HIV POL 1474	
	1069.49	QMAVFIHNFK	HIV pol 1432	
	966.0102	AIFQSSMTK	HIV pol 337	
	1150.14	MAVFIHNFK	HIV pol 909	
	940.03	QVPLRPMTYK	HIV nef 73-82	
	25.0175	TTLFCASDAK	HIV1 ENV 81	
	1069.43	TVYYGVPVWK	HIV env 49	
	25.0209	VTIKIGGQLK	HIV1 POL 65	
B7	1146.01	FPVRPQVPL	HIV nef 84-92	
	29.0060	IPIHYCAPA	HIV env 293	
	15.0073	FPISPIETV	HIV POL 171	
	29.0056	CPKVSFEPI	HIV env 285	
	29.0107	IPYNPQSQGVV	HIV pol 883	
A2	25.0151	CTLNFPISPI	HIV1 POL 96	
	25.0143	LTPGWCFKLV	HIV1 NEF 62	
	25.0043	YTAFTIPSI	HIV1 POL 83	
	25.0055	AHRILQQL	HIV1 VPR 76	
	25.0049	ALVEICTEM	HIV1 POL 52	
	25.0032	LLQLTVWGI	HIV1 ENV 61	
	25.0050	LVGPTPVNI	HIV1 POL 100	
	25.0047	KAACWWAGI	HIV1 POL 65	
	25.0162	KMIGGIGFI	HIV1 POL 96	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de HTL derivados de VIH				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	25.0052	RAMASDFNL	HIV1 POL 78	
	1211.09	SLLNATDIAV	HIV ENV 814	
A2	25.0041	TLNFPSISPI	HIV1 POL 96	
A3	1.0046	IVIWGKTPK	HIV POL 1075	
	25.0064	MVHQAI SPR	HIV1 GAG 45	
	1.0062	YLAWVPAHK	HIV POL 1227	
	1.0942	MTKILEPFR	HIV POL 859	
	25.0184	QMVHQAI SPR	HIV1 GAG 45	
	1069.48	AVFHINFKRK	HIV pol 1434	
	1069.44	KLGRWPVK	HIV pol 1358	
	1069.42	KVYLAWVPAHK	HIV pol 1225	
	1.0024	NTPVFAIKK	HIV pol 752	
	25.0062	RIVELLGRR	HIV1 ENV 53	
	25.0095	TIKIGGQLK	HIV1 POL 65	
	25.0078	TLFCASDAK	HIV1 ENV 82	
	25.0104	VMIVWQVDR	HIV1 VIF 83	
	1069.47	VTVYYGVPVWK	HIV env 48	
B7	15.0268	YPLASLRSLF	HIV GAG 507	
	1292.13	HPVHAGPIA	HIV GAG 248	
	19.0044	VPLQLPPL	HIV con. REV 71	
Otros	1.0431	EVNIVTDSQY	HIV POL 1187	
	1.0014	FRDYVDRFY	HIV GAG 298	
	25.0113	IWGCSGKLI	HIV1 ENV 69	
	25.0127	IYETYGDTW	HIV1 VPR 92	
	1069.60	IYQEPFKNL	HIV pol 1036	
	2.0129	IYQYMDDL Y	HIV pol 359	
	25.0128	PYNEWTLEL	HIV1 VPR 56	
	25.0123	PYNTPVFAI	HIV1 POL 74	
	1069.57	RYLKDQQLL	HIV env 2778	
	1069.58	RYLRDQQLL	HIV env 2778	
	1069.59	TYQIQEPF	HIV pol 1033	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de HTL derivados de VIH				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	1069.27	VIIYQYMDDL	HIV pol 358	
	1069.26	VTVLVDVGDAY	HIV pol 265	
	25.0115	VWKEATTTL	HIV1 ENV 47	
	25.0218	VWKEATTTLF	HIV1 ENV 47	
	25.0219	YMQATWIPEW	HIV1 POL 96	
A2	1211.4	SLLNATAIAV	HIV MN gp160 814(a)	
A3	F105.21	AIFQRSMTR	HIV pol 337(a)	
	F105.17	AIFQSSMTR	HIV pol 337(a)	
	F105.02	GIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.03	AAFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.04	AIAQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.05	AIFASSMTK	HIV pol 337 (a)	
	F105.06	AIFQASMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.07	AIFQSAMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.08	AIFQSSATK	HIV pol 337(a)	
	F105.09	AIFQSSMAK	HIV pol 337(a)	
	F105.11	FIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.12	SIFQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.16	AIFQCSMTK	HIV pol 337(a)	
B7	1145.03	FPVRPQFPL	HIV nef 84-92 análogo	
	1181.03	FPVRPQVPI	HIV nef 84-92(a)	
	1292.14	HPVHAGPII	HIV GAG 248	
	1292.09	FPISPIET1	HIV POL 179	
	1145.02	FPVTPQVPI	HIV nef 84-92 análogo	
	1145.22	FPVRMQVPL	HIV nef 84-92 análogo	
	1181.04	FPVRPQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.01	FPVRPQVPA	HIV nef 84-92(a)	
	1181.02	FPVRPQVPV	HIV nef 84-92(a)	
	1181.05	FPVRPQVPF	HIV nef 84-92(a)	
	1181.06	FPVRPQVPW	HIV nef 84-92(a)	

ES 2 371 432 T3

Tabla 7

Epitopes de HTL derivados de <i>P. falciparum</i>			
Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
F125.04	RHNWVNHA VPLAMKLI	Pf SSP2 61	
1188.34	HNWVNHAVPLAMKLI	Pf SSP2 62	
1188.16	KSKYKLATSVLAGLL	Pf EXP1 71	
	LVNLLIFHINGKIIKNSE	PfLSA1 13	
F125.02	LVNLLIFHINGKIIKNS	Pf LSA 113	
27.0402	LLIFHINGKIIKNSE	Pf LSA1 16	
1188.32	GLAYKFVVPGAATPY	Pf SSP2 512	
27.0392	SSVFNVVNSSIGLIM	Pf CSP 410	
27.0417	VKNVIGPFMKAVCVE	Pf SSP2 223	
27.0388	MRKLAILS SVSSFLV	Pf CSP 2	
27.0387	MNYYGKQENNWYSLKK	Pf CSP 53	
1188.38	KYKIAGGIAGGLALL	Pf SSP2 494	
1188.13	AGLLGNVSTVLLGGV	Pf EXP1 82	
27.0408	QTNFKSLLRN LGVSE	Pf LSA 1 94	
35.0171	PDSIQDSLKESRKLN	Pf SSP2 165	
35.0172	KCNLYADSAWENVKN	Pf SSP2 211	

Tabla 8

Epitopes de CTL derivados de <i>P. falciparum</i>				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
A2	1167.21	FLIFFDLFLV	PfSSP2 14	
	1167.08	GLIMVLSFL	PfCSP 425	
	1167.12	VLAGLLGNV	Pf EXP1 80	
	1167.13	KILSVFFLA	PfEXP1 2	
	1167.10	GLLGNVSTV	Pf EXP1 83	
	1167.18	ILSVSSFLV	PfCSP 7	
	1167.19	VLLGGVGLVL	Pf EXP1 91	
A3	1167.36	LACAGLAYK	PfSSP2 511	
	1167.32	QTNFKSLLR	Pf LSAI 94	
	1167.43	VTCGNGIQVR	PfCSP 375	
	1167.24	ALFFIIFNK	Pf EXP1 10	

ES 2 371 432 T3

(continuación)

Epitopes de CTL derivados de <i>P. falciparum</i>				
Supertipo	Péptido	Secuencia	Fuente	SEQ ID NO:
	1167.28	GVSENIFLK	Pf LSA1 105	
	1167.47	HVLSHNSYEK	Pf LSA1 59	
	1167.51	LLACAGLAYK	Pf SSP2 510	
	1167.46	FILVLLIFH	Pf LSA1 11	
B7	1101.03	MPLQLAI	Pf SHEBA 77	
	1167.61	TPYAGEPAPF	PfSSP2539	
A2	1167.14	FLIFFDLFL	Pf SSP2 14	
	1167.16	FMKAVCDEV	Pf SSP2 230	
	1167.15	LIFFDLFLV	PfSSP2 15	
	1167.17	LLMDCSGSI	Pf SSP2 51	
	1167.09	VLLGGVGLV	Pf EXP1 91	
B7	19.0051	LPYGRNTL	Pf SSP2 126	
Otros	16.0245	FQDEENIGIY	Pf LSA1 1794	
	16.0040	FVEALFQEY	Pf CSP 15	
	1167.54	FYFILVLL	Pf LSA1 9	
	1167.53	KYKLATSVL	Pf EXP1 73	
	1167.56	KYLIVFLI	Pf SSP2 8	
	15.0184	LPSENERGY	Pf LSA1 1663	
	16.0130	PSDGKCNLY	Pf SSP2 207	
	16.0077	PSENERGY	Pf LSA1 1664	
	1167.57	PYAGEPAPF	Pf SSP2 528	
	1167.55	YYIPHQSSL	Pf LSA1 1671	

Tabla 9. Activación de proliferación de células T por los vectores de expresión que codifican epitopes de MHC Clase II fusionados a secuencias dirigidas a MHC Clase II

Inmunógeno	Péptido estimulante ¹		
	PADRE	OVA 323	NÚCLEO 128
péptido - CFA ²	3,0 (1.1)	2,7 (1.2)	3,2 (1,4)
pEP2.(PAOS).(-)	-	-	-
pEP2.(AOS).(-)	5,6(1.8)	-	-
pEP2.(PAOS).(sigTh)	5,0 (2.9)	-	2,6(1,5)
pEP2.(PAOS).(IgaTh)	5,6 (2.1)	-	3,0 (1,6)

(continuación)

Inmunógeno	Péptido estimulante ¹		
	PADRE	OVA 323	NÚCLEO 128
pEP2.(PAOS).(LampTh)	3,8 (1.7)	-	3
pEP2.(PAOS).(liTh)	5,2(2.0)	3,2 (1.5)	3,7 (1,5)
pEP2.(PAOS).(H2M)	3,3 (1,3)		2,8

¹Media geométrica de cultivos con SI ≥ 2

². Respuesta proliferativa medida en el ganglio linfático

Tabla 10

		Epitopes CTL en ADNc del minigen		Inmunogenicidad in Vivo (IFA)	
Epitope	Secuencia	MHC restringido	Afinidad de unión de MHC	No. CTL-cultivos positivos	Respuesta CTL (media geom \times /+SD) ^b
			[IC30% (nM)]		Δ LU
HBV Núcleo 18	FLPSDFFPSV	A2.1	3	6/6	73,0 (1,1)
HBV Env 335	WLSLLVPFV	A2.1	5	4/6	5,3 (1,6)
HBV Pol 455	GLSRYVARL	A2.1	76	ND c	ND
HIV Env 120	KLTPLCVTL	A2.1	102	2/5	6,4 (1,3)
HIV Pol 476	ILKEPVHGV	A2.1	192	2/5	15,2 (2,9)
HBV Pol 551-A	YMDDVVLGA	A2.1	200	0/6	-
HBV Pol 551-V	YMDDVVLGV	A2.1	5	6/6	8,2 (2,3)
HIV Env 49	TVYYGVPVWK	A11	4	28 / 33	13,4 (3,1)
HBV Núcleo 141	STLPETTIVRR	A11	4	6/6	12.1 (2.6)
HBV Pol 149	HTLWKAGILYK	A11	14	6/6	13,1 (1,2)

a Péptido analizado en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b H-2^{bxs} por co-inmunización con un péptido de células T auxiliares T en IFA.

b Media geométrica de la respuesta CTL de cultivos positivos.

c ND, no realizado.

ES 2 371 432 T3

Tabla 11

Síntesis de inmunogenicidad del constructo de ADN de pMin.1 en ratones transgénicos HLA A2.1/K ^b		
Epitope	Respuesta CTL ^a	
	No. cultivos positivos/Total ^b	Media Geom de respuesta de los cultivos positivos [x/±SD]
ΔLU		
HBV Núcleo 18	9 / 9	455,5 [2,2]
HIV Env 120	12 / 12	211,9 [3,7]
HBV Pol 551-V	9 / 9	126,1 [2,8]
HBV Pol 455	12 / 12	738,6 [1,3]
HIV Pol 476	11 / 11	716,7 [1,5]
HBV Env 335	12 / 12	43,7 [1,8]
HBV Núcleo 18 (Theradigm) ^c	10 / 10	349,3 [1,8]

a Los ratones se inmunizaron con ADN de pMin.1 o Theradigm-lipopéptido de HBV y la actividad CTL en cultivos de esplenocitos se determinó después de la estimulación in vitro con epitopes de péptidos individuales. Se muestran los resultados de 4 experimentos independientes

b Ver Ejemplo V, Materiales y procedimientos para la definición de un cultivo positivo para CTL.

c Respuesta de ratones inmunizados con Theradigm-lipopéptido HBV que contiene el epitope del núcleo 18 de HBV.

Tabla 12

Síntesis de inmunogenicidad en ratones transgénicos HLA A2.1/K ^b		
Epitope	Respuesta CTL ^a	
	No. cultivos positivos/Total ^b	Media Geom de respuesta de los cultivos positivos [x/±SD]
ΔLU		
HBV Núcleo 141	5/9	128,1 [1,6]
HBV Pol 149	6/9	267,1 [2,2]
HIV Env 43	9/9	40,1 [2,9]

a Los ratones se inmunizaron con ADN de pMin.1 la actividad CTL en cultivos de esplenocitos se determinó se determinó después de la estimulación in vitro con epitopes de péptidos individuales restringidos A11. Se muestra media geométrica de la respuesta CTL de tres experimentos independientes.

b La definición de un cultivo positivo CTL se describe en el Ejemplo V, Materiales y procedimientos.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia dirigida del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) fusionado a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica dos o más epitopos del péptido heterólogo, en el que los epitopos del péptido heterólogo comprenden dos epitopos del péptido VIH (HTL) restringido de clase II o un epitopo del péptido VIH (CTL) restringido de clase I y un epitopo del péptido (HTL) restringido de clase II, en el que al menos uno de dichos epitopos del péptido VIH (HTL) restringido de clase II se selecciona del grupo de péptidos provisto en la Tabla 5; y en el que además dicho epitopo del péptido VIH (CTL) restringido de clase I se selecciona del grupo de péptidos provisto en la Tabla 6
2. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que los epitopos del péptido heterólogo comprenden dos o más epitopos del péptido VIH (HTL) restringido de clase II heterólogo.
3. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que los epitopos del péptido heterólogo comprenden un epitopo del péptido VIH (CTL) restringido de clase I y un epitopo del péptido (HTL) restringido de clase II.
4. El vector de expresión de la reivindicación 2, en el que los epitopos del péptido heterólogo además comprenden uno o más epitopos del péptido VIH (CTL) restringido de clase I.
5. El vector de expresión de la reivindicación 3, en el que los epitopos del péptido heterólogo además comprenden dos o más epitopos del péptido VIH (CTL) restringido de clase I.
6. El vector de expresión de la reivindicación 3, en el que los epitopos del péptido heterólogo además comprenden dos o más epitopos del péptido VIH (HTL) restringido de clase II.
7. El vector de expresión de la reivindicación 2, en el que los epitopos del péptido heterólogo además comprenden un epitopo del péptido VIH (HTL) restringido de clase II universal.
8. El vector de expresión de la reivindicación 3 o 7, en el que el epitopo del péptido VIH (HTL) restringido de clase II universal es un epitopo pan DR.
9. El vector de expresión de la reivindicación 8, en el que el epitopo pan DR tiene la secuencia AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeu-LysAlaAlaAla (SEQ ID NO:38).
10. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que la secuencia dirigida a MHC comprende una región de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la proteína II, LAMP-I, HLS-DM, HLA-DO, H2-DO, proteína de la matriz de la gripe, antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno del núcleo de hepatitis B, partícula Ty, proteína Ig- α , proteína Ig- β , y secuencia señal de la cadena kappa de Ig.
11. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que el vector de expresión también comprende un segundo promotor unido operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica uno o más epitopos del péptido (HTL) restringido heterólogo de clase II o epitopos del péptido (CTL) restringido de clase I.
12. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que el vector comprende pMin.1 o pEP2, enunciados en las SEQ ID NOS: 38 y 35, respectivamente.
13. El vector de expresión de la reivindicación 3 o 4, en el que el epitopo del péptido (CTL) restringido de clase I comprende un motivo estructural para un supertipo HLA, por el cual el epitopo del péptido (CTL) restringido de clase I se une a dos o más miembros del supertipo con una afinidad mayor que 500 nM.
14. El vector de expresión de la reivindicación 4 o 5, en el que los epitopos del péptido (CTL) restringido de clase I tienen motivos estructurales que proporcionan afinidad de unión para más de un supertipo de alelo de HLA.
15. El vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en un procedimiento de inducir una respuesta inmune en un sujeto mamífero.
16. Un vector de expresión que comprende un promotor unido operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia dirigida al complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) fusionada a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un epitopo del péptido de VIH (HTL) restringido de clase II heterólogo humano, en el que dicho epitopo del péptido de VIH (HTL) restringido de clase II del péptido de VIH se selecciona del grupo que consiste en:
- AETFYVDGAANRETK,
 EKVYLAWVPAHKGIG,
 EVNIVTDSQYALGII,
 FRKYTAFTIPSINNE,

GAVVIQDNSDIKVVP,
 GEIYKRWIILGLNKI,
 HSNWRAMASDFNLPP,
 IKQFINMWQEVGKAMY,
 5 KRWIILGLNKIVRMY,
 KTAVQMAVFIHNFKR,
 KVYLAWVPAHKGIGG,
 QGQMVHQAI SPRTL N,
 QHLLQLTVWGIKQLQ,
 10 QKQITKIQNFRVYYR,
 SPAIFQSSMTKILEP,
 WAGIKQEFGIPYNPQ,
 WEFVNTPLV KLWYQ, y
 YRKILRQRKIDRLID

- 15 para su uso en un procedimiento de inducir una respuesta inmune *in vivo* que comprende administrar dicho vector de expresión a un sujeto mamífero.
17. El vector de expresión de la reivindicación 16, en el que la segunda secuencia de nucleótidos además comprende dos o más epitopos del péptido VIH (HTL) restringido de clase II heterólogo.
- 20 18. El vector de expresión de la reivindicación 16, en el que la segunda secuencia de nucleótidos también comprende uno o más epitopos del péptido VIH (CTL) restringido de clase I heterólogo.
19. El vector de expresión de la reivindicación 16, en el que la segunda secuencia de nucleótidos también comprende un epitopo del péptido (HTL) restringido universal de clase II.
20. El vector de expresión de la reivindicación 19, en el que el epitopo del péptido VIH (HTL) restringido de clase II universal es un epitopo pan DR.
- 25 21. El vector de expresión de la reivindicación 20, en el que el epitopo pan DR tiene la secuencia AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeu-LysAlaAlaAla (SEQ ID NO:38).
22. El vector de expresión de la reivindicación 16, en el que la secuencia dirigida a MHC comprende una región de un polipéptido seleccionada del grupo que consiste en la proteína II, LAMP-I, HLS-DM, HLA-DO, H2-DO, proteína de la matriz de la gripe, antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno del núcleo de hepatitis B, partícula Ty, proteína Ig- α , proteína Ig- β , y secuencia señal de la cadena kappa de Ig.
- 30 23. El vector de expresión de la reivindicación 16, en el que el vector de expresión también comprende una segunda secuencia promotora unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica uno o más epitopos del péptido (HTL) restringido heterólogo de clase II o (CTL) restringido de clase I.
- 35 24. El vector de expresión de la reivindicación 18, en el que el epitopo del péptido (CTL) restringido de clase I comprende un motivo estructural para un supertipo HLA, por el cual el epitopo del péptido se une a dos o más miembros del supertipo con una afinidad mayor que 500 nM.
25. El vector de expresión de la reivindicación 18, en el que los epitopos del péptido (CTL) restringido de clase I tienen motivos estructurales que proporcionan afinidad de unión para más de un supertipo de alelo de HLA.

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCATACTGGGCA
CGATCGCGGGCGGTGGTACCTACTGGTTGCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCCGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTGGTGGCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCCAGCTCGGCACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCACCGAGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTTGGCTGGGCAGGCCACCACTGCTTACTTCTGTACCAGCAACAGGGCCGCCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCCTCCGGTGGTACGAATGAAGGACATGGTCTGTCCCGGGGATCTGTTGACTGG
      L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCACCTCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCTTCGCATGAAGCTTCCGAAATCTGCCAAACCTGTGGCCA
TAGTGGAGGGTCTTGGACGTTGACCTCTCGGAAGCGTACTTCAAGGCTTTAGACGGTTTGGACACCGGT
      I T S Q N L Q L E S L R M K L P K S A K P V A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
AGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATGTCCATGGATAACATGCTCCTTGGGCCTGTGAA
TCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATACAGGTACCTATTGTACGAGGAACCCGGACACTT
      K F V A A W T L K A A A M S M D N M L L G P V K>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GAACGTTACCAAGTACGGCAACATGACCCAGGACCATGTGATGCATCTGCTCACGAGGTCTGGACCCCTG
CTTGCAATGGTTTCATGCCGTTGACTGGTCTCTGGTACACTACGTAGACGAGTGTCCAGACCTGGGGAC
      N V T K Y G N M T Q D H V M H L L T R S G P L>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
GAGTACCCGACGCTGAAGGGGACCTTCCAGAGAATCTGAAGCATCTTAAGAACTCCATGGATGGCGTGA
CTCATGGGCGTGCAGCTTCCCTGGAAGGGTCTCTTAGACTTCGTAGAATTCTTGAGGTACCTACCGCACT
      E Y P Q L K G T F P E N L K H L K N S M D G V>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
ACTGGAAGATCTTCGAGAGCTGGATGAAGCAGTGGCTCTGTTTGAGATGAGCAAGAACTCCCTGGAGGA
TGACCTTCTAGAAGCTCTCGACCTACTTCGTCACCGAGAACAACCTCTACTCGTTCTTGAGGGACCTCCT
      N W K I F E S W M K Q W L L F E M S K N S L E E>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
GAAGAAGCCCACCGAGGCTCCACCTAAAGAGCCACTGGACATGGAAGACCTATCTTCTGGCCTGGGAGTG
CTTCTCGGGTGGCTCCGAGGTGGATTCTCGGTGACCTGTACCTCTGGATAGAAGACCGGACCCTCAC
      K K P T E A P P K E P L D M E D L S S G L G V>

      640     650     660
      *      *      *
ACCAGGCAGGAACTGGGTCAAGTCACCCTGTGAGGTACC
TGGTCCGTCCTTGACCCAGTTCAGTGGGACACTCCATGG
      T R Q E L G Q V T L *>

```

FIG. 1

ES 2 371 432 T3

```
      10      20      30      40      50      60      70
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCCATACTGGGCA
CGATCGCGGCGGTGGTACCTACTGGTTGCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCCGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTGGTGGCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCCACGTGCGCACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCACCGAGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GCTCTTGGCTGGGCAGGCCACCACTGCTTACTTCTGTACCAGCAACAGGGCCGCCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCGTCCGGTGGTGACGAATGAAGGACATGGTTCGTTGTCCCGGCGGATCTGTTTCGACTGG
L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATCACCTCCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTC
TAGTGGAGGGTCTTGGACGTTGACCTCTCGGAAGCGTACTTCGAATAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAG
I T S Q N L Q L E S L R M K L I S Q A V H A A>

      290     300     310     320     330     340     350
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTT
TGCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGGTTCGAATAGCGGGAGGTTTGCGAGGATAGGACAAGAA
H A E I N E A G R T P P A Y R P P N A P I L F F>

      360     370     380     390     400     410     420
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAG
AGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGGGACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTC
L L T R I L T I P Q S L D A K F V A A W T L K>

      430
*   *   *
GCTGCCGCTTGAGGTACC
CGACGGCGAACTCCATGG
A A A *>
```

FIG 2

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
* * * * *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCCATACTGGGCA
CGATCGCGGGCGGTGGTACCTACTGGTTGCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
* * * * *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCCGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTGGTGGCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCCACGTCCGCACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCACCGAGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
* * * * *
GCTCTTGGCTGGGCAGGCCACCACTGCTTACTTCTGTACCAGCAACAGGGCCGCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCGTCCGGTGGTGACGAATGAAGGACATGGTCGTTGTCCCGGCGGATCTGTTGACTGG
      L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
* * * * *
ATCACCTCCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCCTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTC
TAGTGGAGGGTCTTGGACGTTGACCTCTCGGAAGCGTACTTCGAATAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAG
      I T S Q N L Q L E S L R M K L I S Q A V H A A>

      290     300     310     320     330     340     350
* * * * *
ACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTT
TGCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGGTGCAATAGCGGGAGGTTTGCAGGATAGGACAAGAA
      H A E I N E A G R T P P A Y R P P N A P I L F F>

      360     370     380     390     400     410     420
* * * * *
TCTGCTGACCAGAATCCTGACCAATCCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCTGAAG
AGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGGGACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTC
      L L T R I L T T P Q S L D A K F V A A W T L K>

      430     440     450     460     470     480     490
* * * * *
GCTGCCGCTATGTCCATGGATAACATGCTCCTTGGGCCTGTGAAGAACGTTACCAAGTACGGCAACATGA
CGACGGCGATACAGGTACCTATTGTACGAGGAACCCGGACACTTCTTGCAATGGTTTCATGCCGTTGACT
      A A A M S M D N M L L G P V K N V T K Y G N M>

      500     510     520     530     540     550     560
* * * * *
CCCAGGACCATGTGATGCATCTGCTCAGGAGGTCTGGACCCCTGGAGTACCCGCGAGCTGAAGGGGACCTT
GGGTCTGGTACACTACGTAGACGAGTGCTCCAGACCTGGGGACCTCATGGGCGTTCGACTTCCCCTGGAA
      T Q D H V M H L L T R S G P L E Y P Q L K G T F>

      570     580     590     600     610     620     630
* * * * *
CCCAGAGAATCTGAAGCATCTTAAGAACTCCATGGATGGCGTGAAGTGAAGATCTTCGAGAGCTGGATG
GGGTCTCTTAGACTTCGTAGAATTCTTGAGGTACCTACCGCACTTGACCTTCTAGAAGCTCTCGACCTAC
      P E N L K H L K N S M D G V N W K I F E S W M>

```

FIG 3

```

        640      650      660      670      680      690      700
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AAGCAGTGGCTCTGTGTTGAGATGAGCAAGAAGCTCCCTGGAGGAGAAGAAGCCACCGAGGCTCCACCTA
TTCGTCACCGAGAACAAGCTCTACTCGTTCCTTGAGGGACCTCCTCTTCTTCGGGTGGCTCCGAGGTGGAT
  K  Q  W  L  L  F  E  M  S  K  N  S  L  E  E  K  K  P  T  E  A  P  P>

        710      720      730      740      750      760      770
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AAGAGCCACTGGACATGGAAGACCTATCTTCTGGCCTGGGAGTGACCAGGCAGGAAGCTGGGTCAAGTCAC
TTCTCGGTGACCTGTACCTTCTGGATAGAAGACCGGACCCCTCACTGGTCCGTCCTTGACCCAGTTCAGTG
  K  E  P  L  D  M  E  D  L  S  S  G  L  G  V  T  R  Q  E  L  G  Q  V  T>

        780
    *   *
CCTGTGAGGTACC
GGACACTCCATGG
  L  *>

```

FIG 3 CONTINUACION

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCC
CGATCGCGGCGGTGGTACCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCAGAGGAATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCC
CCAGGTCTCCTTAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAGTGCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCCAGTCC
TCGAATAGCGGGAGGTTTGCAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGG
  A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTAACCAACATGTTGATCCCCATTGCTG
GACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATTGTTGTACAACACTAGGGGTAACGAC
  L D A K F V A A W T L K A A A N N M L I P I A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGCGGTGCCCTGGCAGGGCTGGTCTCATCGTCTCATTGCCTACCTCATTGGCAGGAAGAGGAGTCA
ACCCGCCACGGGACCGTCCCGACCAGGAGTAGCAGGAGTAACGGATGGAGTAACCGTCTTCTCCTCAGT
  V G G A L A G L V L I V L I A Y L I G R K R S H>

      360     370
      *      *      *      *
CGCCGGCTATCAGACCATCTAGGGTACC
GCGGCCGATAGTCTGGTAGATCCCATGG
  A G Y Q T I *>

```

FIG 4

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
* * * * *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCG
CGATCGCGCGGTGGTACCCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100      110      120      130      140
* * * * *
GGTCCAGAGGAATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCC
CCAGGTCTCCTTAGTCCGTCGACACGTGCGGCGAGTGCAGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A R A E I N E A G R T P P>

      150      160      170      180      190      200      210
* * * * *
AGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCCAGTCC
TCGAATAGCGGGAGGTTTGGGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGG
A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220      230      240      250      260      270      280
* * * * *
CTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTAACAACATGTTGATCCCCATTGCTG
GACCTCGCGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTCCCGACGGCGATTGTTGTACAACCTAGGGGTAACGAC
L D A K F V A A W T L K A A A N N M L I P I A>

      290      300      310      320      330      340      350
* * * * *
TGGGCGGTGCCCTGGCAGGGCTGGTCTCATCGTCCTCATTGCCTACCTCATTGGCAGGAAGAGGAGTCA
ACCCGCCACGGGACCGTCCCGACCAGGAGTAGCAGGAGTAACGGATGGAGTAACCGTCCTTCTCCTCAGT
V G G A L A G L V L I V L I A Y L I G R K R S H>

      360      370
* * * * *
CGCCGGCTATCAGACCATCTAGGGTACC
GCGGCCGATAGTCTGGTAGATCCCATGG
A G Y Q T I *>

```

FIG 5

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
* * * * *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGCGCTGGGAGGGCCCCCTGGGTGGTGGCTCTGTTGGTGAACCTCATGAGGC
CGATCGCGGCGGGTGGTACCCGCGACCTCCCCGGGGGACCCACCACCGAGACAACCACTTGGAGTACTCCG
      M G A G R A P W V V A L L V N L M R>

      80      90      100      110      120      130      140
* * * * *
TTGATTCCATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCCAGC
ACCTAAGGTAGTCGGTCCGACACGTGCGGCGAGTGGCGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGGAGGTCCG
L D S I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P A>

      150      160      170      180      190      200      210
* * * * *
TTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATCCCCCAGTCCCTG
AATAGCGGGAGGTTTTCGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTTCAGGGAC
Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S L>

      220      230      240      250      260      270      280
* * * * *
GACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATACTGAGTGGAGCTGCAGTGTTCCTGC
CTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATATGACTCACCTCGACGTCACAAGGACG
D A K F V A A W T L K A A A I L S G A A V F L>

      290      300      310      320      330      340      350
* * * * *
TTGGGCTGATTGTCTTCCTGGTGGGGGTTGTTATCCATCTCAAGGCTCAGAAAGCATCTGTGGAGACTCA
AACCCGACTAACAGAAGGACCACCCCAACAATAGGTAGAGTTCAGTCTTTCGTAGACACCTCTGAGT
L G L I V F L V G V V I H L K A Q K A S V E T Q>

      360      370      380      390      400      410      420
* * * * *
GCCTGGCAATGAGAGTAGGTCCCGGATGATGGAGCGGCTAACCAAGTTCAGGCTGGACCGGGACATGTC
CGGACCGTTACTCTCATCCAGGGCCTACTACCTCGCCGATTGGTTCAAGTTCGACCTGGCCCTGTACAG
P G N E S R S R M M E R L T K F K A G P G E V>

      430
* *
ACATGAGGTACC
TGTA CTCCATGG
T *>

```

FIG 6

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAJTTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATGAGTCTTCTAA
CGATCGCGCGGGTGGTACCGGTTCAAGCACCCGACCGACCTGGGACTTCCGACGGCGATACTCAGAAGATT
      M A K F V A A W T L K A A A M S L L>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
CCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACT
GGCTCCAGCTTTGCATGCAAGAGAGATAGTAGGGTAGTCCGGGGGAGTTTCGGCTCTAGCGCGTCTCTGA
T E V E T Y V L S I I P S G P L K A E I A Q R L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
TGAGGATGTTTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATC
ACTCCTACAAAAACGTCCCTTCTGTGTCTAGAACTCCGAGAGTACCTTACCGATTCTGTCTGGTITAG
E D V F A G K N T D L E A L M E W L K T R P I>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGTACCTCTGACTAAGGGAATTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCCTGCCAGTGAGCGGAGGACTGC
GACAGTGGAGACTGATTCCTTAAATCCCAAACACAAGTGGAGTGGCACGGGTCACTCGCTCCTGACG
L S P L T K G I L G F V F T L T V P S E R G L>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
AGCGTAGACGATTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAA
TCGCATCTGCTAAACAGGTTTACGGGATTTACCCTTACCTCTGGGTTTGTGTACCTGTCCCGTCAATT
Q R R R F V Q N A L N G N G D P N N M D R A V K>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
ACTATAAAGAAGCTGAAGAGGGAAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACT
TGATATGTTCTTCGACTTCTCCCTTACTGTAAGGTACCTCGTTTCCCTTCAACGTTGAGTCAATGAGTTGA
L Y K K L K R E M T F H G A K E V A L S Y S T>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
GGTGGCTTGCAGTTGCATGGCTCTCATATAACCCGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTCTTG
CCACGGAAACGGTCAACGTACCCAGAGTATATGTTGGCCTACCCTTGTCACTGGTGTCTTACCAGAGAAC
G A L A S C M G L I Y N R M G T V T T E V A L>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
GCCTAGTATGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCTGATGCCCAACATCGGTCCCACAGGCAGATGGCGACTAC
CGGATCATAACGGTGAACACTCGTCTAACGACTACGGGTTGTAGCCAGGGTGTCCGTCTACCGCTGATG
G L V C A T C E Q I A D A Q H R S H R Q M A T T>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
CACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCTAAGGCCATGGAGCAA
GTGGTTGGGTGATTAGTCCGTACTCTGTCTTACCATGATCGGTCGTGATGCOGATTCCGGTACCTCGTT
T N P L I R E E N R M V L A S T T A K A M E Q>

      640     650     660     670     680     690     700
      *      *      *      *      *      *      *
ATGGCTGGATCAAGTGAGCAGGCAGCAGAGGCCATGGAAGTCGCAAGTCAGGCTAGACAAATGGTGCAGG
TACCGACCTAGTTCACTCGTCCCTCGTCTCCGGTACCTTACGGTTCAGGCTCAGTCCGATCTGTTTACCAGTCC
M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R Q M V Q>

```

FIG 7

```
      710      720      730      740      750      760      770
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CAATGAGGACAATTGGGACTCACCCCTAGCTCCAGTGCAGGTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTTGCA
GTTACTCCTGTTAACCCTGAGTGGGATCGAGGTCACGTCCAGATTTTCTACTAGAATAACTTTTAAACGT
A M R T I G T H P S S S A G L K D D L I E N L Q>

      780      790      800      810
*   *   *   *   *   *   *   *   *
GGCTTACCAGAAAACGGATGGGGGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA
CCGAATGGTCTTTGCCTACCCCCACGTCTACGTCGCTAAGTTCACT
A Y Q K R M G V Q M Q R F K *>
```

5

FIG 7 continuación

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTCTCGAGATTGGGG
CGATCGCGCGGGTGGTACCGGTCAAGCACCGACCGACTGGGACTTCCGACGGCGAGAGCTCTAACCCC
      M A K F V A A W T L K A A A L E I G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GACCCTGCCTGAACGCCGAGAACATCACATCAGGATTCTAGGACCCCTTCTCGTGTACAGGGCGGGGTT
CTGGGACGGACTTGGCGCTCTTGTAGTGTAGTCCTAAGGATCCTGGGGAAGAGCACAATGTCCGCCCAA
G P C L N A E N I T S G F L G P L L V L Q A G F>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
TTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTA
AAAGAACAACCTGTTCTTAGGAGTGTATGGCGTCTCAGATCTGAGCACCACTGAAGAGAGTTAAAAGAT
F L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N F L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTGTG
CCCCCTTGATGGCACACAGAACCGGTTTTAAGCGTCCAGGGTGGAGGTTAGTGAGTGGTTGGAGAACAG
G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H S P T S C>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CTCCAACCTGTCTGCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGCGTTTTATCATCTTCTCTTCACTCTGCTGCT
GAGGTGAACAGGACCAATAGCGACCTACACAGACGCCGAAAATAGTAGAAGGAGAAGTAGGACGACGA
P P T C P G Y R W M C L R R F I I F L F I L L L>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
ATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGA
TACGGAGTAGAAGAACAACCAAGAAGACCTGATAGTTCCATACAACGGGCAAACAGGAGATTAAGGTCTC
C L I F L L V L L D Y Q G M L P V C P L I P G>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
TCCTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCT
AGGAGTTGTTGGTCGTGCCCTGGTACGGCCTGGACGTACTGATGACGAGTTCCTTGGAGATACATAGGGA
S S T T S T G P C R T C M T T A Q G T S M Y P>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
CCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGG
GGACAACGACATGGTTTGAAGCCTGCCTTTAACGTGGACATAAGGGTAGGGTAGTAGGACCCGAAAGCC
S C C C T K P S D G N C T C I P I P S S W A F G>

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGG
TTTTAAGGATACCTCACC CGGAGTCGGGCAAAGAGGACCGAGTCAAATGATCAGGTAACAAGTCACC
K F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V Q W>

```

FIG 8

```

        640      650      660      670      680      690      700
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATGGGGGCCAAGTCTGT
AAGCATCCCGAAAGGGGGTGACAAACCGAAAGTCAATATACCTACTACACCATAACCCCCGGTTCAGACA
F V G L S P T V W L S V I W M M W Y W G P S L>

        710      720      730      740      750      760      770
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ACAGCATCTTGAGTCCCTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACCT
TGTCGTAGAACTCAGGGAAAAATGGCGACAATGGTTAAAAGAAAACAGAAACCCATATGTAAATTGGGA
Y S I L S P F L P L L P I F F C L W V Y I *>

        780      790      800
    *   *   *   *   *
AACAAAACAAAGAGATGGGGTTACTCTCTAA
TTGTTTIGTTTCTCTACCCCAATGAGAGATT

```

FIG 8 Continuación

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGCCAGGGGGTCTAGAAGCCCTCAGAGCCCTGCCCTCTCCTCTTCTTTCAT
CGATCGCGCGCGGTGGTACGGTCCCCCAGATCTTCGGGAGTCTCCGGACCGGAGAGGAGGAGAAGAACAGTA
      M P C G L E A L R A L P L L L F L S>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCCTGTTTGGGTCCCGATGCCAGGCCATCAGCCAGGCTGTGCACGGCCGCTCAGGCCGAAATCAACGA
TGGGACAAACCCAGGGCTACGGTCCGGTAGTCCGGTCCGACACGTGCGGCGAGTCCGGCTTTAGTTGCT
Y A C L G P G C Q A I S Q A V H A A H A E I N E>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGTGGAAGAACCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGGCTCCTATCCTGTCTTTCTGCTGACCAGAATC
TCGACCTTCTTGGGAGGTCSAATAGCGGAGGTTTTCGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAG
  A G R T P P A Y R P P N A P I L F F L L T R L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CTCACAAATCCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCCTGAAGGGCTGCCCGCTGGGATCA
GACTGTTAGGGGGTCCAGGACCTGCCGTTCAAGCACCGGACCGGACTTCCGACGGGCGACCCCTAGT
  L T I P Q S L D A K F V A A W T L K A A A G I>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TCTTGCTGTCTGTGCACTGGTCCAGGGACCGTGCCTGCTATTTCAGGAAACGGTGGCAAAATGAGAAGTT
AGAACGACAAGACACGTCAACCAGGTCCTCCCTGGCAGGACGATAAGTCTTTGCCACCGTTTTACTCTTCAA
I L L F C A V V P G T L L L F R K R W Q N E K F>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGGTGGACATGCCAGATGACTATGAAGATGAAAATCTCTATGAGGGCCCTGAACCTTGATGACTGTCT
ACCCACCTGTACGGTCTACTGATACTTCTACTTTTACAGATACTCCCGGACTTGGAACTACTGACAAGA
  G V D H P D D Y E D E N L Y E G L N L D D C S>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTATGAGGACATCTCCAGGGACTCCAGGGCACCTACCAGGATGTGGGCAACCTCCACATGGAGATG
TACATACTCCTGTAGAGGTCCCGTGGATGGTCCCTACACCCGTTGGAGGTGTAACCTCTAC
  M Y E D I S R G L Q G T Y Q D V G N L H I G D>

      500     510
      *      *
CCCAGCTGAAAAGCCATGAGGTACC
GGTCCGACCTTTTCGGTACTCCATGG
A Q L E K P *>

```

FIG. 9

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGCCACACTGGTGCTGCTTCCATGCCCTGCCACTGGCTGTGTTCCTGCTGC
CGATCGCGCGCGGTGGTACCGGTGTGACCACGACAGAAGGTACGGGACGGTGACCGACAACAAGGACGACC
      H A T L V L S S M P C H W L L F L L>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
TGCTCTTCTCAGGTGAGCCGATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAG
ACGAGAAGAGTCCACTCGGCTAGTCCGTCCGACACGTGCCGCCGAGTGCCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTC
L L F S G E P I S Q A V H A A H A E I N E A G R>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCAAACGCTCCTATCCTGTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAATC
TTGGGGAGTCCGAATAGCGGGAGGTTTCCGAGGATAGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAG
      T P P A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATTATCTTGATCCAGA
GGGCTCAGGGACCTCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATAATAGAACTAGGTCT
      P Q S L D A K F V A A W T L K A A A I I L I Q>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CCCTCCTCATCATCTCTTCATCATTGTGCCCATCTTCTGCTACTTGACAAGGATGACGGCAAGGCTGG
GGGAGGAGTAGTAGGAGAAGTAGTAACACGGGTAGAAGGACGATGAACTGTTCTACTGCCGTTCCGACC
      T L L I I L F I I V P I F L L L D K D D G K A G>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GATGGAGGAAGATCACACCTATGAGGGCTTGAACATTGACCAGACAGCCACCTATGAAGACATAGTGACT
CTACCTCCTTCTAGTGTGGATACTCCCGAAGTTGTAAGTGGTCTGTCCGGTGGATACTTCTGTATCACTGA
      M E E D H T Y E G L N I D Q T A T Y E D I V T>

      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CTTCGGACAGGGGAGGTAAAGTGGTGGTAGGAGAGCATCCAGGCCAGGAATGAGGTACC
GAAGCCTGTCCCTCCATTTCCAGCCATCCTCTCGTAGGTCCGGTCTTACTCCATGG
      L R T G E V K W S V G E H P G Q E *>

```

FIG 10

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCG
CGATCGCGCGCGGTGGTACCCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCCGACAAAGACGAGGAGGACACCCACCGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCCGAGGAATCAGCCAGGCTGTGCACGCCCGTCACGCCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCTCC
CCAGGGCTCCTTAGTCCGTCCGACACGTCCGGCGAGTCCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTTTCTGCTGACCAGAATCCTGACAAATCCCCCAGTCC
TCCAATAGCGGGAGGTTTGGGAGGATAGGACAAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGG
A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220     230     240     250     260
      *      *      *      *      *
CTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCCTGGACCCTGAAGCCTGCCGCTTGAGGTACC
GACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACCGCGAACTCCATGG
L D A K F V A A W T L K A A A *>

```

FIG 11

ES 2 371 432 T3

TTCCCAG	ATG	CAC	AGG	AGG	AGA	AGC	AGG	AGC	TGT	CGG	GAA	GAT	CAG	AAG	49	
	Met	His	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Ser	Cys	Arg	Glu	Asp	Gln	Lys		
	1				5					10						
CCA	GTC	ATG	GAT	GAC	CAG	CGC	GAC	CTT	ATC	TCC	AAC	AAT	GAG	CAA	CTG	97
Pro	Val	Met	Asp	Asp	Gln	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Asn	Glu	Gln	Leu	
15					20					25					30	
CCC	ATG	CTG	GGC	CGG	CGC	CCT	GGG	GCC	CCG	GAG	AGC	AAG	TGC	AGC	CGC	145
Pro	Met	Leu	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Glu	Ser	Lys	Cys	Ser	Arg	
				35				40						45		
GGA	GCC	CTG	TAC	ACA	GGC	TTT	TCC	ATC	CTG	GTG	ACT	CTG	CTC	CTC	GCT	193
Gly	Ala	Leu	Tyr	Thr	Gly	Phe	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	
			50					55					60			
GGC	CAG	GCC	ACC	ACC	GCC	TAC	TTC	CTG	TAC	CAG	CAG	CAG	GGC	CGG	CTG	241
Gly	Gln	Ala	Thr	Thr	Ala	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gln	Gln	Gly	Arg	Leu	
		65					70						75			
GAC	AAA	CTG	ACA	GTC	ACC	TCC	CAG	AAC	CTG	CAG	CTG	GAG	AAC	CTG	CGC	289
Asp	Lys	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	
	80					85						90				
ATG	AAG	CTT	CCC	AAG	CCT	CCC	AAG	CCT	GTG	AGC	AAG	ATG	CGC	ATG	GCC	337
Met	Lys	Leu	Pro	Lys	Pro	Pro	Lys	Pro	Val	Ser	Lys	Met	Arg	Met	Ala	
95					100					105					110	
ACC	CCG	CTG	CTG	ATG	CAG	GCG	CTG	CCC	ATG	GGA	GCC	CTG	CCC	CAG	GGG	385
Thr	Pro	Leu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Leu	Pro	Gln	Gly	
				115				120						125		
CCC	ATG	CAG	AAT	GCC	ACC	AAG	TAT	GGC	AAC	ATG	ACA	GAG	GAC	CAT	GTG	433
Pro	Met	Gln	Asn	Ala	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asn	Met	Thr	Glu	Asp	His	Val	
			130					135					140			
ATG	CAC	CTG	CTC	CAG	AAT	GCT	GAC	CCC	CTG	AAG	GTG	TAC	CCG	CCA	CTG	481
Met	His	Leu	Leu	Gln	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	
		145				150						155				
AAG	GGG	AGC	TTC	CCG	GAG	AAC	CTG	AGA	CAC	CTT	AAG	AAC	ACC	ATG	GAG	529
Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Met	Glu	
	160					165					170					
ACC	ATA	GAC	TGG	AAG	GTC	TTT	GAG	AGC	TGG	ATG	CAC	CAT	TGG	CTC	CTG	577
Thr	Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Phe	Glu	Ser	Trp	Met	His	His	Trp	Leu	Leu	
175				180					185					190		

FIG 12

ES 2 371 432 T3

TTT GAA ATG AGC AGG CAC TCC TTG GAG CAA AAG CCC ACT GAC GCT CCA	625
Phe Glu Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro	
195 200 205	
CCG AAA GAG TCA CTG GAA CTG GAG GAC CCG TCT TCT GGG CTG GGT GTG	673
Pro Lys Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val	
210 215 220	
ACC AAG CAG GAT CTG GGC CCA GTC CCC ATG TGAGAGCAGC AGAGGCGGTC	723
Thr Lys Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met	
225 230	

5

FIG 12 Continuación

ES 2 371 432 T3

CCGCCTCGGC	ATG	GCG	CCC	CGC	AGC	GCC	CGG	CGA	CCC	CTG	CTG	CTG	CTA	229		
	Met	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Arg	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu			
	1				5					10						
CTG	CCT	GTT	GCT	GCT	GCT	CGG	CCT	CAT	GCA	TTG	TCG	TCA	GCA	GCC	ATG	277
Leu	Pro	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	His	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Ala	Met	
	15					20					25					
TTT	ATG	GTG	AAA	AAT	GGC	AAC	GGG	ACC	GCG	TGC	ATA	ATG	GCC	AAC	TTC	325
Phe	Met	Val	Lys	Asn	Gly	Asn	Gly	Thr	Ala	Cys	Ile	Met	Ala	Asn	Phe	
	30				35					40					45	
TCT	GCT	GCC	TTC	TCA	GTG	AAC	TAC	GAC	ACC	AAG	AGT	GGC	CCC	AAG	AAC	373
Ser	Ala	Ala	Phe	Ser	Val	Asn	Tyr	Asp	Thr	Lys	Ser	Gly	Pro	Lys	Asn	
				50					55					60		
ATG	ACC	TTT	GAC	CTG	CCA	TCA	GAT	GCC	ACA	GTG	GTG	CTC	AAC	CGC	AGC	421
Met	Thr	Phe	Asp	Leu	Pro	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asn	Arg	Ser	
			65					70						75		
TCC	TGT	GGA	AAA	GAG	AAC	ACT	TCT	GAC	CCC	AGT	CTC	GTG	ATT	GCT	TTT	469
Ser	Cys	Gly	Lys	Glu	Asn	Thr	Ser	Asp	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Phe	
		80						85				90				
GGA	AGA	GGA	CAT	ACA	CTC	ACT	CTC	AAT	TTC	ACG	AGA	AAT	GCA	ACA	CGT	517
Gly	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Ala	Thr	Arg	
	95					100						105				
TAC	AGC	GTT	CAG	CTC	ATG	AGT	TTT	GTT	TAT	AAC	TTG	TCA	GAC	ACA	CAC	565
Tyr	Ser	Val	Gln	Leu	Met	Ser	Phe	Val	Tyr	Asn	Leu	Ser	Asp	Thr	His	
	110				115						120				125	
CTT	TTC	CCC	AAT	GCG	AGC	TCC	AAA	GAA	ATC	AAG	ACT	GTG	GAA	TCT	ATA	613
Leu	Phe	Pro	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	Ile	Lys	Thr	Val	Glu	Ser	Ile	
				130					135					140		
ACT	GAC	ATC	AGG	GCA	GAT	ATA	GAT	AAA	AAA	TAC	AGA	TGT	GTT	AGT	GGC	661
Thr	Asp	Ile	Arg	Ala	Asp	Ile	Asp	Lys	Lys	Tyr	Arg	Cys	Val	Ser	Gly	
			145					150					155			
ACC	CAG	GTC	CAC	ATG	AAC	AAC	GTG	ACC	GTA	ACG	CTC	CAT	GAT	GCC	ACC	709
Thr	Gln	Val	His	Met	Asn	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Leu	His	Asp	Ala	Thr	
		160					165					170				
ATC	CAG	GCG	TAC	CTT	TCC	AAC	AGC	AGC	TTC	AGC	AGG	GGA	GAG	ACA	CGC	757
Ile	Gln	Ala	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Gly	Glu	Thr	Arg	
	175					180					185					

FIG 13

ES 2 371 432 T3

TGT GAA CAA GAC AGG CCT TCC CCA ACC ACA GCG CCC CCT GCG CCA CCC	805
Cys Glu Gln Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro	
190 195 200 205	
AGC CCC TCG CCC TCA CCC GTG CCC AAG AGC CCC TCT GTG GAC AAG TAC	853
Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Ser Val Asp Lys Tyr	
210 215 220	
AAC GTG AGC GGC ACC AAC GGG ACC TGC CTG CTG GCC AGC ATG GGG CTG	901
Asn Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Leu Ala Ser Met Gly Leu	
225 230 235	
CAG CTG AAC CTC ACC TAT GAG AGG AAG GAC AAC ACG ACG GTG ACA AGG	949
Gln Leu Asn Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg	
240 245 250	
CTT CTC AAC ATC AAC CCC AAC AAG ACC TCG GCC AGC GGG AGC TGC GGC	997
Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly	
255 260 265	
GCC CAC CTG GTG ACT CTG GAG CTG CAC AGC GAG GGC ACC ACC GTC CTG	1045
Ala His Leu Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu	
270 275 280 285	
CTC TTC CAG TTC GGG ATG AAT GCA AGT TCT AGC CGG TTT TTC CTA CAA	1093
Leu Phe Gln Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln	
290 295 300	
GGA ATC CAG TTG AAT ACA ATT CTT CCT GAC GCC AGA GAC CCT GCC TTT	1141
Gly Ile Gln Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe	
305 310 315	
AAA GCT GCC AAC GGC TCC CTG CGA GCG CTG CAG GCC ACA GTC GGC AAT	1189
Lys Ala Ala Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn	
320 325 330	
TCC TAC AAG TGC AAC GCG GAG GAG CAC GTC CGT GTC ACG AAG GCG TTT	1237
Ser Tyr Lys Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe	
335 340 345	
TCA GTC AAT ATA TTC AAA GTG TGG GTC CAG GCT TTC AAG GTG GAA GGT	1285
Ser Val Asn Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly	
350 355 360 365	
GGC CAG TTT GGC TCT GTG GAG GAG TGT CTG CTG GAC GAG AAC AGC ACG	1333
Gly Gln Phe Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Thr	
370 375 380	

FIG 13 Continuación

ES 2 371 432 T3

CTG ATC CCC ATC GCT GTG GGT GGT GCC CTG GCG GGG CTG GTC CTC ATC	1381
Leu Ile Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile	
385 390 395	
GTC CTC ATC GCC TAC CTC GTC GGC AGG AAG AGG AGT CAC GCA GGC TAC	1429
Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr	
400 405 410	
CAG ACT ATC TAGCCTGGTG CACGCAGGCA CAGCAGCTGC AGGGGCCTCT	1478
Gln Thr Ile	
415	

FIG 13 Continuación

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
ATGATCACATTCCTGCCGCTGCTGCTGGGGCTCAGCCTGGGCTGCACAGGAGCAGGTGGCTTCGTGGCCC
TACTAGTGTAAAGGACGGCGACGACGACCCCGAGTCCGACCCGACGTGTCCTCGTCCACCGAAGCACCGGG
M I T F L P L L L G L S L G C T G A G G F V A>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTGGAAGCACCTGTCTGTGGATGATGCTGGGACTCCAAAGGATTCACATACTGCATCTCCTTCAA
TACACCTTTCGTGGACAGACAACCTACTACGACCCTGAGGTTTCCTAAAGTGTATGACGTAGAGGAAGTT
H V E S T C L L D D A G T P K D F T Y C I S F N>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
CAAGGATCTGCTGACCTGCTGGGATCCAGAGGAGAATAAGATGGCCCTTGCGAATTTGGGTTGCTGAAT
GTTCCCTAGACGACTGGACGACCCCTAGGTCTCTCTTATTCTACCGGGGAACGCTTAAACCCACGACTTA
K D L L T C W D P E E N K M A P C E F G V L N>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTGGCGAATGTCCTCTCACAGCACCTCAACCAAAAAGACACCCTGATGCAGCGCTTGGCGAATGGGC
TCGAACCGCTTACAGGAGAGTGTGCTGGAGTTGGTTTTCTGTGGGACTACGTCCGGAACGCGTTACCCG
S L A N V L S Q H L N Q K D T L M Q R L R N G>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TTCAGAATTGTGCCACACACACCCAGCCCTTCTGGGGATCACTGACCAACAGGACACGGCCACCATCTGT
AAGTCTTAAACACGGTGTGTGTGGGTCCGGGAAGACCCCTAGTGACTGGTTGTCCTGTGCCGGTGGTAGACA
L Q N C A T E T Q P F W G S L T N R T R P P S V>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GCAAGTAGCCAAAACCACTCTCTTTAACACGAGGGAGCCTGTGATGCTGGCCTGCTATGTGTGGGCTTC
CGTTCATCGGTTTTGGTGAGGAAAATTGTGCTCCCTCGGACACTACGACCCGACGATACACACCCCGAAG
Q V A K T T P F N T R E P V M L A C Y V W G F>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
TATCCAGCAGAAGTGACTATCACGTGGAGGAAGAACGGGAAGCTTGTCATGCCTCACAGCAGTGCGCACA
ATAGGTCGTCTTCACTGATAGTGCACCTCCTTCTTGCCCTTCGAACAGTACGGAGTGTGTCAGCGTGT
Y P A E V T I T W R K N G K L V M P H S S A H>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
AGACTGCCAGCCCAATGAGACTGGACATACCAGACCCTCTCCATTTAGCCTTAACCCCTCTTACGG
TCTGACGGTCCGGTTACCTCTGACCTGTATGGTCTGGGAGAGGTAATCGGAATTGGGGGAGAATGCC
K T A Q P N G D W T Y Q T L S H L A L T P S Y G>

```

FIG 14

ES 2 371 432 T3

```
      570      580      590      600      610      620      630
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GGACACTTACACCTGTGTGGTAGAGCACATTGGGGCTCCTGAGCCCATCCTTCGGGACTGGACACCTGGG
CCTGTGAATGTGGACACACCATCTCGTGTAAACCCGAGGACTCGGGTAGGAAGCCCTGACCTGTGGACCC
D T Y T C V V E H I G A P E P I L R D W T P G>

      640      650      660      670      680      690      700
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTGTCCCCCATGCAGACCCTGAAGGTTTCTGTGTCTGCAGTGA CTCTGGGCCTGGGCCTCATCATCTTCT
GACAGGGGGTACGTCTGGGACTTCCAAGACACAGACGTCAGTCTGAGACCCGGACCCGGAGTAGTAGAAGA
L S P M Q T L K V S V S A V T L G L G L I I F>

      710      720      730      740      750      760      770
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTCTTGGTGTGATCAGCTGGCGGAGAGCTGGCCACTCTAGTTACACTCCTCTTCCTGGGTCCCAATTATTC
GAGAACCACACTAGTCGACCCCTCTCGACCCGGTGAGATCAATGTGAGGAGAAGGACCCAGGTTAATAAG
S L G V I S W R R A G H S S Y T P L P G S N Y S>

      780      790
*   *   *   *
AGAAGGATGGCACATTTCTAG
TCTTCCTACCGTGTAAGGATC
E G W H I S *>
```

FIG 14 Continuación

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATGGGTTCTGGGTGGGTCCCCTGGGTGGTCTGCTAGTGAATCTGACCCAACGGATTCCCTCCATGA
TACCCAAGACCCACCCAGGGGACCCACCACCGAGACGATCACTTAGACTGGGTTGACCTAAGGAGGTACT
M G S G W V P W V V A L L V N L T Q L D S S M>

      80      90      100     110     120     130     140
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTCAAGGCACAGACTCTCCAGAAGATTTTGTGATTCAGGCAAAGGCTGACTGTTACTTCACCAACGGGAC
GAGTTCGGTGTCTGAGAGGTCTTCTAAAACACTAAGTCCGTTTCCGACTGACAATGAAGTGGTTGCCCTG
T Q G T D S P E D F V I Q A K A D C Y F T N G T>

      150     160     170     180     190     200     210
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AGAAAAGGTGCAGTTTGTGGTCAGATTCATCTTTAACTTGGAGGAGTATGTACGTTTCGACAGTGATGTG
TCTTTTCCACGTCAAACACCCAGTCTAAGTAGAAATTGAACCTCCTCATACATGCAAAGCTGCACTACAC
E K V Q F V V R F I F N L E E Y V R F D S D V>

      220     230     240     250     260     270     280
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GGGATGTTTGTGGCATTGACCAAGCTGGGGCAGCCAGATGCTGAGCAGTGGAAACAGCCGGCTGGATCTCT
CCCTACAAACACCCGTAACCTGCTGACCCCGTCGGTCTACGACTCGTCACCTTGTGCGCCGACCTAGAGA
G M F V A L T K L G Q P D A E Q W N S R L D L>

      290     300     310     320     330     340     350
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TGGAGAGGAGCAGACAGGCCGTGGATGGGGTCTGTAGACACAACACTACAGGCTGGGGCGCACCCCTTCACTGT
ACCTCTCCTCGTCTGTCCGGCACCTACCCAGACATCTGTGTTGATGTCCGACCCGCGTGGGAAGTGACA
L E R S R Q A V D G V C R H N Y R L G A P F T V>

      360     370     380     390     400     410     420
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GGGGAGAAAAGTGCACCAGAGGTGACAGTGTACCCAGAGAGGACCCCACTCCTGCACCAGCATAATCTG
CCCCTCTTTTACGTTGGTCTCCACTGTCCACATGGGTCTCTCCTGGGGTGAGGACGTGGTTCGTATTAGAC
G R K V Q P E V T V Y P E R T P L L H Q H N L>

      430     440     450     460     470     480     490
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTGCACTGCTCTGTGACAGGCTTCTATCCAGGGATATCAAGATCAAGTGGTTCCCTGAATGGGCAGGAGG
GACGTGACGAGACACTGTCCGAAGATAGTCCCTATAGTTCTAGTTCACCAAGGACTTACCCGTCCTCC
L H C S V T G F Y P G D I K I K W F L N G Q E>

      500     510     520     530     540     550     560
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

FIG 15

ES 2 371 432 T3

```
AGAGAGCTGGGGTCATGTCCACTGGCCCTATCAGGAATGGAGACTGGACCTTTCAGACTGTGGTGATGCT
TCTCTCGACCCCAGTACAGGTGACCGGGATAGTCTTACCTCTGACCTGGAAAGTCTGACACCACTACGA
E R A G V M S T G P I R N G D W T F Q T V V M L>

      570      580      590      600      610      620      630
      * * * * *
AGAAATGACTCCTGAACTTGGACATGTCTACACCTGCCTTGTGATCACTCCAGCCTGCTGAGCCCTGTT
TCTTTACTGAGGACTTGAACCTGTACAGATGTGGACGGAACAGCTAGTGAGGTCCGACGACTCGGGACAA
E M T P E L G H V Y T C L V D H S S L L S P V>

      640      650      660      670      680      690      700
      * * * * *
TCTGTGGAGTGGAGAGCTCAGTCTGAATATTCTTGGAGAAAGATGCTGAGTGGCATTGCAGCCTTCCTAC
AGACACCTCACCTCTCGAGTCAGACTTATAAGAACCTCTTCTACGACTCACCGTAACGTCGGAAGGATG
S V E W R A Q S E Y S W R K M L S G I A A F L>

      710      720      730      740      750      760      770
      * * * * *
TTGGGCTAATCTTCCTTCTGGTGGGAATCGTCATCCAGCTAAGGGCTCAGAAAGGATATGTGAGGACGCA
AACCCGATTAGAAGGAAGACCACCCCTTAGCAGTAGGTCGATTCCCGAGTCTTTCCTATACACTCCTGCGT
L G L I F L L V G I V I Q L R A Q K G Y V R T Q>

      780      790      800      810      820
      * * * * *
GATGTCTGGTAATGAGGTCTCAAGAGCTGTTCTGCTCCCTCAGTCATGCTAA
CTACAGACCACTACTCCAGAGTTCTCGACAAGACGAGGGAGTCAGTACGATT
M S G N E V S R A V L L P Q S C *>
```

```

      10      20      30      40      50      60      70
* * * * *
ATGCCTGGGGTCCAGGAGTCCTCCAAGCTCTGCCTGCCACCATCTTCCTCCTCTTCCTGCTGTCTGCTG
TACGGACCCCCAGGTCCCTCAGGAGGTTTCGAGACGGACGGTGGTAGAAGGAGGAGAAGGACGACAGACGAC
M P G G P G V L Q A L P A T I F L L F L L S A>

      80      90      100     110     120     130     140
* * * * *
TCTACCTGGGCCCTGGGTGCCAGGCCCTGTGGATGCACAAGGTCCCAGCATCATTGATGGTGAGCCTGGG
AGATGGACCCGGGACCCACGGTCCGGGACACCTACGTGTTCCAGGGTCGTAGTAACTACCACTCGGACCC
V Y L G P G C Q A L W M H K V P A S L M V S L G>

      150     160     170     180     190     200     210
* * * * *
GGAAGACGCCCCACTTCCAATGCCCGCACAATAGCAGCAACAACGCCAACGTACCTGGTGGCGCGTCCCTC
CCTTCTGCGGGTGAAGGTTACGGGGCGTGTATCGTTCGTTGTTGCGGTTGCAGTGGACCACCGCGCAGGAG
E D A H F Q C P H N S S N N A N V T W W R V L>

      220     230     240     250     260     270     280
* * * * *
CATGGCAACTACACGTGGCCCCCTGAGTTCCTGGGCCCCGGGCGAGGACCCCAATGGTACGCTGATCATCC
GTACCGTTGATGTGCACCCGGGGACTCAAGAACCCGGGCCCGCTCCTGGGGTTACCATGCGACTAGTAGG
H G N Y T W P P E F L G P G E D P N G T L I I>

      290     300     310     320     330     340     350
* * * * *
AGAATGTGAACAAGAGCCATGGGGGCATATACGTGTGCCGGGTCCAGGAGGGCAACGAGTCATACCAGCA
TCTTACACTTGTCTCGGTACCCCCGTATATGCACACGCCCCAGGTCCCTCCCGTTGCTCAGTATGGTCGT
Q N V N K S H G G I Y V C R V Q E G N E S Y Q Q>

      360     370     380     390     400     410     420
* * * * *
GTCCTGCGGCACCTACCTCCGCGTGCGCCAGCCGCCCCCCAGGCCCTTCCTGGACATGGGGGAGGGCACC
CAGGACCCCGTGGATGGAGGCGCACGCGGTCCGGCGGGGGTCCGGGAAGGACCTGTACCCCTCCCGTGG
S C G T Y L R V R Q P P P R P F L D M G E G T>

      430     440     450     460     470     480     490
* * * * *
AAGAACCGAATCATCACAGCCGAGGGGATCATCCTCCTGTTCTGCGCGGTGGTGCCTGGGACGCTGCTGC
TTCTTGGCTTAGTAGTGTCCGGCTCCCCTAGTAGGAGGACAAGACGCGCCACCACGGACCCTGCGACGACG
K N R I I T A E G I I L L F C A V V P G T L L>

```

FIG 16

```

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *      *
TGTT CAGGAAACGATGGCAGAACGAGAAGCTCGGGTTGGATGCCGGGGATGAATATGAAGATGAAAACCT
ACAAGTCCTTTGCTACCGTCTTGCTCTTCGAGCCCAACCTACGGCCCCTACTTATACTTCTACTTTTGGGA
L F R K R W Q N E K L G L D A G D E Y E D E N L>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *      *
TTATGAAGGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATGTATGAGGACATCTCCCGGGGCCTCCAGGGCACCTAC
AATACTTCCGGACTTGGACCTGCTGACGAGGTACATACTCCTGTAGAGGGCCCCGGAGGTCCCGTGGATG
Y E G L N L D D C S M Y E D I S R G L Q G T Y>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAGGATGTGGGCAGCCTCAACATAGGAGATGTCCAGCTGGAGAAGCCGTGACACCCCTACTCCTGCCAGG
GTCCTACACCCGTCCGGAGTTGTATCCTCTACAGGTCGACCTCTTCGGCACTGTGGGGATGAGGACGGTCC
Q D V G S L N I G D V Q L E K P *>

```

FIG 16 Continuación

ES 2 371 432 T3

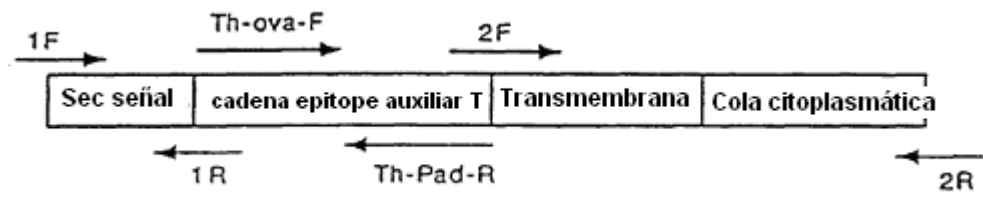
GAATTCCGCG GTGACC ATG GCC AGG CTG GCG TTG TCT CCT GTG CCC AGC	49
Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser	
1 5 10	
CAC TGG ATG GTG GCG TTG CTG CTG CTG CTC TCA GCT GAG CCA GTA CCA	97
His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro	
15 20 25	
GCA GCC AGA TCG GAG GAC CGG TAC CGG AAT CCC AAA GGT AGT GCT TGT	145
Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys	
30 35 40	
TCG CGG ATC TGG CAG AGC CCA CGT TTC ATA GCC AGG AAA CGG CGC TTC	193
Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Arg Phe	
45 50 55	
ACG GTG AAA ATG CAC TGC TAC ATG AAC AGC GCC TCC GGC AAT GTG AGC	241
Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser	
60 65 70 75	
TGG CTC TGG AAG CAG GAG ATG GAC GAG AAT CCC CAG CAG CTG AAG CTG	289
Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu	
80 85 90	
GAA AAG GGC CGC ATG GAA GAG TCC CAG AAC GAA TCT CTC GCC ACC CTC	337
Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu	
95 100 105	
ACC ATC CAA GGC ATC CGG TTT GAG GAC AAT GGC ATC TAC TTC TGC CAG	385
Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln	
110 115 120	
CAG AAG TGC AAC AAC ACC TCG GAG GTC TAC CAG GGC TGC GGC ACA GAG	433
Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu	
125 130 135	
CTG CGA GTC ATG GGA TTC AGC ACC TTG GCA CAG CTG AAG CAG AGG AAC	481
Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn	
140 145 150 155	
ACG CTG AAG GAT GGT ATC ATC ATG ATC CAG ACG CTG CTG ATC ATC CTC	529
Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu	
160 165 170	

FIG 17

ES 2 371 432 T3

TTC ATC ATC GTG CCT ATC TTC CTG CTG CTG GAC AAG GAT GAC AGC AAG	577
Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys	
175 180 185	
GCT GGC ATG GAG GAA GAT CAC ACC TAC GAG GGC CTG GAC ATT GAC CAG	625
Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln	
190 195 200	
ACA GCC ACC TAT GAG GAC ATA GTG ACG CTG CGG ACA GGG GAA GTG AAG	673
Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys	
205 210 215	
TGG TCT GTA GGT GAG CAC CCA GGC CAG GAG TGAGAGCCAG GTCGCCCCAT	723
Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu	
220 225 230	

FIG 17 Continuación



5

FIG 18

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTT
CTGCCTAGCCCTCTAGAGGGCTAGGGGATACCAGCTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAA

      80      90      100     110     120     130     140
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACA
TTCGGTCATAGACGAGGGACGAACACACAACCTCCAGCGACTCATCACGCGCTCGTTTTAAATTCGATGT

      150     160     170     180     190     200     210
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCG
TGTTCGGTTCGAACTGGCTGTTAACGTACTTCTTAGACGAATCCCAATCCGCAAAACGGGACGAAGCGC

      220     230     240     250     260     270     280
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
TACATGCCCGGTCTATATGCGCAACTGTAACATAACTGATCAATAATTATCATTAGTTAATGCCCCAG

      290     300     310     320     330     340     350
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCG
TAATCAAGTATCGGGTATATACCTCAAGGCGCAATGTATTGAATGCCATTTACGGGGCGGACCGACTGGC

      360     370     380     390     400     410     420
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CCCAACGACCCCCGCCCAATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC
GGGTGCTGGGGGCGGGTAACTGCAGTTATTACTGCATACAAGGGTATCATTGCGGTTATCCCTGAAAGG

      430     440     450     460     470     480     490
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
TAACTGCAGTTACCCACCTGATAAATGCCATTTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTCACATAGTATACGG

      500     510     520     530     540     550     560
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA
TTCATGCGGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACGGGGCGGACCGTAATACGGGTCATGTACTGGAAT

      570     580     590     600     610     620     630
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC
ACCCTGAAAGGATGAACCGTCATGTAGATGCATAATCAGTAGCGATAATGGTACCCTACGCCAAAACCG

      640     650     660     670     680     690     700
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCAGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAA
TCATGTAGTTACCCGCACCTATCGCCAAACTGAGTGCCCTAAAGGTTTCAGAGGTGGGGTAACTGCAGTT

```

```

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACG
ACCCCTCAAACAAAACCGTGGTTTTAGTTGCCCTGAAAGGTTTTACAGCATTGTTGAGGCGGGGTAAC TGC

      780      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *      *
CAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
GTTTACCCGCCATCCGCACATGCCACCCTCCAGATATATTCTGCTCGAGAGACCGATTGATCTCTTGGGT

      850      860      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *      *      *
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGAGTAAGTACCG
GACGAATGACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTGACCGATCTCATTATGCGC

      920      930      940      950      960      970      980
      *      *      *      *      *      *      *
CCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTAT
GGATATCTCAGATATCCGGGTGGGGAACCGAAGAATACGTACGATATGACAAAACCGAACCCAGATA

      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *      *      *
ACACCCCGCTTCCCTCATGTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTAT
TGTGGGGGCGAAGGAGTACAATATCCACTACCATATCGAATCGGATATCCACACCCAATAACTGGTAATA

      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
      *      *      *      *      *      *      *
TGACCACTCCCCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTC
ACTGGTGAGGGGATAACCACTGCTATGAAAGGTAATGATTAGGTATTGTACCGAGAAACGGTGTGAGAG

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
      *      *      *      *      *      *      *
TTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGG
AAATAACCGATATACGGTTATGTGACAGGAAGTCTCTGACTGTGCCTGAGACATAAAAATGTCCTACCC

      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      *      *      *      *      *      *      *
TCTCATTTATTATTTACAAATTCACATATAACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAACA
AGAGTAAATAATAAATGTTTAAAGTGTATATGTTGTGGTGGCAGGGGTCACGGGCGTCAAAAATAATTTGT

      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
      *      *      *      *      *      *      *
TAACGTGGGATCTCCACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAG
ATTGCACCCTAGAGGTGCGCTTAGAGCCCATGCACAAGGCCTGTACCCGAGAAGAGGCCATCGCCGCCTC

      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
      *      *      *      *      *      *      *
CTTCTACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTCCTAAC
GAAGATGTAGGCTCGGGACGAGGTTACGGAGGTCGCTGAGTACCAGCGAGCCGTCGAGGAACGAGGATTG

```

FIG 19 Continuación

ES 2 371 432 T3

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
* * * * *
AGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCACCACCACCAGTGTGCCGCACAAGGCCGTGGCGGTA
TCACCTCCGGTCTGAATCCGTGTCGTCTACGGGTGGTGGTGCACACGGCGTGTTCGGGCACCGCCAT

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
* * * * *
GGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCGGGGAGCGGGCTTGACCCGCTGACGCATTGGAAGACTTAAGGCAG
CCCATACACAGACTTTTACTCGAGCCCTCGCCCGAACGTGGCGACTGCGTAAACCTTCTGAATCCGTC

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
* * * * *
CGGCAGAAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTGTTGTGTTCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGT
GCCGTCTTCTTCTACGTCCGTGCGACTCAACAACACACAGACTATTCTCAGTCTCCATTGAGGGCAACGCCA

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
* * * * *
GCTGTTAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGGCCACCAGACATAAT
CGACAATTGCCACCTCCCGTCACATCAGACTCGTCATGAGCAACGACGGCGCGCGGGTGTCTGTATTA

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
* * * * *
AGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGGCTAGCCGGCCTGAATTCGGATA
TCGACTGTCTGATTGTCTGACAAGGAAAGGTACCCAGAAAAGACGTCCGATCGGCCGGACTTAAGCCTAT

1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
* * * * *
TCCAAGCTTGATGAATAAAAAGATCAGAGCTCTAGTGATCTGTGTGTTGGTPTTTTGTGTGCTCGAGCCCC
AGGTTTCGAACTACTTATTTTCTAGTCTCGAGATCACTAGACACACAACCAAAAAACACACGAGCTCGGGG

1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
* * * * *
AGCTGGTTCCTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCA
TCGACCAAGAAAGGCGGAGTCTTCGGTATCTCGGGTGGCGTAGGGGTGCTACGGACGATAACAGAAGGGT

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
* * * * *
ATCCTCCCCTTGCTGTCTGCCCCACCCACCCCCAGAAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGAT
TAGGAGGGGGAACGACAGGACGGGGTGGGGTGGGGGTCTTATCTTACTGTGGATGAGTCTGTTACGCTA

1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
* * * * *
GCAATTCCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGG
CGTTAAAGGAGTAAAATAATCCTTTCCTGTACCCCTCACCGTGAAGGTCCCAGTTCCTTCCGTGCCCC

2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
* * * * *
AGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCGGTACC
TCCCCGTTTGTGCTACCGACCGTTGATCTTCCGTGTCAGCTCCGACTAGTCGCTCGAGATCGCCATGG

FIG 19 Continuación

ES 2 371 432 T3

```

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
      * * * * *
GGCATTAGTCTATGGCCGACTCTAGATTTTCTCCTTGCGGCCGCCCTAGATGCATGCTCGATCGACCTGC
CCGTAATCAGATACCGGCTGAGATCTAAAAGAGGAACGCCGGCGGGATCTACGTACGAGCTAGCTGGAGC

      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
      * * * * *
AGTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGG
TCAACCTGGACCCTCACCTGTGGACACCTCTCTTCCGTTTCACCTACAGTAACAGTGAGTTCACATACC

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310
      * * * * *
CCAGATCTCAAGCCTGCCACACCTCAAGCTAGCTTGACAACAAAAAGATTGTCTTTTCTGACCAGATGGA
GGTCTAGAGTTCGGACGGTGTGGAGTTCGATCGAACTGTGTTTTTCTAACAGAAAAGACTGGTCTACCT

      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380
      * * * * *
CGCGGCCACCCTCAAAGGCATCACCGCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAAACTGAC
GCGCCGGTGGGAGTTTTCCGTAGTGGCGCCCGTCCACTTATAGTTTAGGAGGAGCAAAAACCTTTGACTG

      2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450
      * * * * *
AATCTTAGCGCAGAAGTCATGCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACA
TTAGAATCGCGTCTTCAGTACGGGCGAAAACCTCTCCCTCATGAGTGGGGTTGTGACCGGGAGCGTCTGT

      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
      * * * * *
GCGAATTAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGCAAGCTAGCTTGGGTCTCCC
CGCTTAATTAAGGTCGTGTGACCGCCGGCAATGATCACCTAGGCTCGAGCGTTCGATCGAACCCAGAGGG

      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590
      * * * * *
TATAGTGAGTTCGTATTAATTTGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCT
ATATCACTCAGCATAATTAAGCTATTCGGTCATTTCGTCACCCAAGAGATCAATCGGTCTCTCGAGACGA

      2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660
      * * * * *
TATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCATTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTT
ATATATCTGGAGGGTGGCATGTGCGGATGGCGGGTAAACGCAGTTACCCCGCCTCAACAATGCTGTAAAA

      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730
      * * * * *
GGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATC
CCTTTCAGGGCAACTAAAACCAGGTTTTGTTGAGGGTAACTGCAGTTACCCACCTCTGAACCTTTAG

      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
      * * * * *
CCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATGATGTAAGTCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGAT
GGGCACTCAGTTTGGCGATAGGTGCGGGTAACTACATGACGGTTTTGGCGTAGTGGTACCATTATCGCTA

```

FIG 19 Continuación

ES 2 371 432 T3

```

      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870
      * * * * *
GACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCG
CTGATTATGCATCTACATGACGGTTCATCCTTTCCAGGGTATCCAGTACATGACCCGTATTACGGTCCGC

      2880      2890      2900      2910      2920      2930      2940
      * * * * *
GGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGT
CCGGTAAATGGCAGTAACTGCAGTTATCCCCCGCATGAACCGTATACTATGTGAACTACATGACGGTTC

      2950      2960      2970      2980      2990      3000      3010
      * * * * *
GGGCAGTTTACCGTAAATAGTCCACCCATTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAAC
CCCGTCAAATGGCATTATCAGGTGGGTAAGTGCAGTTACCTTTCCAGGGATAACCGCAATGATACCCTTG

      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080
      * * * * *
ATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGTCGTTGGGCGGTCCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAAGT
TATGCAGTAATAACTGCAGTTACCCGCCCCCAGCAACCCGCCAGTCGGTCCGCCCGTAAATGGCATTCA

      3090      3100      3110      3120      3130      3140      3150
      * * * * *
TATGTAACGCGGAACCTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAG
ATACATTGGCGCCTTGAGGTATATACCCGATACTTGATTACTGGGGCATTAACTAATGATAATTATTGATC

      3160      3170      3180      3190      3200      3210      3220
      * * * * *
TCAATAATCAATGTCCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCT
AGTTATTAGTTACAGGACGTAATTACTTAGCCGGTTGCGCGCCCTCTCCGCCAAACGCATAACCCGCGA

      3230      3240      3250      3260      3270      3280      3290
      * * * * *
CTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
GAAGGCGAAGGAGCGAGTGAAGTGAAGCGGAGCCAGCAAGCCGACGCGCTCGCCATAGTCGAGTGAG

      3300      3310      3320      3330      3340      3350      3360
      * * * * *
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAG
TTCCGCCATTATGCCAATAGGTGCTTAGTCCCCTATTGCGTCTTTCTTGTACTACTCGTTTTCCGGTC

      3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430
      * * * * *
CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC
GTTTTCCGGTCTTGGCATTTTTCCGGCGCAACGACCCGCAAAAAGGTATCCGAGGCGGGGGGACTGCTCG

      3440      3450      3460      3470      3480      3490      3500
      * * * * *
ATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCC
TAGTGTTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTTGGGCTGTCTGATATTTCTATGGTCCGCAAAGG

```

FIG 19 Continuación


```

      3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570
      * * * * *
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTC
GGGACCTTCGAGGGAGCACGCGAGAGGACAAGGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGGACAGGCGGAAAGAG

      3580      3590      3600      3610      3620      3630      3640
      * * * * *
CCTTCGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCT
GGAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTTACGAGTGCACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGA

      3650      3660      3670      3680      3690      3700      3710
      * * * * *
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCCAGCCGACCGCTGGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT
GGTTCGACCCGACACACGTGCTTGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGA

      3720      3730      3740      3750      3760      3770      3780
      * * * * *
TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
ACTCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCTCGGTGACCATTGTCTAATCGTCTCGC

      3790      3800      3810      3820      3830      3840      3850
      * * * * *
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT
TCCATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTACCACCGGATGATGCCGATGTGATCTTCTGTGATA

      3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920
      * * * * *
TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
AACCATAGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTCTCAACCATCGAGAACTAGGCCGTTTGT

      3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990
      * * * * *
AACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGGCGAGAAAAAAGGATCTCAA
TTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAAACAACGTTTCGTCGCTAATGCGCGTCTTTTTTTCTAGAGTT

      4000      4010      4020      4030      4040      4050      4060
      * * * * *
GAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTGG
CTTCTAGGAAACTAGAAAAGATGCCCCAGACTGCGAGTCACTTGCTTTGAGTGCAATTCCTAAAACC

      4070      4080      4090      4100      4110      4120      4130
      * * * * *
TCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCACGGG
AGTACTTGTTATTTTGACAGACGAATGTATTGTCTATTATGTTCCCCACAATACTCGGTATAAGTTGCC

      4140      4150      4160      4170      4180      4190      4200
      * * * * *
AAACGCTTGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCACATGGATGCTGATTATATGGGTATAAATGGGCTCG
TTTGCAGAACGAGCTCCGGCGCTAATTTAAGGTTGTACTACGACTAAATATACCCATATTTACCCGAGC

```

FIG 19 Continuación

```

      4210      4220      4230      4240      4250      4260      4270
      * * * * *
CGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTT
GCTATTACAGCCCCTTAGTCCACGCTGTTAGATAGCTAACATACCCTTCGGGCTACGCGGTCTCAACAAA

      4280      4290      4300      4310      4320      4330      4340
      * * * * *
CTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGG
GACTTTGTACCGTTTCCATCGCAACGGTTACTACAATGTCTACTCTACCAGTCTGATTTGACCGACTGCC

      4350      4360      4370      4380      4390      4400      4410
      * * * * *
AATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGC
TTAATAACGGAGAAGGCTGGTAGTTCGTAATAATAGGCATGAGGACTACTACGTACCAATGAGTGGTGACC

      4420      4430      4440      4450      4460      4470      4480
      * * * * *
GATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCG
CTAGGGGCCCTTTTGTGCTAAGGTCCATAATCTTCTTATAGGACTAAGTCCACTTTTATAACAACACTACGC

      4490      4500      4510      4520      4530      4540      4550
      * * * * *
CTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTAT
GACCGTCACAAGGACGCGGCCAACGTAAGCTAAGGACAAAACATTAACAGGAAAATTGTGCTAGCGCATA

      4560      4570      4580      4590      4600      4610      4620
      * * * * *
TTCGTCCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCG
AAGCAGAGCGAGTCCGCGTTAGTGCTTACTTATTGCCAAACCAACTACGCTCACTAAAACACTACTGCTCGC

      4630      4640      4650      4660      4670      4680      4690
      * * * * *
TAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTTCAGTC
ATTACCGACCGACAACCTTGTTCAGACCTTCTTTACGTATTTGAAAACGGTAAGAGTGGCCTAAGTCAG

      4700      4710      4720      4730      4740      4750      4760
      * * * * *
GTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATG
CAGTGAGTACCCTAAAGAGTGAACCTATTGGAATAAAAACCTGCTCCCCTTTAATTATCCAACATAACTAC

      4770      4780      4790      4800      4810      4820      4830
      * * * * *
TTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTC
AACCTGCTCAGCCTTAGCGTCTGGCTATGGTCCTAGAACGGTAGGATACCTTGACGGAGCCACTCAAAG

      4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900
      * * * * *
TCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAATAATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGCAAGTTT
AGGAAGTAATGCTTTGCGGAAAAGTTTTATACCATAACTATTAGGACTATACTTATTTAACGTCAAA

```

FIG 19 Continuación

```
      4910      4920      4930      4940      4950      4960      4970
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CATTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATCATGA
GTAAACTACGAGCTACTCAAAAAGATTAGTCTTAACCAATTAACCAACATTGTGACCGTCTCGTAGTACT

      4980      4990      5000      5010      5020      5030      5040
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT
CGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTTTTTATTGTTTATCCCCAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTCA

      5050
*   *
GCCACCTGACGTC
CGGTGGACTGCAG
```

5

FIG 19 Continuación

ES 2 371 432 T3

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCG
CGATCGCGGGCGGTGGTACCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCAGAGGACACACCCTGTGGAAGGCCGAATCCTGTATAAGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCTT
CCAGGTCTCCTGTGTGGGACACCTTCCGGCCTTAGGACATATTCCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGA
G S R G H T L W K A G I L Y K A K F V A A W T L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GAAGGCTGCCGCTTTCCTGCTAGCGATTCTTTCCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGACCCCTG
CTCCGACGGCGAAAGGACGGATCGCTAAAGAAAGGATCGCACTTCGACTGGGGTGACACGCACTGGGAC
K A A A F L P S D F F P S V K L T P L C V T L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
TATATGGATGACGTGGTGTCTGGGAGCCAGCATCACTTCGAGAAGCTGGGACTGTCCAGATACGTGG
ATATACCTACTGCACCACGACCCTCGGTCTAGTAGTTGAAGCTCTTCGACCCTGACAGGTCTATGCACC
Y M D D V V L G A S I I N F E K L G L S R Y V>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CTAGGCTGATCCTGAAGGAGCCTGTGCACGGCGTGTCCACCCTGCCAGAGACCACCGTGGTGAGGAGGAC
GATCCGACTAGGACTTCCTCGACACGTGCCGCACAGGTGGGACGGTCTCTGGTGGCACCCTCCTCCTG
A R L I L K E P V H G V S T L P E T T V V R R T>

      360     370     380     390     400     410
      *      *      *      *      *      *
CGTGTACTATGGAGTGCCTGTGTGGAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCTTTGTGGGTACC
GCACATGATACCTCACGGACACACCTTCACCGACTCGGACGACCACGGGAAACACCCATGG
V Y Y G V P V W K W L S L L V P F V G T>

```

FIG 20

```

10      20      30      40      50      60      70      *
* * * * *
GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCG
CGATCGCGGGCGGTGGTACCCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
* * * * *
GGTCCAGAGGACACACCCTGTGGAAGGCCGGAATCCTGTATAAGGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCT
CCAGGTCTCCTGTGTGGGACACCTTCCGGCCTTAGGACATATTCCGGTTC AAGCACCGACGGACCTGGGA
G S R G H T L W K A G I L Y K A K F V A A W T L>

      150     160     170     180     190     200     210
* * * * *
GAAGGCTGCCGCTTTCCTGCCTAGCGATTTCTTTCCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGACCCTG
CTTCCGACGGCGAAAGGACGGATCGCTAAAGAAAGGATCGCACTTCGACTGGGGTGACACGCACTGGGAC
K A A A F L P S D F F P S V K L T P L C V T L>

      220     230     240     250     260     270     280
* * * * *
TATATGGATGACGTGGTGTCTGGGAGTGGGACTGTCCAGGTACGTGGCTAGGCTGATCCTGAAGGAGCCTG
ATATACTACTGCACCACGACCCTCACCTGACAGGTCCATGCACCGATCCGACTAGGACTTCTCCTGGAC
Y M D D V V L G V G L S R Y V A R L I L K E P>

      290     300     310     320     330     340     350
* * * * *
TGCACGGCGTGTCCACCCTGCCAGAGACCACCGTGGTGAGGAGGACCGTGTACTATGGAGTGCCTGTGTG
ACGTGCCGCACAGGTGGGACGGTCTCTGGTGGCACCCTCCTCCTGGCACATGATACCTCACGGACACAC
V H G V S T L P E T T V V R R T V Y Y G V P V W>

      360     370     380     390
* * * * *
GAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCTTTGTGTGAGGTACC
CTTACCAGACTCGGACGACCACGGGAAACACACTCCATGG
K W L S L L V P F V *>

```

FIGURA 22

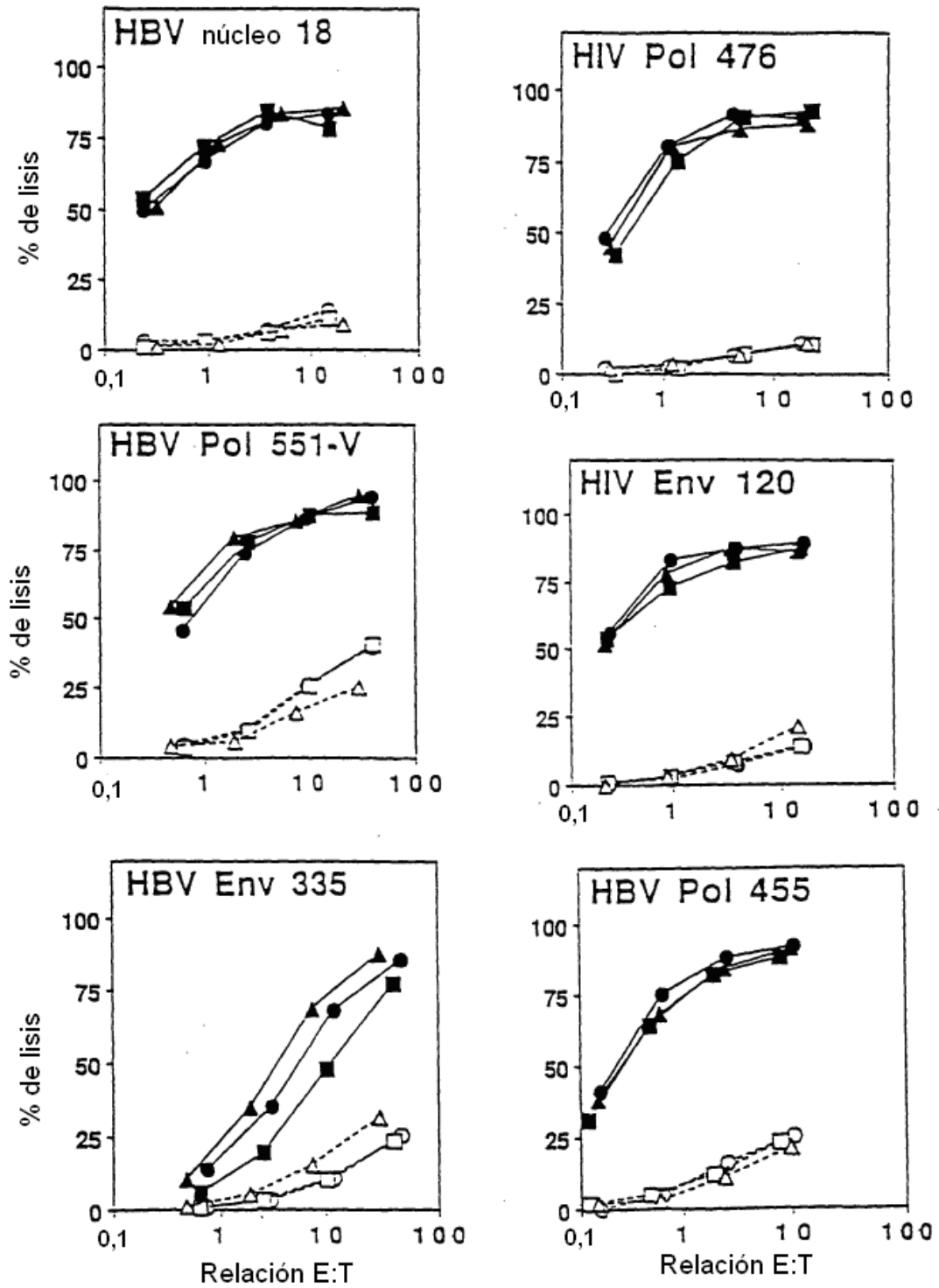


FIGURA 23

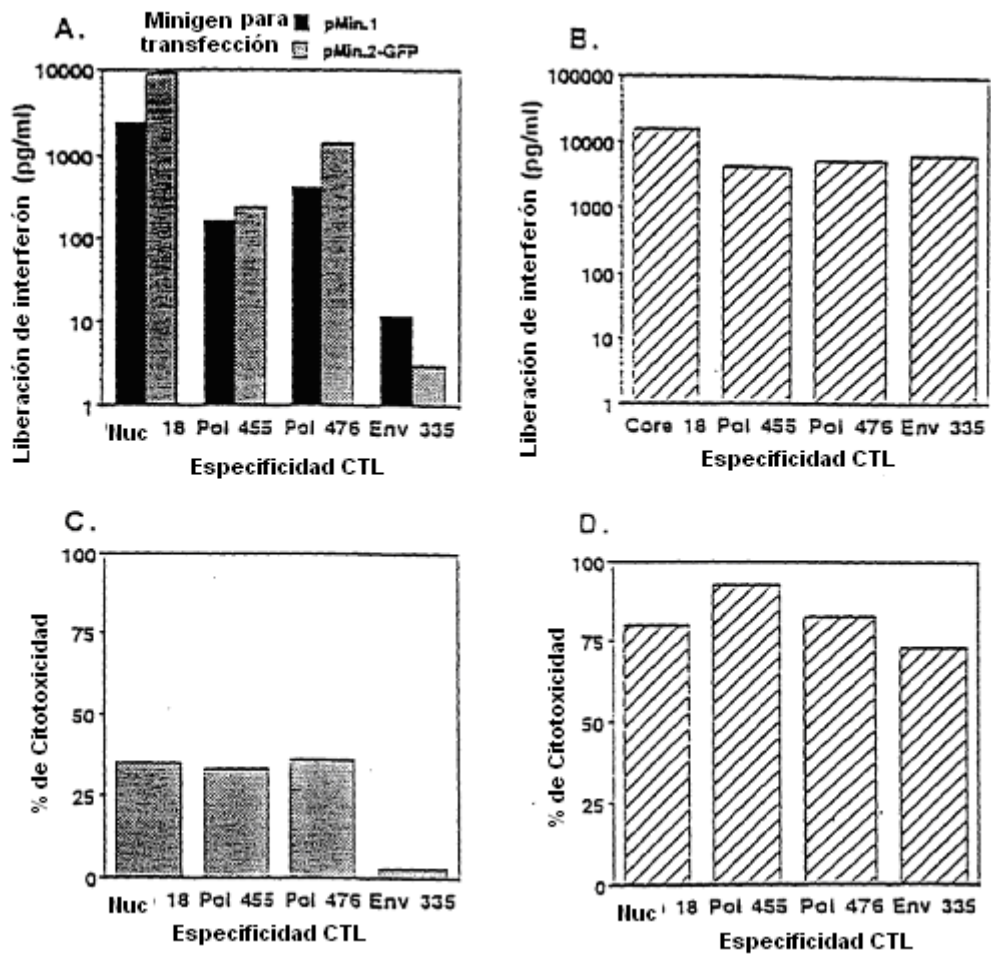


FIGURA 24

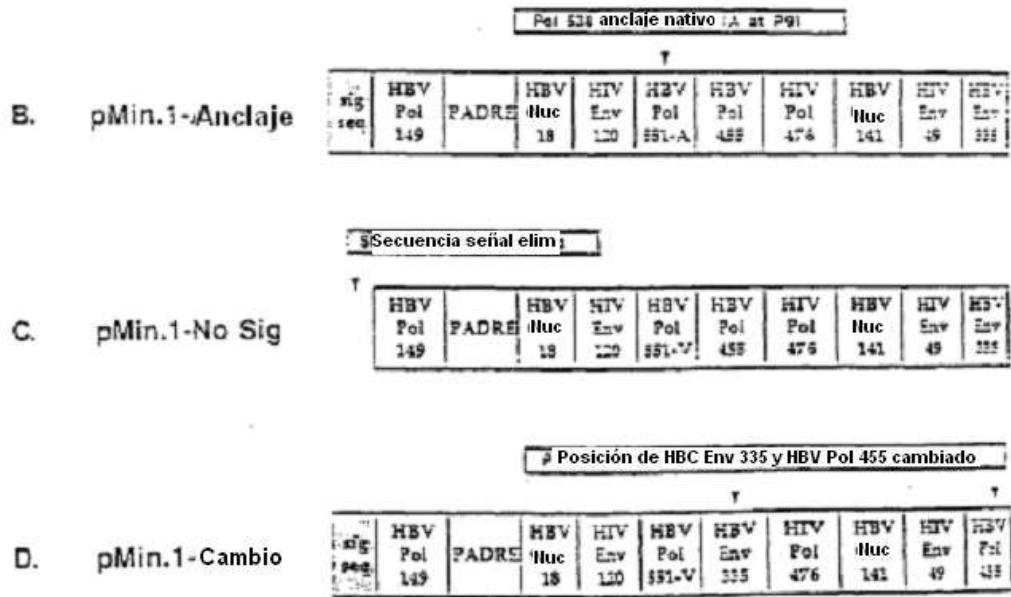


FIGURA 25

