

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 109**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04744033 .4**
96 Fecha de presentación: **05.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1659858**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Ratón transgénico que tiene un fenotipo de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano, usos experimentales y aplicaciones**

30 Prioridad:
30.07.2003 US 490945 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT PASTEUR
25/28, RUE DU DOCTEUR ROUX
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**AURIAULT, Claude;
PANCRE, Véronique;
LONE, Yu-Chun;
PAJOT, Anthony y
LEMONNIER, François**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 381 109 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

Ratón transgénico que tiene un fenotipo de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano, usos experimentales y aplicaciones.

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud se basa en y reivindica los derechos de la Solicitud Provisional US nº 60/490.945, presentada el 30 de julio de 2003 (número de expediente 03495.6093), sobre la que se basa toda la descripción.

Antecedentes de la invención

Actualmente se están desarrollando muchas vacunas para inmunoterapia contra el cáncer humano y para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como malaria, SIDA, virus de la hepatitis C, y SARS. Dada la rapidez con la que pueden aparecer nuevos patógenos emergentes, es importante mejorar modelos de animales que se pudiesen usar para evaluar rápidamente y de forma fiable las estrategias de vacunación y la capacidad protectora de diferentes epítomos. Además, ya se necesitan estudios *in vivo* para evaluar variables cruciales del comportamiento de las vacunas que no se evalúan fácilmente o son imposibles de medir *in vitro*, tales como la inmunogenicidad de las vacunas, la formulación de las vacunas, la vía de administración, la distribución tisular, y la implicación de órganos linfoides primarios y secundarios. Debido a su simplicidad y flexibilidad, los pequeños animales, tales como los ratones, representan una alternativa atractiva a sistemas de modelos más farragosos y caros, tales como primates no humanos, al menos para estudios de desarrollo de vacunas iniciales.

La eficacia moderada observada en varios ensayos clínicos de vacunas, que se encontró que eran protectoras en estudios de animales de tipo salvaje (McMichael, A.J. y Hanke, T. *Nat Med* 9, 874-880 (2003)), se puede explicar parcialmente por la diferente influencia que el MHC humano y animal tiene sobre el resultado de la respuesta inmunitaria, puesto que las moléculas de MHC animal y HLA humano no presentan los mismos epítomos óptimos (Rotzschke, O. *et al.* *Nature* 348, 252-254 (1990)). De este modo, a pesar de algunas limitaciones, los ratones transgénicos que expresan HLA humano deberían representar una mejora útil con respecto a ratones de tipo salvaje como un modelo preclínico para ensayar candidatos de vacunas, evaluar el riesgo potencial de que las vacunas puedan inducir trastornos autoinmunitarios, y diseñar mejores estrategias terapéuticas basándose en el elemento de restricción humano.

Células T citotóxicas

Las células T citotóxicas (CTL) desempeñan un papel crucial en la erradicación de enfermedades infecciosas y, en algunos casos, cáncer (P. Aichele, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel y M. Schulz, *J Exp Med* 171 (1990), p. 1815; L. BenMohamed, H. Gras-Masse, A. Tartar, P. Daubersies, K. Brahimi, M. Bossus, A. Thomas y P. Druhile, *Eur J Immunol* 27 (1997), p. 1242; D.J. Diamond, J. York, J. Sun, C.L. Wright y S.J. Forman, *Blood* 90 (1997), p. 1751). Las vacunas de proteínas recombinantes no inducen respuestas de CTL de forma fiable (Habeshaw JA, Dalgleish AG, Bountiff L, Newell AL, Wilks, D, Walker LC, Manca F. 1990 noviembre; 11(11): 418-25; Miller SB, Tse H, Rosenpire AJ, King SR. *Virology*. 1992 diciembre; 191 (2):9 73-7). El uso de vacunas de otro modo inmunógenas, que consisten en patógenos atenuados, en seres humanos, está impedido en varias enfermedades importantes, por problemas de seguridad primordiales. En los últimos años recientes, se han propuesto enfoques a base de epítomos como una posible estrategia para desarrollar nuevas vacunas profilácticas e inmunoterapéuticas (Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM. *Curr Opin Immunol*. 1996 Oct, 8(5):651-7; Chesnut RW, Design testing of peptide based cytotoxic T-cell mediated immunotherapeutic to treat infection disease, cancer, en Ppowell, MF, Newman, MJ (eds.): *Vaccine Design: The Subunit, Adjuvant Approach*, Plenum Press, Nueva York 1995, 847). Este enfoque ofrece varias ventajas, incluyendo la selección de epítomos procesados de forma natural, que fuerza al sistema inmunitario a enfocarse en epítomos de un patógeno muy conservados e inmunodominantes (R.G. van der Most, A. Sette, C. Oseroff, J. Alexander, K. Murali-Krishna, L.L. Lau, S, Southwood, J. Sidney, R.W. Chesnut, M. Matioubian y R. Ahmed, *J Immunol* 157 (1996), p. 5543) y la inducción de respuestas multiepitópicas para evitar el escape mediante mutación, tal como se observa en infecciones por VIH, virus de la hepatitis B (HBV) y virus de la hepatitis C (HCV). Esto permite la eliminación de determinantes de células T supresoras, que pueden provocar preferentemente una respuesta TH2, en condiciones en las que es deseable una respuesta TH1, o viceversa (Pfeiffer C, Murray J, Madri J, Bottomly K. *Immunol Rev*. 1991 octubre;123:65-84; P Chaturvedi, Q Yu, S Southwood, A Sette, y B Singh *Int Immunol* 1996 8: 745-755). Finalmente, proporciona la posibilidad de librarse de determinantes de células T autoinmunes en antígenos, lo que puede inducir enfermedades autoinmunitarias indeseables. La inmunidad antiviral o antitumoral protectora usando péptidos de epítomos de CTL se ha logrado en varios modelos experimentales (D.J. Diamond, J. York, J. Sun, C.L. Wright y S.J. Forman, *Blood* 90 1997, p. 1751; J.E.J. Blaney, E. Nobusawa, M.A. Brehm, R.H. Bonneau, L.M. Mylin, T.M. Fu, Y. Kawaoka y S.S. Tevethia, *J Virol* 72 (1998), p. 9567).

La definición de epítomo de CTL basándose en el uso de linfocitos humanos puede ser engañosa debido a heterogeneidad medioambiental y genética que conduce a resultados incompletos, y debido a dificultades técnicas en el aislamiento de clones de CTL. Los ratones transgénicos de HLA clase I o clase II descritos hasta la fecha han demostrado ser una herramienta valiosa para superar estas limitaciones, como se ilustra mediante la identificación

con tales modelos de animales de nuevos epítomos de CTL y T auxiliares (Hill AV. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:593-617; Carmon L, El-Shami KM, Paz A., Pascolo S, Tzeboval E, Tiroso B, Koren R, Feldman M, Fridkin M, Lemonnier FA, Eisenbach L. *Int J Cancer*, 1 febrero de 2000;85(3):391-7). Estos ratones también se han usado para demostrar: i) una buena correlación entre la afinidad de unión de HLA peptídico y la inmunogenicidad (Lustgarten J, Theobald M, Labadie C, LaFace D, Peterson P, Disis ML, Cheaver MA, Sherman LA. *Hum Immunol.* 1997 febrero;52(2):109-18; Bakker AB, van der Burg SH, Huijbens RJ, DRijfhout JW, Melief CJ, Adema GJ, Figdor CG. *Int J Cancer.* 27 de enero de 1997;70(3):302-9), ii) el solapamiento significativo entre el sistema de CTL murino y humano al nivel de procesamiento antigénico (se generan los mismos epítomos), y iii) la movilización comparable frente a la mayoría de los antígenos de los repertorios de CTL en ratones transgénicos de HLA y humanos (Wentworth, P. A., A. Vifiello, J. Sidney, E. Keogh, P. W. Chesnut, H. Grey, A. Sette. 1996. *Eur. J. Immunol.* 26:97; Alexander, J., C. Oserof, J. Sidney, P. Wentworth, E. Keogh, G. Hermanson, F. V. Chisari R. T, Kubo, H. M, Grey, A, Sette, 1997. *J.Immunol.* 159:4753).

Hasta la fecha, se han desarrollado vacunas sintéticas de epítomos de CTL a base de péptidos como agentes inmunoterapéuticos frente a un número de enfermedades humanas [18-20]. Sin embargo, sólo se observó una eficacia moderada en varios ensayos clínicos (21). Esto se puede explicar en parte por el fracaso de estas vacunas para inducir respuestas de CTL suficientemente potentes. De hecho, informes recientes sugieren la necesidad de la ayuda de células T CD4+ para obtener una respuesta de CTL máxima (A.J. Zajac, K. Murali-Krishna, J.N. Blattman y R. Ahmed, *Curr Opin Immunol* 10 (1998), p. 444; Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung O, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, Lemonnier FA, Langlade-Dernoyen P *Eur J Immunol* 29, 3112, 1999).

CTL son componentes críticos de la inmunidad protectora frente a infecciones víricas, pero no se comprenden completamente los requisitos para el cebado *in vivo* de CTL. Ahora se acepta que las células Th son normalmente esenciales para el cebado de CTL con péptidos sintéticos. Con respecto a péptidos epitópicos de CTL sintéticos, varios estudios señalan una necesidad imperiosa de la estimulación de linfocitos Th para inducir respuestas de CTL óptimas (C. Fayolle, E. Deriaud y C. Leclerc, *J Immunol* 147 (1991), p, 4069; C. Widmann, P. Romero, J.L. Maryanski, G. Corradin y D. Valmori, *J Immunol Meth* 155 (1992), p. 95; M. Shirai, C.D. Pendleton, J. Ahlers, T. Takeshita, M. Newman y J.A. Berzofsky, *J Immunol* 152 (1994), p. 549; J.P. Sauet, H. Gras-Masse, J.G. Guillet y E. Gomard, *Int Immunol* 8 (1996), p. 457). Varios de estos estudios mostraron que la activación de una célula T CD8+ requiere la interacción simultánea de una célula auxiliar T CD4+ y una célula T CD8+ con la misma célula presentadora de antígeno que presenta sus epítomos cognatos (Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. *Nature.* 4 de junio de 1998;393 (6684):474-8). La importancia de esta interacción de tres células para el cebado de los CTL se confirma mediante estudios con epítomos víricos, y modelos de animales, puesto que la inducción *in vivo* de los CTL fue la más eficaz cuando se enlazaron físicamente epítomos de CTL y Th en lugar de ser administrados como una mezcla sin enlazar (Shirai M, Pendleton CD, Ahlers J, Takeshita T, Newman M, Berzofsky JA. *J Immunol.* 15 de enero 1994;152(2): 549-56; Oseroff C, Sette A, Wentworth P, Celis E, Maewal A, Dahlberg C, Fikes J, Kubo RT, Chesnut RW, Grey BX Alexander J. *Vaccine.* mayo de 1998;16(8): 823-33). La capacidad de los péptidos antigénicos de CTL y Th para inducir eficazmente respuestas de CTL se ha demostrado tanto en modelos experimentales (C. Fayolle, E. Deriaud y C. Leclerc, *J Immunol* 147 (1991), p, 4069; C. Widmann, P. Romero, J.L. Maryanski, G. Corradin y D. Valmori, *J Immunol Meth* 155 (1992), p. 95) como en seres humanos (A. Vitiello, G. Ishioka, H.M. Grey, R. Rose, P. Fames, R. LaFond, L. Yuan, F.V. Chisari, J. Furze y R. Bartholomeuz, *J Clin Invest* 95 (1995), p. 341; B. Livingston, C. Crimi, H. Grey, G. Ishioka, F.V. Chisari, J. Fikes, H.M. Grey, R. Chesnut y A. Sette, *J Immunol* 159 (1997), p. 1383). Además, una respuesta de Th potente desempeña un papel importante no sólo para la inducción óptima de respuestas de CTL, sino también para el mantenimiento de la memoria de CTL (E.A. Walter, P.D. Greenberg, M.J. Gilbert, R.J. Finch, K-S. Watanabe, E.D. Thomas y S.R. Riddell, *N Engl J Med* 333 (1995), p. 1038; Riddell SR, Greenberg PD, en Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (eds): *Hematopoietic Cell Transplantation*, 2ª ed. Malden, MA: Blackwell Science Inc., 1999). Finalmente, se ha documentado desde hace tiempo que las células "auxiliares" T CD4+ son cruciales a la hora de coordinar respuestas inmunitarias celulares y humorales frente a antígenos exógenos.

Recientemente, se estableció un ratón transgénico (Tg) que expresa tanto las moléculas de HLA-A*0201 clase I como HLA-DR1 clase II (BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, *Hum, Immunol.* agosto de 2000;61 (8):764-79). Los autores dieron a conocer que ambos transgenes HLA-A*0201 y HLA-DR1 son funcionales *in vivo*, que ambas moléculas de MHC clase I y clase II se utilizaron como elementos de restricción, y que el producto del transgén de HLA-DR1 potencia las respuestas de CTL específicas de antígeno restringidas a HLA-A*0201 (BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, *Hum, Immunol.* agosto 2000;61(8):764-79).

También, el documento WO 03/006639 describe un modelo de ratón humanizado transgénico que comprende un gen murino deficiente de H2 clase I y II, y un gen humano funcional de HLA clase I y/o clase II.

El documento WO 02/059263 describe un modelo de ratón humanizado transgénico en el que los genes murinos del receptor de células T, del receptor de MHC y CD4 y CD8 se han sustituido por sus equivalentes humanos.

Es digno de destacar que estos ratones Tg HLA-A*0201/DR1 expresaron sus propias moléculas de MHC H-2 clase I

y clase II. Debido a que los ratones transgénicos de HLA clase I que expresan genes de ratón endógenos de MHC clase I desarrollan preferentemente y a menudo exclusivamente respuesta de CTL restringida a H-2 (C Barra, H Gournier, Z Garcia, PN Marche, E Jouvin-Marche, P Briand, P Fillipi, y FA Lemonnier J Immunol 1993 150: 3681-3689; Epstein H, Hardy F., May JS, Johnson MH, Holmes N. Eur J Immunol. septiembre 1989;19(9):1575-83; Le AX; EJ Bemhard, MJ Holterman, S Strub, P Parham, E Lacy, y VH Engelhard J Immunol 1989 142: 13 66-1371; Vitiello A, Marchesini D, Furze J, Sherman LA, Chesnut RW., J Exp Med. 1 de abril 1991;173(4):100715), y a que los ratones transgénicos de HLA clase II que expresan genes de ratón endógenos de MHC clase II no inducen respuestas fiables específicas de antígeno restringidas a HLA clase II (Nishimura Y, Iwanaga T, Inamitsu T, Yanagawa Y, Yasunami M, Kimura A, Hirokawa K, Sasazuki T., J Immunol 1 de julio de 1990;145(I):353-60), estos ratones Tg HLA-A*0201/DR1 son de utilidad limitada para evaluar las respuestas específicas de seres humanos frente a antígenos.

Sin embargo, en ratones nuligénicos de H-2 clase I y transgénicos de HLA clase I, o ratones nuligénicos de H-2 clase II y transgénicos de HLA clase II, sólo se producen respuestas inmunitarias de CTL restringidas a HLA (Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau, B., J Exp Med. 16 de junio de 1997;185(12).2043-51; Madsen L, Labrecque N, Engberg J, Dierich A, Svejgaard A, Benoist C, Mathis D, Fugger L., Proc Natl Acad Sci U S A 31 de agosto de 1999;96(18):10338-43). De hecho, los ratones nuligénicos (KO) de *H-2 clase I* y transgénicos de *HLA-A2.1* presentan la capacidad para montar respuestas mejoradas restringidas a HLA-2.1 en comparación con ratones transgénicos de *HLA-A2.1*, que todavía expresan las moléculas murinas endógenas de H-2 clase I (Pascolo, S. *et al.* J Exp Med 185, 2043-2051 (1997); Ureta-Vidal, A., Firat, H., Perarnau, B. y Lemonnier, F.A. J Immunol 163, 2555-2560 (1999); Firat, H. *et al.*, Int Immunol 14, 925-934 (2002); Rohrllich, P.S. *et al.*, Int Immunol 15, 765-772 (2003)). Se han hecho observaciones similares con ratones transgénicos de *HLA-DR1*, dependiendo de si son deficiente o no en moléculas de H-2 clase II (A. Pajot, resultados no publicados). Además, en ausencia de competición de moléculas de MHC murino, los ratones KO de *H-2 clase I* y transgénicos de *HLA-A2.1* o KO de *H-2 clase II* y transgénicos de *HLA-DR1* generan solamente respuestas inmunitarias restringidas a HLA (Pascolo, S. *et al.* J Exp Med 185, 2043-2051 (1997)) (A. Pajot, resultados no publicados), facilitando la monitorización de respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ restringidas a HLA. Sin embargo, las respuestas inmunitarias protectoras frente a patógenos, que a menudo requieren la colaboración entre células T auxiliares y células T CD8⁺ citotóxicas, no se puede estudiar en los ratones monotransgénicos de *HLA clase I* o *HLA clase II*, que no permiten la evaluación simultánea de respuestas humanas de HLA clase I y II en el mismo ratón.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de un sistema de modelo de animal conveniente para evaluar la inmunogenicidad de candidatos de vacunas humanas que comprenden constructos que contienen epítomos de CTL humanos y, en algunos casos, con la inclusión de epítomos de Th CD4⁺ (linfocito T auxiliar) de potencia elevada para sostener la actividad de células T CD8⁺ antivírica y antitumoral (A.J. Zajac, K. Murali-Krishna, J.N. Blattman y R. Ahmed, Curr Opin Immunol 10 (1998), p. 444; Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung O, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, Lemonnier FA, Langlade-Dernoyen P, Eur J Immunol 29,3112, 1999). Existe también una necesidad de un sistema que permita la evaluación simultánea de la coordinación mutua entre una respuesta de CTL, una respuesta de TH (en particular, respuesta de TH₁ o TH₂), y, opcionalmente, una respuesta humoral.

Sumario de la invención

Se ha satisfecho esta necesidad y más proporcionando ratones transgénicos tanto para moléculas de HLA-A2.1 como HLA-DR1, en un contexto que es eficaz para moléculas de H-2 tanto de clase I como de clase II. La materia objeto de la presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 18. Específicamente, la invención proporciona ratones que comprenden (1) moléculas no funcionales de H-2 clase I y clase II; y (2) que expresan moléculas transgénicas de HLA clase I, o moléculas transgénicas de HLA clase II, o moléculas transgénicas de HLA clase I y moléculas transgénicas de HLA clase II. Estos ratones proporcionan un modelo útil en el desarrollo y optimización de constructos de vacunas con inmunogenicidad *in vivo* máxima para uso humano. Específicamente, tales ratones permiten un análisis completo de los tres componentes de la respuesta adaptativa inmunitaria (anticuerpo, auxiliar y citolítica) en un único animal, así como una evaluación de la protección conferida específicamente mediante la vacunación frente a una exposición antigénica.

Los ratones de la invención, que comprenden una supresión tanto para moléculas de H-2 clase I como clase II, y que expresan moléculas transgénicas de HLA clase I y moléculas transgénicas de HLA clase II, representan un ratón experimental completamente humanizado que se puede usar para detectar simultáneamente la presencia de anticuerpos específicos de antígenos, una respuesta de célula T, restringida a HLA-DR1 específica de antígenos, y una respuesta de célula T restringida a HLA-A2 específica de antígenos. Estos ratones serán útiles para estudiar cómo la coordinación mutua funciona entre una respuesta de CTL, una respuesta de TH (en particular una respuesta de TH₁ o TH₂), y, opcionalmente, una respuesta humoral. Estos ratones representan una herramienta optimizada para estudios de vacunología básica y aplicada.

Se describe en la presente memoria un ratón transgénico que comprende un gen de H2 clase I interrumpido, un gen de H2 clase II interrumpido, y un transgén funcional de HLA clase I o clase II.

También se describe un ratón transgénico que comprende un gen de H2 clase I interrumpido, un gen de H2 clase II interrumpido, un transgén de HLA clase I funcional, y un transgén de HLA clase II funcional.

5 En estos casos, el transgén de HLA clase I puede ser un transgén de HLA-A2, y el transgén de HLA clase II puede ser un transgén de HLA-DR1. De forma más precisa, el transgén de HLA-A2 puede comprender la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias, y el transgén de HLA-DR1 puede comprender la secuencia de HLA-DR1 provista en el listado de secuencias.

10 Una forma de realización de la invención proporciona un ratón transgénico que tiene moléculas endógenas no funcionales de H2 clase I y clase II, que comprende un transgén funcional de HLA clase I y un transgén funcional de HLA clase II. En una forma de realización, el ratón tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁰IAβ⁰; en el que el transgén de HLA-A2 comprenden la secuencia proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID n^o 1, y el transgén de HLA-DR1 comprende las secuencias proporcionadas en el listado de secuencias en SEC ID n^o 2 y 3.

15 Otra forma de realización de la invención proporciona un método para identificar simultáneamente la presencia de uno o más epítomos en un antígeno o grupo de antígenos candidato, en el que el uno o más epítomos provocan una respuesta humoral específica, una respuesta de TH restringida a HLA-DR1, y /o una respuesta de CTRL restringida a HLA-A2. El método comprende administrar el antígeno o grupo de antígenos candidatos a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-
20 A2 y un transgén funcional de HLA-DR1, y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁰IAβ⁰; evaluar una respuesta humoral específica en el ratón contra el antígeno; evaluar una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH en el ratón frente al antígeno; y evaluar una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL en el ratón frente al antígeno. La observación de una respuesta humoral específica en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta humoral en el antígeno. La observación de una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH en el ratón
25 frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH en el antígeno. La observación de una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL en el antígeno.

30 En algunas formas de realización, el método incluye evaluar una respuesta específica de Th1 en el ratón frente al antígeno, y evaluar una respuesta específica de Th2 en el ratón frente al antígeno. En este caso, la observación de una respuesta específica de Th1 en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta específica de Th1 en el ratón frente al antígeno; y la observación de una respuesta específica de Th2 en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta específica de Th2 en el ratón frente al antígeno.

35 Se describe en la presente memoria un método para identificar la presencia de un epítomo de T auxiliar restringido a HLA DR1 en un antígeno candidato o grupo de antígenos candidatos, comprendiendo el método administrar el antígeno candidato o grupo de antígenos candidatos a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-2 y un transgén funcional de HLA-DR1,
40 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁰IAβ⁰; y evaluar para una respuesta de epítomo de T auxiliar restringida a HLA-DR1 de TH en el ratón frente al antígeno. La observación de una respuesta de epítomo de T auxiliar restringida a HLA-DR1 de TH en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta de epítomo de T auxiliar restringida a HLA-DR1 de TH en el antígeno.

45 Además, se describe en la presente memoria un antígeno aislado que comprende un epítomo de T auxiliar restringido a HLA DR1 identificado mediante el método del párrafo anterior. Este antígeno aislado puede incluir un epítomo que provoca una respuesta mural y/o un epítomo que provoca una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL. El antígeno que comprende un epítomo de T auxiliar restringido a HLA DR1 puede comprender un polipéptido. El antígeno que comprende un epítomo de T auxiliar restringido a HLA DR1 puede comprender un polinucleótido. Eventualmente, el antígeno que comprende un epítomo de T restringido a HLA DR1 puede comprender ADN, ARN, o
50 ADN y ARN.

También se describe en la presente memoria un método para identificar la presencia de un epítomo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 en un antígeno candidato o un grupo de antígenos candidatos, comprendiendo el método a administrar el antígeno candidato o grupo de antígenos candidatos a un ratón transgénico que
55 comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁰IAβ; y ensayar para una respuesta de T citotóxico (CTL) restringida a HLA-A2 en el ratón al antígeno o grupo de antígenos. La observación de una respuesta de T citotóxico (CTL) restringida a HLA-A2 en el ratón frente al antígeno o grupo de antígenos identifica un epítomo que provoca una respuesta de T citotóxico (CTL) restringida a HLA-A2 en el antígeno o grupo
60 de antígenos.

Un antígeno aislado que comprende un epítomo de T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede identificar mediante el método del párrafo anterior. Este antígeno puede comprender además un epítomo que provoca una respuesta humoral y/o un epítomo que provoca una respuesta de epítomo de T auxiliar restringida a HLA-DR1 de TH. El antígeno que comprende un epítomo de T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 puede comprender un polipéptido. El antígeno que comprende un epítomo de T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 puede comprender un
65

polinucleótido. El antígeno que comprende un epítipo de T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 puede comprender ADN, ARN, o ADN y ARN.

También se describe un método para comparar la eficacia de una respuesta de célula T auxiliar inducida por dos o más vacunas. Este método comprende administrar una primera vacuna candidata a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1, y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T auxiliar inducida en el ratón por la primera vacuna candidata; administrar una segunda vacuna candidata a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T auxiliar inducida en el ratón por la segunda vacuna candidata; administrar cada vacuna candidata adicional a comparar a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, y un transgén funcional de HLA-A2, un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T auxiliar inducida en el ratón por la vacuna candidata adicional, y determinar la eficacia de cada vacuna candidata para inducir una respuesta de célula T comparando las respuestas de T auxiliares a cada una de las vacunas a comparar entre sí. La respuesta de célula T auxiliar puede ser una respuesta restringida a HLA-DR1.

Además, también se describe un método para comprar la eficacia de respuestas de células T citotóxicas inducidas por dos o más vacunas. El método incluye administrar una primera vacuna candidata a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T citotóxica inducida en el ratón por la primera vacuna candidata; administrar una segunda vacuna candidata a un ratón de un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T citotóxica inducida en el ratón por la segunda vacuna candidata; administrar cada vacuna candidata adicional a comparar a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T citotóxica inducida en el ratón por la vacuna candidata adicional; y determinar la eficacia de cada vacuna candidata para inducir una respuesta de célula T citotóxica comparando las respuestas de célula T citotóxica a cada una de las vacunas a comparar entre sí. La respuesta de célula T citotóxica puede ser una respuesta restringida a HLA-A2.

Además, se describe en la presente memoria un método para comparar simultáneamente la eficacia de la respuesta de célula T auxiliar y la respuesta de célula T citotóxica, inducidas por dos o más vacunas. El método comprende administrar una primera vacuna candidata a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2 y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de T auxiliar y la respuesta de célula T citotóxica inducidas en el ratón por la primera vacuna candidata, administrar una segunda vacuna candidata a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase 2, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de la célula T auxiliar y la respuesta de la célula T citotóxica inducidas en el ratón por la segunda vacuna candidata; administrar cada vacuna candidata adicional a comparar a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y medir la respuesta de célula T auxiliar y la respuesta de célula T citotóxica inducidas en el ratón por cada vacuna candidata adicional; y determinar la eficacia de cada vacuna candidata para inducir una respuesta de célula T auxiliar y una respuesta de célula T citotóxica comparando la respuesta de célula T auxiliar y la respuesta de célula T citotóxica a cada una de las vacunas a comparar entre sí. La respuesta de célula T auxiliar puede ser una respuesta restringida a HLA-DR1, y la respuesta de célula T citotóxica puede ser una respuesta restringida a HLA-A2.

La presente invención también proporciona un método para determinar simultáneamente la respuesta humoral, la respuesta de célula T auxiliar, y la respuesta de célula T citotóxica de un ratón tras su inmunización con un antígeno o una vacuna que comprende uno o más antígenos. El método comprende administrar el antígeno o la vacuna que comprende uno o más antígenos a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m^oIAβ^o, y ensayar para determinar una respuesta humoral específica en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos, ensayar para determinar una respuesta de célula T auxiliar en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos, y ensayar para determinar una respuesta de célula T citotóxica en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos. En algunas formas de realización, la respuesta de célula T auxiliar es una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH. En algunas formas de realización, la respuesta de célula T citotóxica es una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL.

La presente invención también proporciona un método para optimizar dos o más composiciones de vacunas

candidatas para la administración a un ser humano, basándose en criterios preseleccionados. El método incluye determinar simultáneamente la respuesta humoral, la respuesta de célula T auxiliar, y la respuesta de célula T citotóxica de un ratón tras su inmunización con las dos o más composiciones de vacunas candidatas, usando un método que comprende administrar el antígeno o la vacuna que comprende uno o más antígenos a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m[°]IAβ[°], ensayando para determinar una respuesta humoral específica en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos, ensayando para determinar una respuesta de célula auxiliar T en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos, ensayando para determinar una respuesta de célula T citotóxica en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos, y seleccionar una vacuna optimizada aplicando criterios preseleccionados a los resultados. En algunas formas de realización, las dos o más vacunas candidatas difieren solo en la relación de antígeno a adyuvante presente en la vacuna. En algunas formas de realización, las dos o más vacunas candidatas difieren sólo en el tipo de adyuvante presente en la vacuna.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si una vacuna presenta un riesgo de inducción de una enfermedad autoinmunitaria cuando se administra a un ser humano. El método comprende administrar la vacuna a un ratón transgénico que comprende un gen no funcional de H2 clase I, un gen no funcional de H2 clase II, un transgén funcional de HLA-A2, y un transgén funcional de HLA-DR1 y que tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m[°]IAβ[°], y ensayar para determinar una respuesta autoinmunitaria en el ratón, en el que la observación de una respuesta autoinmunitaria en el ratón indica que la vacuna presenta un riesgo de inducción de una enfermedad autoinmunitaria cuando se administra a un ser humano.

También se describe una célula de ratón transgénico aislada que comprende un gen interrumpido de H2 clase I, un gen interrumpido de H2 clase II, y un transgén funcional de HLA clase I o clase II.

Además, se describe una célula de ratón transgénico aislada que comprende un gen interrumpido de H2 clase I, un gen interrumpido de H2 clase II, un transgén funcional de HLA clase I y un transgén funcional de HLA clase II.

El transgén de HLA clase I puede ser un transgén de HLA-A2, y el transgén de HLA clase II puede ser un transgén de HLA-DR1. El transgén de HLA-A2 puede comprender la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias, y el transgén de HLA-DR1 puede comprender la secuencia de HLA-DR1 proporcionada en el listado de secuencias.

Además, la presente invención proporciona una célula de ratón transgénico aislada que tiene genes endógenos no funcionales de H2 clase I y clase II, en la que la célula de ratón transgénico comprende un transgén funcional de HLA clase I y un transgén funcional de HLA clase II. En algunas formas de realización, la célula de ratón transgénico tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m[°]IAβ[°], en el que el transgén de HLA-A2 comprende la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID n^o 1, y el transgén de HLA-DR1 comprende las secuencias proporcionadas en el listado de secuencias en SEC ID n^o 2 y 3.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá de forma más completa con referencia a los dibujos, en los que:

La figura 1 muestra un análisis de citometría de flujo de la expresión de la superficie celular de las moléculas transgénicas indicadas (a) Se tiñeron esplenocitos de ratones KO de *H-2 clase II* transgénicos de *HLA-DR1* (DR1⁺CI⁺, panel izquierdo), KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* (A2⁺DR1⁺CI⁺CI⁺, panel central), y KO de *H-2 clase I* transgénicos de *HLA-A2.1* (A2⁺CI⁺, panel derecho) con m.Ab W6/32 marcado con FITC (anti-HLA-ABC, en abscisas) o 28-8-6S biotinilado (anti-H-2K^b/D^b en ordenadas), revelando este último con anti-IgG de ratón marcado con BE. (b) Se tiñeron linfocitos B del bazo B220⁺ de la misma raza de ratones con m.Ab L243 marcado con FITC (anti-HLA-DR1, paneles superiores) y AF6-120.1 marcado con PE (anti-H-2IAβ^b paneles inferiores).

La figura 2 muestra los números de células T esplénicas CD8⁺ y CD4⁺ y el uso del segmento BV (basándose en análisis inmunoscópico) en ratones de los genotipos indicados. (a) Se tiñeron esplenocitos procedentes de ratones KO de *H-2 clase II* transgénicos de *HLA-DR1* (DR1⁺CI⁺, panel izquierdo), KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* (A2⁺DR1⁺CI⁺CI⁺, panel central), y KO de *H-2 clase I* transgénicos de *HLA-A2.1* (A2⁺CI⁺, panel derecho) con m.Ab CT-CD4 marcado con PE (anti-CD4 de ratón, en ordenadas) y 53-6.7 marcado con FITC (anti-CD8 de ratón en abscisas). Los números corresponden a los porcentajes de células T CD4⁺ (cuadrado izquierdo superior) o CD8⁺ (cuadrado derecho inferior) en esplenocitos totales. (b y c) Análisis inmunoscópico de RT-PCR de células T esplénicas purificadas CD8⁺ (b) y CD4⁺ (c) para el uso de la familia del segmento BV (1-20) usando cebadores BC específicos e inversos de la familia BV directos (1-20). Un perfil típico para una familia de segmento BV reordenada productivamente incluye una serie de picos con una distribución de tipo Gaussiano que difiere en longitud en 3 nucleótidos. La figura ilustra los resultados obtenidos con un ratón representativo KO de *H-2 clase I/clase II* transgénico de *HLA-A2.1/HLA-DR1*.

La figura 3 muestra respuestas citolítica, proliferativa y de anticuerpos, específicas de HBs. Los ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* se inmunizaron o no mediante inyección intramuscular de ADN plasmídico que codifica HBsAg, y después se ensayaron individualmente. (a) Respuesta humoral (panel superior), citolítica (panel central) y proliferativa (panel inferior), y controles específicos de un ratón representativo inmunizado con ADN que codifica HBsAg. El título de anticuerpos (IgG) frente a las partículas de HBsAg que contienen proteínas de cubierta de HBV tanto medias como pequeñas y frente al péptido preS₂¹⁰⁹⁻¹³⁴ se determinaron en el ensayo ELISA. La actividad citolítica a diferentes relaciones efector/diana (E/T) se evaluó usando células diana RMAS-HHD pulsadas con péptido relevante (HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, restringido a HLA-A2.1♦) o de control (HBsAg₃₇₁₋₃₇₈, restringido a H-2 K^b_Δ, y MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉, restringido a HLA-A2.1[]). Las respuestas proliferativas se detectaron usando péptido relevante (HBsAg₁₈₀₋₁₉₅, restringido a HLA-DR1) o de control (HBsAg₁₂₆₋₁₃₈, restringido a H-2 I^A^b y HIV 1 Gag₂₆₃₋₂₇₈, restringido a HLA-DR1). (b) Evaluación similar de las respuestas de anticuerpos (IgG, panel superior), citolítica (panel central) y proliferativa (panel inferior) de 6 ratones inmunizados con ADN que codifica HBsAg (1-6), según se compara a respuestas medias de 6 ratones sin tratamiento (0). La actividad citolítica a una relación de E/T 30/1 se evaluó en células diana RMAS-HHD pulsadas con péptido HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, inmunodominante (barras en negro) o HBsAg₃₃₅₋₃₄₃, subdominante (barras en gris).

La figura 4 muestra resultados de ensayos de protección. Ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* se inmunizaron o no dos veces con ADN plasmídico que codifica HBsAg. Quince días después de la última inmunización, se expusieron intraperitonealmente a 10⁷ PFU de rVV que expresa HBsAg o la proteína HBx. Cuatro días después, los animales se ensayaron individualmente para determinar los títulos víricos en los ovarios. Los resultados (rVV PFU/ovario en log₁₀) se dan para los ratones inmunizados con ADN que codifica HBsAg expuestos a rVV-HBsAg (I, n=10), ratones sin tratar expuestos a rVVHBsAg (N, n=6), ratones inmunes a HBsAg expuestos a rVV-HBx (Ix, n=6) y ratones sin tratar expuestos a rVV-HBsAg (I, n=10).

La figura 5 muestra la respuesta AC anti-Pre S2 en ratones HLA-A2+DR1+CI-CII tras una inmunización con pcmv S2/S.

La figura 6 muestra la respuesta proliferativa de T CD4 a epítopos restringidos a HLA-DR1 tras la inmunización de ratones HLA-A2+DR1+CI-CII con pcmv S2-S.

La figura 7 muestra a respuesta citotóxica T CD8 frente al péptido HBS (348-357) restringido a HLA-A2 tras una inmunización de ratones HLA-A2+DR1+CI-CII con pcmv S2/S.

Secuencias

SEC ID n°:1 contiene las siguientes subpartes: Los nucleótidos 1-1205 comprenden el promotor de HLA-A2; los nucleótidos 1206-1265 la secuencia líder de HLA-A2; los nucleótidos 1266-1565 el ADNc de microglobulina β2 humana; los nucleótidos 1566-1610 un ligador (Gly4Ser)₃; los nucleótidos 1611-2440 un segmento que contiene el exón 2 y parte del intrón 3 de HLA-A2; y los nucleótidos 2441-4547 un segmento que contiene parte del intrón 3, los exones 4 a 8, y parte de la región no codificante de 3' del gen de H2 D^b.

SEC ID n°:2 es la secuencia nucleotídica del gen DRA*0101. Los nucleótidos 1-15279 son el promotor localizado 5' al gen HLA-DR alfa, los nucleótidos 15280-15425 son el exón 1, los nucleótidos 15344-15346 son el codón de partida ATG, los nucleótidos 17838-18083 son el exón 2, los nucleótidos 18575-18866 son el exón 3, los nucleótidos 19146-19311 son el exón 4, y los nucleótidos 20008-20340 son el exón 5.

SEC ID n°:3 es la secuencia nucleotídica del gen de DRB1*010101. Los nucleótidos 7391-7552 son el exón 1, los nucleótidos 7453-7455 son el codón de partida ATG, los nucleótidos 15809-16079 son el exón 2, los nucleótidos 19536-19817 son el exón 3, los nucleótidos 20515-20624 son el exón 4, los nucleótidos 21097-21121 son el exón 5, y los nucleótidos 21750-22085 son el exón 6.

Descripción detallada de la invención

La materia objeto de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1 a 18.

La práctica de la presente invención empleará, excepto que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican de forma completa en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989); *DNA Cloning, Volumes I and II* (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); *Mullis et al. patente US n° 4.683.195*; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods In ENZYMOLOGY* (J. Abelson and M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols.154 and 155 (Wu *et al.* eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M.

P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

5 Se describen en la presente memoria ratones que comprenden (1) moléculas mutadas de H2 clase I y clase II; y (2) que expresan moléculas transgénicas de HLA clase I o moléculas transgénicas de HLA clase II, o moléculas transgénicas de HLA clase I y moléculas transgénicas de HLA clase II. Otros ratones comprenden una supresión de ambas moléculas e H-2 clase I y clase II, y expresan moléculas transgénicas de HLA clase I y moléculas transgénicas de HLA clase II, y representan un ratón experimental completamente humanizado que se puede usar para detectar simultáneamente la presencia de anticuerpos específicos de antígenos, una respuesta de célula T restringida a HLA-DR1 específica de antígeno, y una respuesta de célula T restringida a HLA-A2 específica de antígeno. Estos ratones son útiles para estudiar cómo la coordinación mutua opera entre una respuesta de CTL, una respuesta de TH (en particular, una respuesta de TH₁ o TH₂), y, opcionalmente, una respuesta humoral. Estos ratones representan una herramienta optimizada para estudios de vacunología básica y aplicada.

De forma más precisa, se describe un ratón transgénico que tiene genes no funcionales endógenos de H2 clase I y H2 clase II, y que comprende un transgén funcional de HLA clase I o clase II.

20 Se puede afirmar que tal ratón es un ratón experimental completamente humanizado, debido a que se puede usar para detectar simultáneamente la presencia de anticuerpos específicos de antígenos, una respuesta de célula T restringida a HLA-DR1 específica de antígeno, y una respuesta de célula T restringida a HLA-A2 específica de antígeno.

25 Como se muestra en parte en los Ejemplos proporcionados en la presente memoria, y como está generalmente claro para un experto en la materia a partir de la descripción, los ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.7/HM-DR7* tienen la capacidad para desarrollar respuestas de anticuerpos específicos de HBsAg, de célula T auxiliar CD4⁺ y de célula T citolítica CD8⁺ tras la inmunización con ADN. Estas respuestas, observadas en cada ratón individual ensayado, se dirigieron a los mismos epítomos inmunodominantes como las respuestas humanas, y confirieron a los animales inmunizados una protección específica frente al virus de la vacuna recombinante de HBsAg.

35 Las células auxiliares T son esenciales para la maduración completa de las respuestas de anticuerpos (Katz, D.H. y Benacerraf, B., *Adv Immunol* 15, 1-94 (1972)), el cebado de CTL frente a muchos epítomos (von Boehmer, H. y Haas, W., *J Exp Med* 150, 1134-1142 (1979); Keene, J.A. y Forman, J., *J Exp Med* 155, 768-782 (1982)) y el mantenimiento a largo plazo de CTL (Matloubian, M., Concepcion, R.J. y Ahmed, R., *J Virol* 68, 8056-8063 (1994)). Tanto los anticuerpos (Lefrancois, L., *J Virol* 51, 208-214 (1984)) como CTL (Zinkernagel, R.M. y Welsh, R.M., *J Immunol* 117, 1495-1502 (1976)) son componentes críticos de la inmunidad protectora frente a infecciones víricas. De hecho, se observaron respuestas potentes de anticuerpo específico de HBsAg y de CTL en ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos dobles de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, pero no en ratones KO de *H-2 clase I/clase II* monotransgénicos de *HLA-A2.1*. De este modo, el auxilio de la célula T CD4⁺ específica de HBsAg es esencial para generar respuestas de CTL y de anticuerpos específicos de HBsAg eficaces. Estos resultados son consistentes con estudios sobre ratones inmunizados con HBsAg (Milich, D.R., *Semin Liver Dis* 11, 93-112(1991)) y seres humanos vacunados con HBsAg (Celis, E., Kung, P.C. y Chang, T.W., *J Immunol* 132, 1511-1516 (1984)), lo que sugiere que la producción de una respuesta de anticuerpo anti-HBs depende de células T CD4⁺.

45 Ya se han obtenido ratones transgénicos que expresan tanto moléculas de HLA-A2.1 clase I como de HLA-DR1 clase II (BenMohamed, L. *et al.* *Hum Immunol* 61, 764-779 (2000)). Los autores dieron a conocer que tanto las moléculas de HLA-A2.1 como de HLA-DR1 son elementos de restricción funcionales *in vivo*, y que el producto del transgén de *HLA-DR1* potencia las respuestas de CTL específicas de antígeno restringidas a HLA-A2.1. Sin embargo, la importancia humana de las respuestas inmunitarias en estos ratones se hace pequeña proyecto el hecho de que todavía expresan sus propias moléculas de H-2 clase I y clase II, que se usan habitualmente de forma preferente y a menudo de forma exclusiva como elementos de restricción en respuesta a antígenos (Ureta-Vidal, A., Firat, H., Perarnau, B. y Lemonnier, F.A., *J Immunol* 163, 2555-2560 (1999); Rohrlch, P.S. *et al.*, *Int Immunol* 15, 765-772 (2003)) (A. Pajot, resultados no publicados). La invención descrita en la presente memoria supera esta limitación proporcionando ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*.

60 Como se describe en la presente memoria después, los ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-D1* expresan, en un contexto de KO de $\beta 2m$, una monocadena de HLA-A2.1 en la que la $\beta 2m$ humana está enlazada covalentemente mediante un brazo peptídico a la cadena pesada de HLA-A2.1. Carecen además de la expresión de superficie celular de moléculas convencionales de H-2 IA y IE clase II como resultado de la inactivación del gen *H-2 IA β* , puesto que *H-2 IE α* es un pseudogen en el haplotipo H-2^b. Los resultados proporcionados en la presente memoria demuestran que tales ratones están privados de la expresión de superficie celular de moléculas de H-2 clase I y clase II. Sin embargo, se dio a conocer en un caso que puede existir una cadena pesada de clase I libre, en particular H-2 D^b, sobre la superficie de un ratón KO de $\beta 2b$, y podría inducir una respuesta de alorreactividad. Si esto es así, debido a que tales ratones están vacíos de péptidos, no deberían

interferir en la respuesta inmunitaria específica de antígeno (Bix, M. y Raulet, D., J Exp Med 176, 829-834 (1992)). Esto está soportado por el informe de Allen *et al* (Allen, H., Fraser, J., Flyer, D., Calvin, S. y Flavell, R., Proc Natl Acad Sci U S A 83, 7447-7451 (1986)), en el que confirmaron que H-2 D^b es expresada en la superficie celular incluso cuando no hay β 2m en la célula, pero que tal antígeno D^b no es reconocido por linfocitos D^b citotóxicos aloespecíficos para D^b o restringidos a D^b. Además, los antígenos de D^b no son reconocidos por la mayoría de los anticuerpos monoclonales del D^b nativo.

No obstante, en ratones monotransgénicos de *HLA-DR1*, se dio a conocer que se pueden expresar en cierto grado sobre la superficie celular complejos híbridos de *HLA-DR α /H-2 IE β ^b* no convencionales, al menos en ausencia de la cadena de HLA-DR β (Lawrance, S.K. *et al.*, Cell 58, 583-594 (1989)). A pesar de esta observación, estas moléculas no convencionales no se detectaron serológicamente sobre superficies celulares en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA A2.1 /HLA-DR1*, incluso con mAb (17-3-3S), que se sabe que reacciona con tales moléculas híbridas (Ozato, K., Mayer, N. y Sachs, D.H., J Immunol 124, 533-540 (1980)) (figura 1a y datos no mostrados). Además, los resultados obtenidos al estudiar respuestas de células T específicas de HBsAg y específicas de HIV 1-Gag de estos ratones fueron todos indicativos del uso exclusivo de las moléculas de HLA-A2.1 y HLA-DR1 como elementos de restricción. Esto argumenta que los híbridos de *HLA-DR α /H-2 IE β ^b* no convencionales fueron probablemente inestables en comparación con las moléculas convencionales de *HLA-DR α /HLA-DR β* , y que sólo pueden existir en ausencia de la cadena de HLA-DR β . Las razas de ratón en las que toda la región de H-2 (*H-2 IA β ^b, IA α ^b, IE β ^b*) se ha suprimido (Madsen, L. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 10338-10343 (1999)), así como el gen de *H-2 D^b*, están siendo analizadas para excluir completamente esta posibilidad. Los análisis preliminares de esplenocitos obtenidos de los primeros animales revelaron una restauración de conjunto de células T CD4⁺ similar a la observada en ratones KO de *H-2 clase II (Iap^b)* transgénicos de *HLA-DR1*, sugiriendo que las respuestas de células T CD4⁺ restringidas a *HLA-DR1* de estos nuevos ratones deberían ser equivalentes a las de los ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*.

Los linfocitos CD8⁺ periféricos de ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, en comparación con los ratones de KO de *H-2 clase I* transgénicos de *HLA-A2.1* progenitores, son cuantitativa y cualitativamente similares con la completa diversificación, al menos en términos del uso del segmento BV del repertorio de TCR. La restauración parcial comparada con animales de tipo salvaje, especialmente del conjunto de células T CD8⁺, ha sido una observación constante en los ratones monotransgénicos de HLA que expresan una molécula de HLA-A2.1 quimérica (dominio α 3 de origen murino) (Pascolo, S. *et al.*, J Exp Med 185, 2043-2051 (1997)). Independientemente de la sustitución del dominio α 3, la interacción sigue siendo subóptima entre moléculas CD8 y HLA-A2.1 de ratón, puesto que el análisis de co-cristal ha documentado que CD8 humano también contacta con el dominio α 2 de la cadena pesada de HLA-A2.1 (Gao, G.F. *et al.*, Nature 387, 630-634 (1997)). La cooperación subóptima también se puede producir en el retículo endoplásmico, en el que muchas moléculas (TAP, tapasina, ERp 57) ayudan a la biosíntesis de la molécula de MHC clase I. Sin embargo, en esta etapa, la única diferencia funcional documentada entre estas moléculas del retículo endoplásmico de ratones y de seres humanos, a saber, el transporte eficaz por TAP humano pero no de ratón de péptidos citosólicos cargados positivamente del término COOH (Momburg, F., Neefjes, J.J. y Hammerling, G.J., Curr Opin Immunol 6, 32-37 (1994)), no es relevante para moléculas de HLA-A2.1 que un péptido con un término C hidrófobo, puesto que estos péptidos son transportado eficazmente por TAP de ratón y humano. Incluso aunque el número de linfocitos T CD8⁺ es menor tanto en ratones KO de *H-2 clase I* monotransgénicos de *HLA-A2.1* como en ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, responden eficazmente frente a HBsAg y, de forma importante, estos últimos ratones desarrollan respuestas de anticuerpo, de células auxiliares y de células citolíticas similares a seres humanos.

Una de las dificultades que impiden el diseño de vacunas a base de epítopos T dirigidas a linfocitos T es el polimorfismo de las moléculas de HLA clase I/clase II. Las moléculas de HLA-A2.1 y HLA-DR1 son expresadas por una proporción significativa de individuos en poblaciones humanas (30 a 50% para HLA-A2.1, 6 a 18% para HLA-DR1). Incluso aunque el agrupamiento funcional de moléculas de HLA clase I en superfamilias se basa en la redundancia significativas de los conjuntos presentados de péptidos³⁴, sigue siendo deseable el análisis individual de las respuestas provocadas por cada variante isotópica o alélica de HLA clase I para identificar los epítopos óptimos que presentan. Esto es particularmente importante para idear un nuevo reactivo, tal como un tetrámero (HLA clase I o HLA clase II) para monitorizar la respuesta inmunitaria. Por la misma razón, sería de ayuda obtener razas de ratones que coexpresen moléculas de HLA-A2.1 con otras moléculas de HLA clase II, incluso si la unión de los péptidos a las moléculas de HLA clase II es menos restrictiva que a las moléculas de clase I. Basándose en la presente descripción, para estos y otros fines se pueden construir ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA clase I/clase II*, adicionales.

Mientras que los ratones KO de *H-2* transgénicos de *HLA* permiten un análisis detallado y una optimización de la inmunogenicidad de péptidos antigénicos con excelente transposabilidad a seres humanos (Rohrlich, P.S. *et al.*, Int Immunol 15, 765-772 (2003); Loirat, D., Lemonnier, F.A. y Michel, M.L., J Immunol 165, 4748-4755 (2000); Scardino, A. *et al.*, Eur J Immunol 31, 3261-3270 (2001)), esto es menos evidente para estudios de formulación de adyuvantes de vacunas. Esto podría ser debido a diferencias entre las dos especies en los diversos efectores que se movilizan tempranamente en respuesta a una exposición antigénica. El incremento del conocimiento fundamental de la inmunidad innata puede conducir, en el futuro, a una humanización más completa del sistema inmunitario del ratón.

En conclusión, la presente descripción describe un modelo de ratón transgénico humanizado, optimizado, cuyos genes de *H-2 clase I* ($\beta 2m$ de ratón) y de *clase II* (*H-2 IA β*) se han suprimido y sustituido por genes humanos equivalentes *HHD* (*HLA-A*0201*), *HLA-DR.4*0101* y *HLA-DRB1*0101*. La inmunidad celular en los ratones de KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* está completamente restringida por las moléculas de HLA humano, con una ausencia completa de respuestas inmunitarias restringidas por las moléculas de MHC murino. La ausencia de competición entre respuestas inmunitarias de MHC murino y HLA (transgénico) humano permite usar estos ratones para caracterizar epítomos en vacunas humanas que requieren la colaboración entre células T auxiliares CD4⁺ restringidas a HLA y células T citolíticas CD8⁺ restringidas a HLA.

“HLA” es el complejo de MHC humano, y “H-2” es el complejo de MHC de ratón. El complejo humano comprende tres genes de cadena α de clase I, HLA-A, HLA-B, y HLA-C, y tres pares de genes de cadenas α y β de MHC clase II, HLA-DR, -DP, y -DQ. En muchos haplotipos, el agrupamiento de HLA-DR contiene un gen de cadena β extra cuyo producto puede emparejarse con la cadena de DR α , y, de este modo, los tres conjuntos de genes dan lugar a cuatro tipos de moléculas de MHC clase II. En el ratón, los tres genes de cadena α de clase I son H-2-L, H-2-D, y H-2-K. Los genes de MHC de clase II de ratón son H-2-A y H-2-E.

Es sabido en la técnica que existe diversidad genética entre los genes de HLA de diferentes individuos como resultado tanto de antígenos de HLA polimórficos como de alelos de HLA distintos. En consecuencia, las formas de realización de la invención descritas en la presente memoria, pueden sustituir un antígeno de HLA polimórfico por otro, o un alelo de HLA por otro. Los ejemplos de polimorfismos y alelos de HLA se pueden encontrar, por ejemplo, en <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/data.html> y <http://www.ebi.ac.uk/im-gt/hla>, y en Genetic diversity of HLA: Functional and Medical Implication, Dominique Charon (Ed.), EDK Medical and Scientific International Publisher, y The HLA FactsBook, Steven G.E. Marsh, Peter Parham y Linda Barber, AP Academic Press, 2000.

Un gen “interrumpido” es el que se ha mutado usando recombinación homóloga u otros enfoques conocidos en la técnica. Un gen interrumpido puede ser un alelo hipomórfico del gen, o un alelo nulo del gen. Un experto en la materia reconocerá que el tipo de alelo a usar se puede seleccionar para cualquier contexto particular. En muchas formas de realización de la invención, se prefiere un alelo nulo.

“Recombinación homóloga” es un enfoque general para dirigir mutaciones a una secuencia génica deseada, preseleccionada, de una célula, a fin de producir un animal transgénico (Mansour, S. L. *et al.*, Nature 336:348-352 (1988); Capecchi, M. R., Trends Genet. 5:70-76 (1989); Capecchi, M. R., Science 244:1288-1292 (1989); Capecchi, M. R. *et al.*, In: Current Communications in Molecular Biology, Capecchi, M. R. (ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), pp. 45-52; Frohman, M. A. *et al.*, Cell 56:145-147 (1989)).

Ahora es factible alterar deliberadamente cualquier gen en un ratón (Capecchi, M. R., Trends Genet. 5:70-76 (1989); Frohman, M. A. *et al.*, Cell 56:145-147 (1989)). La selección de dianas génicas implica el uso de técnicas de ADN recombinante estándar para introducir una mutación deseada en una secuencia de ADN clonada de un locus escogido. Esa mutación se transfiere entonces mediante recombinación homóloga al genoma de una célula madre derivada de embrión (ES), pluripotente. Las células madre alteradas se microinyectan en blastocitos de ratón y se incorporan en el embrión de ratón en desarrollo para desarrollarse finalmente en animales quiméricos. En algunos casos, las células de la extirpe germinal de los animales quiméricos derivarán de las células ES genéticamente alteradas, y los genotipos mutantes se pueden transmitir a través de la reproducción.

La selección de dianas génicas se ha usado para producir ratones quiméricos y transgénicos en los que se ha insertado un gen nptII en el locus de la $\beta 2$ -microglobulina (Koller, B. H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA.) 86:8932-8935 (1989); Zijlstra, M. *et al.*, Nature 342:435-438 (1989); Zijlstra, M. *et al.*, Nature 344:742-746 (1989); DeChiaba *et al.*, Nature 345:78-80 (1990)). Experimentos similares han permitido la producción de animales quiméricos y transgénicos que tienen un gen c-abl que se ha interrumpido mediante la inserción de un gen nptII (Schwartzberg, P. L. *et al.*, Science 246:799-803 (1989)). La técnica se ha usado para producir ratones quiméricos en los que el gen en-2 se ha interrumpido por la inserción de un gen nptII (Joyner, A. L. *et al.*, Nature 338:153-155 (1989)).

A fin de utilizar el método de “selección de dianas génicas”, el gen de interés se ha debido de clonar previamente, y se han debido de determinar las fronteras de intrón-exón. El método da como resultado la inserción de un gen marcador (por ejemplo un gen nptII) en una región traducida de un gen particular de interés. De este modo, el uso del método de selección de dianas génicas da como resultado la destrucción masiva del gen de interés.

De forma significativa, el uso de la selección de dianas génicas para alterar un gen de una célula da como resultado la formación de una alteración masiva en la secuencia de ese gen. La eficacia de la selección de dianas génicas depende de un número de variables, y es diferente de un constructo a otro.

Las células del animal quimérico o transgénico de la presente invención se preparan introduciendo una o más moléculas de ADN en una célula, que puede ser una célula pluripotente precursora, tal como una célula ES, o equivalente (Robertson, E. J., In: Current Communications in Molecular Biology, Capecchi, M. R. (ed.), Cold Spring

Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), pp. 39-44). El término "precursora" pretende significar solamente que la célula pluripotente es un precursor para la célula pluripotente deseada ("cortada transversalmente"), que se prepara según las enseñanzas de la presente invención. La célula pluripotente (precursora o transfectada) se puede cultivar *in vivo* de una manera conocida en la técnica (Evans, M. J. *et al.*, Nature 292:154-156 (1981)) para formar un animal quimérico o transgénico.

Se puede usar cualquier célula ES según la presente invención. Sin embargo, se prefiere aislar aislados primarios de células ES. Tales aislados se pueden obtener directamente de embriones, tales como la extirpe celular CCE descrita por Robertson, E. J., en: Current Communications in Molecular Biology, Capecchi, M. R. (ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), p. 39-44), o del aislamiento clonal de células ES de la extirpe celular CCE (Schwartzberg, P. A. *et al.*, Science 246:799-803 (1989), cuya referencia se incorpora en la presente memoria como referencia). Tal aislamiento clonal se puede lograr según el método de E. J. Robertson (En: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987), cuya referencia y método se incorporan en la presente memoria como referencia. El fin de tal propagación clonal es obtener células ES, que tienen una mayor eficacia para diferenciarse en un animal. Las células ES seleccionadas de forma clonal son aproximadamente 10 veces más eficaces produciendo animales transgénicos que la extirpe celular progenitora CCE. Para los fines de los métodos de recombinación de la presente invención, la selección clonal no proporciona ninguna ventaja.

Un ejemplo de extirpes celulares ES, que se han derivado de forma clonal a partir de embriones, son las extirpes celulares ES AB1 (hprt⁺) o AB2.1 (hprt⁻). Las células ES se cultivan preferentemente en células estrómicas (tales como células STO (especialmente células SNC4 STO) y/o células de fibroblastos embrionarias primarias) como se describe por E. J. Robertson (En: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987, p. 71-112), cuya referencia se incorpora en la presente memoria como referencia. Los métodos para la producción y análisis de ratones quiméricos están descritos por Bradley, A. (En: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, (E. J. Robertson, Ed.), IRL Press, Oxford, 1987, p. 113-151), cuya referencia se incorpora en la presente memoria como referencia. Las células estrómicas (y/o de fibroblastos) sirven para eliminar el sobrecrecimiento clonal de células ES anormales. Lo más preferible, las células se cultivan en presencia del factor inhibidor de leucocitos ("lif") (Gough, N. M. *et al.*, Reprod. Fertil. Dev. 1:281-288 (1989); Yamamori, Y. *et al.*, Science 246:1412-1416 (1989), las cuáles se incorporan en la presente memoria como referencia. Puesto que el gen que codifica lif se ha clonado (Gough, N. M. *et al.*, Reprod. Fertil. Dev. 1:281-288 (1989)), se prefiere especialmente para transformar células estrómicas con este gen, por medios conocidos en la técnica, y después cultivar las células ES en células estrómicas transformadas que segregan lif en el medio de cultivo.

Como se usa en la presente memoria, el término "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico, que es parcial o completamente heteróloga, es decir, extraña, al animal transgénico o célula en el que se introduce, o es homóloga a un gen endógeno del animal transgénico o célula en el que se introduce, pero que se diseña para ser insertada, o es insertada, en el genoma del animal de tal manera para alterar el genoma de la célula en el que se inserta (por ejemplo), se inserta en una localización que difiere de la del gen natural, o su inserción da como resultado un desactivación). Un transgén se puede enlazar operablemente a una o más secuencias reguladoras transcripcionales y a cualquier otro ácido nucleico, tal como intrones, que pueda ser necesario para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado. Los transgenes ejemplares de la presente invención codifican por ejemplo un polipéptido de H-2. Otros transgenes ejemplares están dirigidos a interrumpir uno o más genes de HLA mediante recombinación homóloga con secuencias genómicas de un gen de HLA.

Un "transgén funcional" es el que produce un transcrito de ARNm, que a su vez produce una proteína procesada apropiadamente en al menos una célula del ratón que comprende el transgén. Un experto notará que el conjunto diverso de elementos y secuencias reguladores transcripcionales conocidos que dirigen el procesamiento posttranscripcional proporciona una librería de opciones a partir de la cuál dirigir la expresión de un transgén en un ratón hospedante. En muchas formas de realización de la invención, se puede preferir la expresión de un transgén de HLA bajo el control de un elemento regulador el gen de H-2.

En algunas formas de realización, el transgén de HLA clase I es un transgén de HLA-A2, y el transgén de HLA clase II es un transgén de HLA-DR1. Un ejemplo de un transgén de HLA-A2 es el que comprende la secuencia de HLA-A2 proporcionada en SEC ID n° 1 del listado de secuencias. Un ejemplo de un transgén de HLA-DR1 es el que comprende las secuencias de HLA-DR1 proporcionadas en SEC ID n° 2 y 3 del listado de secuencias.

En una forma de realización, la invención proporciona un ratón transgénico que tiene genes endógenos no funcional de H2 clase I y clase II, en el que el ratón transgénico comprende un transgén funcional de HLA clase I y un transgén funcional de HLA clase II. En otras formas de realización, el ratón tiene el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁺Aβ⁺, en el que el transgén de HLA-A2 comprende la secuencia proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID n° 1, y el transgén de HLA-DR1 comprende las secuencias proporcionadas en el listado de secuencias en SEC ID n° 2 y 3.

Se describen en la presente memoria células de ratón transgénico aisladas. En algunos casos, la célula comprende

5 un gen interrumpido de H2 clase I, un gen interrumpido de H2 clase II, y un transgén funcional de HLA clase I o clase II. En otros, la célula comprende un gen interrumpido de H2 clase I, un gen interrumpido de H2 clase II, un transgén funcional HLA clase I, y un transgén funcional de HLA clase II. El transgén de HLA clase I puede ser un transgén de HLA-A2, y el transgén de HLA clase II puede ser un transgén de HLA-DR1. En algunos casos, el transgén de HLA-A2 comprende la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias, y el transgén de HLA-DR1 comprende la secuencia de HLA-DR1 proporcionada en el listado de secuencias.

10 En una forma de realización, la invención proporciona una célula de ratón transgénico aislada que tiene genes endógenos no funcionales de H2 clase I y clase II, en la que la célula de ratón transgénico comprende un transgén funcional de HLA clase I y un transgén funcional de HLA clase II. Las células de ratón transgénico aisladas pueden tener el genotipo HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁺IAb⁺, en el que el transgén de HLA-A2 comprende la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID n° 1, y el transgén de HLA-DR1 comprende las secuencias de HLA-DR1 proporcionadas en el listado de secuencias en SEC ID n° 2 y 3.

15 Las células de ratón transgénico aisladas de la invención pueden tener el genotipo de cualquier ratón de la invención. Sin embargo, el conjunto de genotipos de las células de ratón transgénico aisladas de la invención, y el conjunto de genotipos de los ratones de la invención no necesariamente solapan de manera total.

20 Las células de ratón aisladas de la invención se pueden obtener a partir de un ratón o un embrión de ratón. En una forma de realización, el ratón o embrión de ratón tiene el mismo genotipo que la célula a obtener. En otra forma de realización, el ratón o embrión de ratón tiene un genotipo diferente de la célula a obtener. Después de que la célula se obtiene del ratón o embrión de ratón, un gen de la célula se puede interrumpir, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. Adicionalmente, se puede introducir un transgén funcional en el genoma de la célula, por ejemplo mediante transfección. Un experto en la materia reconocerá que se puede aplicar cualquier método adecuado conocido en la técnica para modificar el genoma de la célula para obtener de ese modo una célula de ratón aislada que tiene el genotipo deseado.

25 Las células T desempeñan un papel central en muchos aspectos de inmunidad adquirida, llevando a cabo una variedad de funciones reguladoras y defensivas. Cuando algunas células T encuentran una célula infectada o cancerosa, la reconocen como extraña y responden actuando como células asesinas, exterminando las propias células del hospedante como parte de la respuesta inmunitaria mediada por células. Otras células T, denominadas células T auxiliares, responden a antígenos extraños percibidos estimulando a las células B para producir anticuerpos, o suprimiendo ciertos aspectos de la respuesta inmunitaria humoral o celular.

30 Las células T auxiliares (Th) orquestan mucha de la respuesta inmunitaria vía la producción de citocinas. Aunque generalmente identificables como portadoras del marcador de superficie celular CD4, estas células se dividen funcionalmente en subpoblaciones Th1 o Th2, según el perfil de citocinas que producen y su efecto sobre otras células del sistema inmunitario.

35 Las células Th1 detectan patógenos invasores o células hospedantes cancerosas mediante un sistema de reconocimiento denominado como el receptor de antígenos de células T. Denominado inmunidad celular, los procesos relacionados con Th1 implican generalmente la activación de células no B, y se caracterizan frecuentemente por la producción de IFN-γ. No obstante, aunque el sistema de Th1 es principalmente independiente de la producción de anticuerpos humorales, las citocinas de Th1 promueven el intercambio de clases de inmunoglobulinas al isotipo IgG_{2a}.

40 Al detectar un antígeno extraño, la mayoría de las células Th1 maduras dirigen la liberación de IL-2, IL-3, IFN-γ, TNF-β, GM-CSF, niveles elevados de TNF-α, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES. Estas citocinas promueven la hipersensibilidad de tipo retrasada y la inmunidad mediada por células general. Por ejemplo, IL-2 es un factor de crecimiento de células T que promueve la producción de un clon de células T adicionales sensibles al antígeno particular que se detectó inicialmente. Las células T sensibilizadas se unen y atacan a células o patógenos que contienen el antígeno.

45 Por el contrario, las células Th2 maduras tienden a promover la secreción de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF, y niveles bajos de TNF-α. Además, la respuesta de Th2 promueve la inmunidad humoral activando células B, estimulando la producción y secreción de anticuerpos, e induciendo el intercambio de clases a los isotipos IgA, IgG₁ e IgE.

50 Como se usa en la presente memoria, un "antígeno" comprende: 1) al menos un epítipo de HTL, o 2) al menos un epítipo de CTL, o 3) al menos un epítipo de célula B, o 4) al menos un epítipo de HTL y al menos un epítipo de CTL, o 5) al menos un epítipo de HTL y al menos un epítipo de célula B, o 6) al menos un epítipo de CTL y al menos un epítipo de célula B, o 7) al menos un epítipo de HTL y al menos un epítipo de CTL y al menos un epítipo de célula B. Un "antígeno candidato" es una molécula que está bajo investigación para determinar si funciona como un antígeno.

65

Una "respuesta inmunitaria humoral" es una inmunidad específica mediada por anticuerpos.

Un "epítipo" es un sitio en un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario. Un epítipo de anticuerpo en un sitio en un antígeno reconocido por un anticuerpo. Un epítipo de célula T es un sitio en un antígeno que se une a una molécula de MHC. Un epítipo de TH es el que se une a una molécula de MHC clase II. Un epítipo de CTL es el que se une a una molécula de MHC clase I.

El antígeno puede comprender una secuencia polipeptídica o una secuencia polinucleotídica, que puede comprender ARN, ADN, o ambos. En una forma de realización, el antígeno comprende al menos una secuencia polinucleotídica que codifica operacionalmente uno o más polipéptidos antigénicos. Usado en este contexto, la palabra "comprende" pretende que se proporcione al menos un polipéptido antigénico mediante el aparato de transcripción y/o traducción de una célula hospedante que actúa sobre un polinucleótido exógeno que codifica al menos un polipéptido antigénico, como se describe, por ejemplo, en la patente US nº 6.194.389 y 6.214.808.

Los antígenos de la invención pueden ser cualquier molécula antigénica. Las moléculas antigénicas incluyen: proteínas, lipoproteínas, y glucoproteínas, incluyendo proteínas víricas, bacterianas, parasitarias, de animal, y fúngicas, tales como albúminas, toxoide del tétano, toxoide de la difteria, toxoide de pertussis, proteínas de la membrana externa bacteriana (incluyendo proteína de la membrana externa meningocócica), proteína RSV-F, péptido derivado de la malaria, B-lactoglobulina B, aprotinina, ovoalbúmina, lisozima, y antígenos asociados a tumores, tales como antígeno carcinoembrionario (CEA), CA 15-3, CA 125, CA 19-9, antígeno específico de la próstata (PSA), y los complejos de TAA de la patente US nº 5.478.556, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad; hidratos de carbono, incluyendo polisacáridos de origen natural y sintéticos, y otros polímeros tales como ficoll, dextrano, carboximetilcelulosa, agarosa, poliacrilamida y otras resinas acrílicas, poli(lactida-co-glucolida), polialcohol vinílico, poliacetato de vinilo parcialmente hidrolizado, polivinilpirrolidona, polisacáridos capsulares estreptocócicos y neumocócicos del Grupo B (incluyendo tipo III), mucoexopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa*, y polisacáridos capsulares (incluyendo fisher tipo I), y polisacáridos de *Haemophilus influenzae* (incluyendo PRP); haptenos, y otros restos que comprenden moléculas de bajo peso molecular, tales como TNP, sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, toxinas, fármacos, productos químicos, y alérgenos; y haptenos y antígenos derivados de bacterias, rickettsiae, hongos, virus, parásitos, incluyendo difteria, pertussis, tétano, H. influenzae, S. pneumoniae, E. Coli, Klebsiella, S. aureus, S. epidermidis, N. meningitidis, polio, sarampión, varicela, rubeola, virus sincitial respiratorio, rabia, Ébola, carbunco, listeria, hepatitis A, B, C, virus de inmunodeficiencia humano I y II, herpes simple tipos I y II, CMV, EBV, varicela Zóster, malaria, tuberculosis, *Candida albicans*, y otras cándidas, *Pneumocystis carinii*, micoplasma, virus de la gripe A y B, adenovirus, estreptococo del Grupo A, estreptococo del Grupo B, *Pseudomonas aeruginosa*, rinovirus, leishmania, parainfluenza, tipos 1, 2 y 3, coronavirus, Salmonella, Shigella, Rotavirus, Toxoplasma, Enterovirus, y *Chlamydia trachomatis* y *pneumoniae*.

Como se usa en la presente memoria, una composición farmacéutica o vacuna comprende al menos una composición inmunológica, que se puede disolver, suspender o de otro modo asociar con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Para la administración de la composición se puede emplear cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (A. Gennaro, ed., 1990), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Los vehículos pueden ser líquidos estériles, tales como agua, polietilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), aceites, incluyendo aceite de petróleo, aceite animal, aceite vegetal, aceite de cacahuete, aceite de haba de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. Los vehículos pueden estar en forma de neblinas, pulverizaciones, polvos, ceras, cremas, supositorios, implantes, bálsamos, ungüentos, parches, cataplasmas, películas o preparaciones cosméticas.

La formulación apropiada de la composición farmacéutica o vacuna depende de la vía de administración escogida. Por ejemplo, con administración intravenosa mediante inyección de bolo o infusión continua, las composiciones son preferentemente solubles en agua, y la disolución salina es el vehículo preferido. Para la administración transcutánea, intranasal, oral, gástrica, intravaginal, intrarrectal, u otra administración transmucosal, se pueden incluir en la formulación agentes penetrantes apropiados a la barrera a permear, y son conocidos en la técnica. Para la administración oral, el ingrediente activo se puede combinar con vehículos adecuados para la inclusión en comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, y similares. También son aplicables los sistemas de suministro sensibles al tiempo para la administración de las composiciones de la invención. Los sistemas representativos incluyen sistemas a base de polímeros, tales como poli(lactida-glucósido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, poliácido hidroxibutírico y polianhídridos. Estos y polímeros similares se pueden formular en microcápsulas según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se enseña en la patente US nº 5.075.109. Los sistemas de suministro alternativos apropiados para la administración de los compuestos inmunoestimulantes descritos de la invención incluyen los descritos en las patentes US nº 6.194.389, nº 6.024.983, nº 5.817.637, nº 6.228.621, nº 5.804.212, nº 5.709.879, nº 5.703.055, nº 5.643.605, nº 5.643.574, nº 5.580.563, nº 5.239.660, nº 5.204.253, nº 4.748.043, nº 4.667.014, nº 4.452.775, nº 3.854.480, y nº 3.832.252.

También se pueden emplear como vehículos líquidos las disoluciones acuosas de dextrosa y de glicerol, particularmente para disoluciones inyectables o de aerosol. Para la administración mediante aerosol, así como

mediante pulverización o nebulizador a presión, se pueden añadir propelentes adecuados como lo entienden los expertos en la materia. La composición inmunológica también se puede formular con agentes solubilizantes; emulsionantes; estabilizantes; dispersantes; saborizantes; adyuvantes; vehículos; anestésicos típicos, tales como lidocaína, xilocaína, y similares; antibióticos; y compuestos antivíricos, antifúngicos, antiparasitarios, o antitumorales conocidos o sospechosos.

Un "adyuvante" es una composición que promueve o potencia una respuesta inmunitaria frente a un antígeno diana. El experto en la materia puede seleccionar un adyuvante apropiado para uso en la práctica de la presente invención a la vista de la presente descripción.

Se describen en la presente memoria métodos para tratar a un paciente que necesita de estimulación inmunitaria administrando una composición que comprende uno o más antígenos como se describe en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, el tratamiento engloba métodos correctivos, de restauración, de mejora, y preventivos, relacionados con cualquier enfermedad, afección, anomalía o síntoma. El tratamiento engloba además la provocación o supresión de una respuesta inmunitaria en un animal experimental o *ex vivo*.

De este modo, el tratamiento comprende administrar una cantidad inmunoestimulante de cualquiera de las composiciones inmunoestimulantes de la invención mediante cualquier método habitual para los expertos en la materia, incluyendo habitualmente vías orales e intranasales, e inyecciones intravenosas, intramusculares, y subcutáneas, pero englobando también la administración intraperitoneal, intracorpórea, intraarticular, intraventricular, intratecal, tópica, tonsiliar, mucosal, transdérmica, intravaginal, y mediante sonda nasogástrica.

Como reconoce el experto, la elección de un método de administración apropiado puede contribuir a la eficacia de un tratamiento, y para algunas aplicaciones se puede preferir la administración local. Las vías aceptables de administración local incluyen la inyección subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intravítrea, la inhalación o la sonda nasogástrica, la administración oral, intranasal, y la inyección directa en un tejido, órgano, articulación, tumor, o masa celular predeterminado. Por ejemplo, la aplicación mucosal o inyección en ganglios linfáticos mucosales o parches de Peyer puede promover una respuesta inmunitaria humoral con un intercambio de clase de IgA sustancial. Como alternativa, la inyección dirigida en una lesión, foco, o sitio corporal afectado, puede ser aplicable para el tratamiento de tumores sólidos, infecciones localizadas, u otros sitios que requieran la estimulación inmunitaria.

Como alternativa, las células del sistema inmunitario (por ejemplo, células T, células B, células NK, u oligodendrocitos) se pueden retirar de un hospedante y se pueden tratar *in vitro*. Las células tratadas se pueden cultivar después o reintroducir en un paciente (o a un hospedante heterólogo) para proporcionar estimulación inmunitaria al paciente u hospedante. Por ejemplo, se pueden aspirar células de médula ósea de un paciente y se pueden tratar con un HDR para estimular la inmunidad global o específica. Entonces se puede usar radiación de dosis alta, o tratamientos comparables, para destruir las células inmunitarias que quedan en el paciente. Con el reimplante, las células estimuladas autólogas restaurarán la función inmunitaria normal en el paciente. Como alternativa, las células NK y/o T aisladas de un paciente que padece cáncer se pueden exponer *in vitro* a uno o más antígenos específicos para el cáncer del paciente. Con el reimplante en el paciente, las células estimuladas mediante el antígeno presentarán una respuesta inmunitaria celular vigorosa frente a las células cancerosas.

Una cantidad inmunoestimulante (eficaz) se refiere a la cantidad de vacuna que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en un paciente, que es suficiente para prevenir, mejorar o de otro modo tratar una exposición patógena, alergia, o anomalía o afección inmunológica. Una cantidad inmunoestimulante es la cantidad que proporciona un incremento medible en una respuesta inmunitaria humoral o celular frente a al menos un epítipo del antígeno en comparación con la respuesta obtenida si el antígeno se administra al paciente sin tratamiento previo con la vacuna. De este modo, por ejemplo, una cantidad inmunoestimulante se refiere a la cantidad de una composición que contiene antígeno que es capaz de promover la producción de anticuerpos dirigidos contra un epítipo antigénico de interés, o estimular un efecto protector detectable frente a una exposición patógena o alérgica, o promover una respuesta de CTL protectora frente a un epítipo antigénico de interés.

El tratamiento con una cantidad inmunoestimulante de una composición que contiene antígeno comprende efectuar cualquier incremento directa, indirecta o estadísticamente observable o medible, u otro cambio deseado en la respuesta inmunitaria en un hospedante, que incluye específicamente un hospedante de cultivo tisular *ex vivo* que comprende al menos una célula del sistema inmunitario o extirpe celular derivada de ella. Las células hospedantes pueden derivar de sangre periférica humana o animal, ganglios linfáticos o similares. Los hospedantes de cultivo tisular preferidos incluyen células T recientemente aisladas, células B, macrófagos, oligodendrocitos, células NK, y monocitos, cada uno de los cuáles se puede aislar o purificar usando técnicas estándar. Las respuestas observables o medibles incluyen proliferación o actividad de células B o T; secreción aumentada de anticuerpos; intercambio isotópico, liberación incrementada de citocinas, particularmente la liberación incrementada de uno o más de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , o RANTES; título o avidéz incrementada de anticuerpos frente a un antígeno específico; tasas de morbilidad reducidas asociadas con una infección patógena; promoción, inducción, mantenimiento o refuerzo de la latencia vírica; supresión o de otro modo mejora del crecimiento, metástasis, o efectos de tumores malignos y no malignos; y

provisión de protección profiláctica de una enfermedad o los efectos de una enfermedad.

Cuando se desea la supresión de una respuesta inmunológica, por ejemplo en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria o alergia, una cantidad eficaz también engloba la cantidad suficiente para efectuar una disminución medible u observable en una respuesta asociada con la afección o patología a tratar.

La cantidad de una composición que contiene antígeno a administrar, y la frecuencia de administración, se puede determinar empíricamente, y tendrá en cuenta la edad y tamaño del paciente a tratar, y la afección o enfermedad a resolver. Una dosis apropiada está en el intervalo de 0,01 µg a 100 µg por inóculo, pero también están indicadas cantidades más elevadas y más bajas. Se pueden administrar inmunizaciones de recuerdo secundarias, a intervalos que oscilan desde una semana hasta muchos meses más tarde.

Ejemplos

Las siguientes técnicas y reactivos experimentales se usaron para demostrar ciertas formas de realización no limitantes de la invención.

Ratones transgénicos

Los ratones *KO* de *H-2 clase II (IA β^b)* transgénicos de *HLA-DR1* se obtuvieron en el Institut Pasteur de Lille cruzando ratones transgénicos de *HLA-DR1* (Altmann, D.M. *et al.*, J Exp Med 181, 867-875 (1995)) con ratones *KO* de *H-2 clase II (IA β^b)* (Rohrlich, P.S. *et al.*, Int Immunol 15, 765-772 (2003)). Se crearon ratones transgénicos de *HLA-A2.1*, que expresan una monocadena quimérica (molécula de *HHD*: dominio α1-α2 de *HLA-A2.1*, dominio α3 a dominios citoplásmicos de *H-2 D^b*, enlazados en su término N al término C de β2n humana por un ligador peptídico de 15 aminoácidos) (Pascolo, S. *et al.*, J Exp Med 185, 2043-2051 (1997)). Se inter cruzaron ratones de *KO de H-2 clase I* transgénicos de *HLA-A2.1 (HHD)* y *KO de H-2 clase II (IA β^b)* transgénicos de *HLA-DR1*, y las progenies se seleccionaron hasta que se obtuvieron animales *KO* de *H-2 clase I (β2m⁰/clase II (IA β^b))* doblemente transgénicos de *HLA-A2.1^{+/-}/HLA-DR1^{+/-}*, y se usaron para los experimentos descritos en la presente memoria. Como controles en los ensayos de protección, se usaron ratones *KO* de *H-2 clase I (β2m⁰/clase II (IA β^b))* monotransgénicos de *HLA-A2.1^{+/-}*. Los ratones se criaron en las instalaciones de animales en el Institut Pasteur, Paris; todos los protocolos se revisaron por la autoridad competente del Institut Pasteur, para el cumplimiento con las regulaciones francesas y europeas sobre bienestar animal y con las recomendaciones del Servicio Público de Salud.

Genotipado

Los transgenes de *HLA-DRB1*0101*, *HLA-DRA*0101* y *HLA-A*0201* se detectaron mediante PCR. El tail-DNA se extrajo tras la incubación durante toda la noche a 56°C en NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,2, EDTA 100 mM, 1% de SDS y 0,5 mg/ml de proteinasa K, seguido de la adición de 250 µl de disolución saturada de NaCl y precipitación con isopropanol. Las muestras se lavaron (3x) en etanol al 70% y se resuspendieron en 150 µl de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8. Las condiciones de PCR fueron: 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq polimerasa, tampón suministrado por el fabricante (InVitrogen, Carlsbad, CA), 1 ciclo (7 min, 94°C), 40 ciclos (30 segundos, 94°C; 30 segundos, 60°C; 1 min, 72°C), 1 ciclo (4 min, 72°C), usando como cebadores directos e inversos, para *HHD*: 5' CAT TGA GAC AGA GCG CTT GGC ACA GAA GCA G 3' y 5' GGA TGA CGT GAG TAA ACC TGA ATC TTT GGA GTA CGC 3', para *HLA-DRB1*0101*: 5' TTC TTC AAC GGG ACG GAG CGG GTG 3' y 5' CTG CAC TGT GAA GCT CTC ACC AAC 3', y para *HLA-DRA*0101*: 5' CTC CAA GCC CTC TCC CAG AG 3' y 5' ATG TGC CTT ACA GAG GCC CC 3'.

Análisis de FACS

Se llevaron a cabo estudios de citofluorimetría sobre esplenocitos purificados mediante Lympholyte M (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, Francia), sin glóbulos rojos, usando m.Ab W6/32 conjugado con FITC (anti-*HLA-ABC*, Sigma, St Louis, MO) y anti-28-8-6S biotinilado (anti-*H-2 K^b/D^b*, BD Biosciences, San Diego, CA). Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se tiñeron usando m.Ab anti-CD4 de ratón CT-CD4 marcado con PE (CALTAG, South San Francisco, CA) y anti-CD8 de ratón 53-6.7 marcado con FITC (BD Biosciences). El análisis de la expresión de las moléculas de MHC clase II se llevó a cabo en linfocitos B B220⁺ seleccionados positivamente en columnas de MS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Tras la saturación de los receptores Fc con m.Ab 2.4G2, se analizó la expresión de *HLA-DR1* y *H-2 IA^b* usando m.Ab L243 marcado con FIT (anti-*HLA-DR*) y AF6-120.1 marcado con PE (anti-*H-2 IA^b*) (BD Biosciences). Las células fijadas en paraformaldehído se analizaron con un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson, Bedford, MA).

Análisis inmunoscópicos

Las células T CD4⁺ y CD8⁺ de ratones sin tratamiento se seleccionaron positivamente en Auto-Macs (Miltenyi Biotec), el ARN se preparó usando el RNA Easy Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), y se usó para la síntesis de ADNc. El ADNc se amplificó mediante PCR usando cebadores directos específicos para cada familia de segmentos *BV*, y

un cebador inverso compartido por los dos segmentos de *BC*. Los productos de la PCR se sometieron a un alargamiento de recorrido con un cebador marcado con *BC* FAM interno. Los productos del alargamiento se cargaron en un gel de 6% de acrilamida/urea 8M para la separación (7h, 35W) con un secuenciador 373A DNA (Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, CA). Los datos se analizaron usando software inmunoscópico (Pannetier, C. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4319-4323 (1993)).

Péptidos

Los péptidos de unión a HLA-A2 HBsAg₃₄₈₋₃₅₇ GLSPTVWLSV y HBsAg₃₃₅₋₃₄₃ WLSLLVPFV, el péptido de unión a H-2 K^b HBsAg₃₇₁₋₃₇₈ ILSPFLPL, el péptido de unión a HLA-DR1 HBsAg₁₈₀₋₁₉₅ QAGFFLLTRILTIPQS, el péptido de unión a H-2 IA^b HBsAg₁₂₆₋₁₃₈ RGLYFPAGGSSSG y el péptido HBsAg₁₀₉₋₁₃₄ MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYF-PAGG, se sintetizaron mediante Neosystem (Strasbourg, Francia), y se disolvieron en PBS-10% de DMSO a una concentración de 1 mg/ml. La numeración de la secuencia de aminoácidos de los péptidos comienza desde la primera metionina del dominio preS1 del subtipo *ayw* de HBV.

Inmunización con ADN que codifica las proteínas S2-S de HBV

El vector plasmídico pCMV-S2.S (Michel, M.L., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 92, 5307-5311 (1995)), que codifica los antígenos de superficie preS2 y S HBV expresados bajo el control del promotor génico temprano inmediato de CMV humano, se purificó en columnas de Plasmid Giga Kit en condiciones libres de endotoxina (Qiagen). Los ratones anestesiados se inyectaron (50 µg en cada lado) en los músculos de la tibia anterior que se regeneran, como se describe previamente (Davis, H.L., Michel, M.L. y Whalen, R.G., Hum Mol Genet 2, 1847-1851 (1993)).

Ensayo de proliferación de células T

Doce días después de la última inmunización, los esplenocitos purificados con Ficoll, sin glóbulos rojos ($5 \cdot 10^6$ células/matraz de cultivo 25 cm² (Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Suiza)) se cultivaron con blastos de LPS pulsados con péptidos (20 µg/ml), irradiados con γ (180Gy) ($5 \cdot 10^6$ células/matraz de cultivo) en medio RPMI suplementado con 10% de FCS, 10 mM de HEPES, 1 mM de pirovato de sodio, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina y 100 µg de estreptomina como se describe (Loirat, D., Lemonnier, F.A. y Michel, M.L., J Immunol 165, 4748-4755 (2000)). En el séptimo día, para los ensayos de proliferación, las células se colocaron en placas (5×10^5 células/pocillo de microplacas de 96 pocillos de fondo plano, (TPP)) con blastos de LPS irradiados pulsados con péptido (2×10^5 células/pocillo) durante 72 h en medio RPMI completo suplementado con 3% de FCS. Las células expulsaron durante las 16 h finales con 1 µCi de (³H)-timidina por pocillo antes de ser cosechadas en filtros con un colector TOMTEC (Perkin Elmer Applied Biosystem), y la radioactividad incorporada se midió en un contador micro-β (Perkin Elmer Applied Biosystem). Los resultados se dan como índice de estimulación (SI) = cpm con péptido específico/cpm con péptido irrelevante.

Medida de la actividad de CTL

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en las mismas poblaciones de esplenocitos inmunes como los ensayos de proliferación. Las células respondedoras ($5 \cdot 10^6$ células/matraz de cultivo de 25 cm², TPP) y los blastos de LPS pulsados con péptido estimuladores (20 µg/ml), irradiados con γ (180 Gy) ($5 \cdot 10^6$ células/matraz de cultivo) se cocultivaron durante 7 días en el mismo medio RPMI suplementado que para los ensayos de proliferación. La actividad citolítica se ensayó en un ensayo estándar de 4 h con ⁵¹Cr frente a células diana de RMA-S HHD pulsadas con 10 µg/ml de los péptidos experimentales o de control. La lisis específica en %, se calculó en duplicados, según: [liberación experimental-espontánea]/[liberación máxima-espontánea] x 100, restando la lisis no específica observada con el péptido de control.

Medida de la producción de anticuerpos *in vivo*

En diversos momentos antes y después de la inyección de ADN, se recogió sangre de los ratones mediante punción retrobulbar con pipetas de vidrio heparinizadas, y los sueros recuperados mediante centrifugación se ensayaron para determinar anti-HBs y anti-preS2 mediante ELISA específico. Como fase sólida, se usaron partículas recombinantes purificadas que contienen proteína S pequeña de HBV (1 µg/ml) o péptido sintético preS2 (120-145) (1 µg/ml). Después del bloqueo con PBST (PBS que contiene 0,1% de Tween 20) suplementado con 10% de FCS, se añadieron diluciones en serie. Después del intenso lavado, los anticuerpos unidos se detectaron con anti-IgG de ratón (IgG total) marcado con peroxidasa de rábano picante (Amersham, Little Chalfont, UK). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante el método de dilución de punto final en serie. Los sueros de ratón se ensayaron individualmente, y los títulos fueron la media de al menos tres determinaciones. Las diluciones séricas por debajo de 1/100 se consideraron negativas.

Titulación de anticuerpos

Los sueros de ratones inmunizados se ensayaron individualmente mediante ELISA (Michel, M.L. *et al.*, Proc Natl

Acad Sci U S A 92, 5307-5311 (1995)) en proteínas medias y pequeñas de HBV purificadas o péptido HBS₁₀₉₋₁₃₄ sintético preS2. Después de bloquear con PBS 1x suplementado con 0,1% de Tween 20, 10% de FCS y lavados (x 3), los anticuerpos unidos se detectaron con anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Amersham, Little Chalfont, UK). Los títulos de anticuerpos (medias de al menos 3 determinaciones) se determinaron mediante el método de dilución de punto final en serie. Los títulos por debajo de 1/100 se consideraron negativos.

Exposición a las vacunas y ensayo de placas

Los ratones inyectados con ADN se expusieron intraperitonealmente 12 días después de la última inyección con 10^7 PFU de virus de la vacuna recombinante (cepa Western Reserve) que expresa HbsAg (Smith, G.L., Mackett, M. y Moss, B., Nature 302, 490-495 (1983)) o la proteína HBx (Schenk, N., Bartenschlager, R., Kuhn, C. y Schaller, H., Oncogene 6, 1735-1744. (1991)) proporcionados amablemente, de forma respectiva, por Dr B. Moss y Dr H.Schaller. Cuatro días más tarde, los ovarios se ensayaron para determinar los títulos de rVV mediante ensayo de placas en células BHK 21 (Buller, R.M. y Wallace, G.D., Lab Anim Sci 35, 473-476 (1985)).

Ejemplo 1: Expresión de superficie celular de moléculas de MHC

La expresión de superficie celular de las moléculas de HLA-A2.1, H-2 K^b/D^b, HLA-DR1, y H-2 IA^b se evaluó en esplenocitos mediante citometría de flujo. Como se ilustra en la figura 1a, se observó un nivel similar de expresión de HLA-A2.1 en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* y ratones KO de *H-2 clase I*, transgénicos de *HLA-A2.1*, mientras que HLA-A2.1 estaba ausente, y H-2 K^b/D^b se expresó exclusivamente en ratones KO de *H-2 clase II*, transgénicos de *HLA-DR1*. La expresión de superficie celular de HLA-DR1 y H-2 IA^b se midió en células B enriquecidas con B220⁺. Como se muestra en la figura 1b, se observó un nivel similar de expresión de HLA-DR1 en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, y en ratones KO de *H-2 clase II*, transgénicos de *HLA-DR1*, mientras que no se detectó ninguna expresión en ratones KO de *H-2 clase I*, transgénicos de *HLA-A2.1*. La expresión de superficie celular de las moléculas transgénicas (especialmente HLA-DR1) fue sin embargo menor que la expresión de las moléculas endógenas de H2 clase I y clase II.

Ejemplo 2: Células T CD4⁺ y CD8⁺ periféricas

Los números de células T esplénicas CD4⁺ y CD8⁺ se determinaron mediante inmunotinción y análisis de citometría de flujo como se ilustra en la figura 2a.

Las células T CD4⁺ representaron el 13-14% de la población de esplenocitos tanto en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, como en ratones KO de *H-2 clase II* transgénicos de *HLA-DR1*. Por el contrario, sólo el 2-3% de las células fueron CD4⁺ en ratones KO de *H-2 clase II* (datos no mostrados), de acuerdo con el informe inicial sobre ratones que carecen de moléculas de MHC clase II (Cosgrove, D. *et al.*, Cell 66, 1051-1066 (1991)). Como era de esperar, la expresión de las moléculas de HLA-A2.1 transgénicas condujo a un incremento en el tamaño de la población de células T CD8⁺ periféricas, que alcanzó 2-3% de los esplenocitos totales tanto en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, como en ratones KO de *H-2 clase I*, transgénicos de *HLA-A2.1*, en comparación con 0,6-1% en los ratones deficientes en MHC clase I KO de $\beta 2m$ (Pascolo, S. *et al.*, J Exp Med 185, 2043-2051 (1997)).

Los resultados presentados en los Ejemplos 1 y 2 muestran que:

- (1) En los ratones HLA-A2+HLA-DR1+ $\beta 2m$ ^oIA β ^o, la expresión de moléculas de HLA-A2, la ausencia de expresión de moléculas H2-K^b, el número de linfocitos T periféricos CD8⁺ y la diversidad del repertorio T CD8⁺ son generalmente comparables al ratón HLA-A2+ $\beta 2m$ ^o;
- (2) En el ratón HLA-A2+HLA-DR1+ $\beta 2m$ ^oIA β ^o, la expresión de moléculas de HLA-DR1, la ausencia de expresión de moléculas H2-IA^b, el número de linfocitos T CD4⁺, y la diversidad del repertorio de CT4⁺ son generalmente comparables al ratón HLA-DR1+IA β ^o; y
- (3) El ratón HLA-A2+HLA-DR1+ $\beta 2m$ ^oIA β ^o tiene todas las ventajas características encontradas en ratones HLA-A2+ $\beta 2m$ ^o, y los ratones HLA-DR1+IA β ^o.

Ejemplo 3: Uso del segmento de BV TCR

Puesto que la presencia de una única molécula de MHC clase I y una única molécula de MHC clase II podría disminuir el tamaño y diversidad del repertorio de TCR, se estudió la expresión de las diversas familias de BV y la diversidad de la longitud de CDR3 como se describe previamente (Cochet, M. *et al.*, Eur J Immunol 22, 2639-2647 (1992)) mediante la técnica inmunoscópica a base de RT-PCR, en células T CD4⁺ o CD8⁺ esplénicas purificadas. Se observaron picos de magnitud significativa con una distribución parecida a la Gausiana para la mayoría de las familias de BV (15 de las 20 analizadas) tanto en poblaciones de CD8⁺ (figura 2b) como CD4⁺ (figura 2c) de células T. Tales perfiles observados en linfocitos T periféricos son típicos de segmentos de BV reordenados funcionalmente

con una variación de longitud de tres nucleótidos de las subregiones de CDR3 desde un pico al siguiente (Cochet, M. *et al.*, Eur J Immunol 22, 2639-2647 (1992)).

La ausencia de expansión (o perfil profundamente alterado) como se observa para BV 5.3 y 17 fue esperada puesto que estos dos segmentos de BV son pseudogenes en ratones C57BL/6 (Wade, T., Bill, J., Marrack, P.C., Palmer, E. y Kappler, J.W., J Immunol 141, 2165-2167 (1988)); Chou, H.S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 84, 1992-1996 (1987). Sin embargo, los perfiles alterados observados para los segmentos de BV 5.1, 5.2 y 11 fueron debidos a una pequeña subpoblación de células T que expresan BV correspondientes (representan menos de 5% en ratones C57BU6, y alrededor de 2% en ratones KO de *H-2 clase II* transgénicos de *HLA-DR1*) (datos no mostrados). Excepto en estos casos, las células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, presentan, respectivamente, un patrón de uso de la cadena de BV de TCR y una diversidad de CDR3 que es similar a la de los ratones C57BL/6 no transgénicos.

Ejemplo 4: Caracterización funcional

Se analizaron ratones HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁺IAβ^o inmunizados con Ag HBs (proteína de cubierta de hepatitis B). La figura 5 muestra la respuesta humoral específica, como se indica mediante la producción de anticuerpos de HBs S2. La figura 6 muestra la respuesta de proliferación de CD4⁺ restringida a DR1 específica de HBs₃₄₈₋₃₅₇. y la figura 7 muestra la respuesta de T citolítica CD8⁺ restringida a HLA-A2 específica de la HBs₃₄₈₋₃₅₇ o HBs₃₃₅₋₃₄₃.

Estos resultados muestran que el ratón HLA-A2⁺HLA-DR1⁺β2m⁺IAβ^o permite el análisis simultáneo de la respuesta humoral específica, de la respuesta restringida a HLA-DR1 específica de Ag de células T auxiliares CD4⁺, y de la respuesta citolítica de células T CD8⁺ restringidas a HLA-A2 específicas de Ag en un individuo inmunizado.

En las siguientes Tablas 1-3 se proporcionan datos adicionales obtenidos de estos ratones.

Tabla 1. Respuestas proliferativas de T CD4⁺ frente a epítopos de HLA-DR1 de la cubierta del virus HBV a partir de ratones transgénicos de HLA-A2+DR1+H-2 CI-CII inyectados con PCMV S2-S.

posición	Secuencia de aminoácidos	Ratón respondedor/ensayado	Índice de estimulación
109-134	MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGG	(12/12)	3-4
200-214	TSLNFLGGTTVCLGQ	(6/12)	3-4
16/31	QAGFFLLTRILTIPQS	(12/12)	3-6
337/357	SLLVPFVQWVGLSPTVWLSV	(5/12)	4-5

Tabla 2. Respuesta citolítica a ratones transgénicos de HLA-A2+DR1+H-2 CI-CII inyectados con pcmv S2-S

posición	Secuencia de aminoácidos	Ratón respondedor/ensayado	Lisis máxima
348-357	GLSPTVWLS	(12/12)	20-70%
335-343	WLSLLVPVF	(4/12)	30%

Tabla 3. Respuesta de anticuerpos anti-PreS2 de ratones transgénicos de HLA-A2+DR1+H-2 CI-CII inyectados con pcmv S2-S

posición preS2	Secuencia de aminoácidos	Ratón respondedor/ensayado
	MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGG	(9/12)

Ejemplo 5: Respuesta inmunitaria a la vacuna de HbsAg-ADN

Para evaluar el potencial inmunológico de ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, y comparar sus respuestas humorales, de células CD4⁺ y CD8⁺ con las de humanos, se inmunizaron ratones con un plásmido de HbsAg-ADN. Este plásmido codifica dos proteínas de cubierta del virus de la hepatitis B (preS2/S media y S/pequeña) que se autoensamblan en partículas que poseen el antígeno de superficie de la hepatitis B. La vacuna usada actualmente frente a la hepatitis B comprende estas dos proteínas.

Como se ilustra en la figura 3a para un ratón representativo, los anticuerpos específicos de HBsAg se detectaron por primera vez en el día 12 tras la inyección de la vacuna de HBsAg-ADN (figura 3a, panel superior), y el título de estos anticuerpos aumentó hasta el día 24 (12 días después de la segunda inmunización de ADN; datos no mostrados). Esta respuesta de anticuerpos temprana fue específica para el epítopo de células preS2-B (HBs₁₀₉₋₁₃₄) portado por la proteína de cubierta de HBV media, y para partículas de HBsAg, de acuerdo con una respuesta similar dada a conocer en ratones inmunizados con HBsAg-ADN (Michel, M.L. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 92, 5307-5311 (1995)) y en seres humanos vacunados con HBsAg (Mouliá-Pelat, J.P. *et al.*, Vaccine 12, 499-502 (1994)).

La respuesta de CTL y CD8⁺ frente a HBsAg se examinó si las células y CD8⁺ en la periferia de los ratones de KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR9*, estaban funcionalmente restringidas por las moléculas de clase I humanas transgénicas. En seres humanos HLA-A2.1⁺ infectados con HBV, la respuesta de CTL específica

de HBsAg restringida a HLA-A2.1 inmunodominante está dirigida al HBsAg₃₄₈₋₃₅₇ (Maini, M.K. *et al.*, Gastroenterology 117, 1386-1396 (1999)) y al HBsAg₃₃₅₋₃₄₃ (Nayersina, R. *et al.*, J Immunol 150, 4659-4671 (1993)) (es decir, se observa una respuesta multiepitópica). En ratones C57BU6, la respuesta de CTL específica de HBsAg restringida a H-2 K^b está dirigida al péptido HBsAg₃₇₁₋₃₇₈ (Schirmbeck, R., Wild, J. y Reimann, J., Eur J Immunol 28, 4149-4161 (1998)). Para evaluar si el ratón humanizado puede responder como seres humanos, se volvieron a estimular células T esplénicas durante 7 días, como se describe en la presente memoria, con el péptido relevante (HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, HLA-A2.1) o de control (HBsAg₃₇₁₋₃₇₈, restringido a H-2 K^b; MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉, restringido a HLA-A2.1). La figura 3a (panel central) muestra que la inmunización con HBsAg-ADN provocó una potente respuesta de CTL específica de HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, pero ninguna respuesta al péptido HBsAg₃₇₁₋₃₇₈ o el péptido MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉.

Para determinar si las células T CD4⁺ en la periferia de este ratón de KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénico de *HLA-A2.1/HLA-DR1* pueden estar funcionalmente restringidas por las moléculas de clase II humanas transgénicas, se examinó la respuesta de células T CD4⁺ a la proteína HBsAg. En seres humanos HLA-DR1⁺ vacunados con HBsAg o infectados con HBV, una respuesta de célula T CD4⁺ específica de HBsAg restringida a HLA-DR1 inmunodominante está dirigida al péptido HBsAg₁₈₀₋₁₉₅ (Mm, W.P. *et al.*, Hum Immunol 46, 93-99 (1996)). En ratones C57BU6, la respuesta de célula T CD4⁺ restringida a H-2 IA^b específica de HbsAg está dirigida al péptido HBsAg₁₂₆₋₁₃₈ (Milich, D.R., Semin Liver Dis 11, 93-112(1991)). Para comparar el ratón humanizado con los ratones de tipo salvaje y con seres humanos, se volvieron a estimular *in vitro* células T esplénicas o los péptidos relevantes (HBsAg₁₈₀₋₁₉₅, restringido a HLA-DR1) o de control (HBsAg₁₂₆₋₁₃₈, restringido a H-2 IA^b; HIV 1 Gag₂₆₃₋₂₇₈, restringido a HLA-DR1). La figura 3a (panel inferior) muestra una fuerte respuesta proliferativa dirigida contra el péptido HBsAg₁₈₀₋₁₉₅ restringido a HLA-DR1, mientras que el péptido restringido a H-2 IA^b no fue eficaz estimulando una respuesta, como era de esperar. De forma similar no se indujo ninguna respuesta por el péptido HIV 1 Gag₂₆₃₋₂₇₈. Además, un recuerdo *in vitro* adicional con el péptido HBsAg₁₈₀₋₁₉₅ aumentó varias veces el índice proliferativo específico (datos no mostrados).

Habiendo documentado en un primer ratón KO de *H-2 clase I/clase II* transgénico de *HLA-A2.1/HLA-DR1* inmunizado con HBsAg-DNA el desarrollo y la especificidad de las respuestas de anticuerpos específicos de HBsAg, de células T proliferativas y citolíticas, también se ensayaron individualmente para las mismas tres respuestas 6 ratones KO de *H-2 clase I/clase II* transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1* inmunizados con HBsAg-DNA adicionales y 6 ratones de control sin tratamiento. Como se ilustra en la figura 3b, las tres respuestas se documentaron simultáneamente en los 6 animales inmunizados ensayados, y no en los ratones sin tratamiento del control. De forma interesante, dos ratones inmunizados fueron capaces de desarrollar respuestas de CTL frente a los péptidos restringidos a HLA-A2.1 tanto de HBsAg₃₄₈₋₃₅₇ como HBsAg₃₃₅₋₃₄₃ (figura 3b, panel central).

Ejemplo 6: Ensayos de protección

Los ejemplos anteriores documentan la inducción de respuestas humorales específicas de HbsAg y respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, y muestran que están dirigidos a los mismos epítomos inmunodominantes como los de los seres humanos infectados de forma natural o vacunados con HBsAg. Este ejemplo ensayó si estas respuestas conferían protección a animales vacunados. Puesto que los ratones no son permisivos a HBV, para estos experimentos se usó un virus de la vacuna recombinante de HBsAg (rVV-HBsAg). Los ratones se inmunizaron dos veces intramuscularmente con 100 µg de HBsAg-DNA. Doce días después de la última inmunización, los ratones se expusieron intraperitonealmente a 10⁷ PFU de rVV-HBsAg. Cuatro días más tarde, se determinaron los títulos del virus según los métodos publicados, y se registraron como rVV PFU/ovario (Buller, R.M. y Wallace, G.D., Lab Anim Sci 35, 473-476 (1985)).

Los resultados se ilustran en la figura 4. Los animales sin tratamiento que no habían sido inmunizados con HBsAg-DNA mostraron signos de replicación de rVV-HBsAg después de la exposición. Por el contrario, los títulos del virus en ratones inmunizados con HBsAg-DNA fueron más de 4 órdenes de magnitud inferiores. Estos resultados sugieren fuertemente que la vacunación con HBsAg-DNA indujo respuestas inmunitarias específicas de HBsAg protectoras que controlaron la infección con rVV-HBsAg.

La especificidad de la protección conferida mediante la vacunación con HBsAg-DNA se documentó exponiendo a ratones inmunizados con HBsAg- DNA con otra VV recombinante de HBx (que codifica la proteína de la hepatitis B x). No se observó reducción de la replicación de rVV-HBx en ratones inmunizados con HBsAg-DNA en comparación con controles no inmunizados.

Ejemplo 7: Las células T CD4⁺ restringidas a HLA-DR1 son críticas para respuestas de anticuerpos y de CTL, y para la protección frente a infección vírica.

Para evaluar si los linfocitos T auxiliares restringidos a HLA-DR1 contribuyen a las respuestas de anticuerpos y de CTL en los ratones inmunizados, se comparó la respuesta inmunitaria y la eficacia de la infección vírica en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, monotransgénicos (*HLA-A2.1*) y bitransgénicos (*HLA-A2.1/HLA-DR1*). Como se muestra en la Tabla 4, se observó una respuesta de CTL específica de HBsAg₃₄₈₋₃₅₇ potente en ratones KO de *H-2 clase I/clase II*, doblemente transgénicos de *HLA-A2.1/HLA-DR1*, pero no en ratones de KO de *H-2 clase I/clase II* monotransgénicos de *HLA-A2.1*. Además, no se pudieron detectar anticuerpos anti-HBs en ratones de KO de *H-2*

clase I/clase II monotransgénicos de *HLA-A2.1* vacunados con HBsAg-DNA. Como consecuencia, los ratones KO de *H-2 clase I/clase II* monotransgénicos de *HLA-A2.1* inmunizados con HBsAg-DNA no se protegieron frente a la infección por rVV-HBsAg.

5 Tabla 4. Respuestas de anticuerpos, citolítica y proliferativa de ratones inmunizados con HBsAg-DNA, y protección frente a la exposición a rVV-HBsAg

Ratón	Lisis específica (%)		Proliferación (SI) 179-194	Título de anticuerpos	rVV-HBsAg PFU/ovario (log10)	
	348-357	335-343				
A	1	0	1	0	2,5.10 ⁸	
	2	0	1	0	2,5.10 ⁸	
	3	0	1	0	10 ⁸	
	4	0	1	0	2,5.10 ⁸	
	5	0	1	0	10 ⁸	
	6	0	0	1	0	1,5.10 ⁸
B	1	30	15	4,7	2000	10 ⁴
	2	14	0	3,9	3000	3.10 ³
	3	30	11	4	7500	4.11 ³
	4	5	0	2,5	6500	7,5.10 ³
	5	50	30	6,3	13000	7,5.10 ²
	6	40	18	4	16000	5.10 ²
	7	6	7	2,9	1500	2.10 ⁴
	8	5	5	3	2500	1,5.10 ⁴
	9	24	36	4,5	3000	<10 ²
	10	23	14	5	15000	5.10 ³
C	1	0	0	1	0	10 ⁸
	2	0	0	1	0	2.10 ⁸
	3	0	0	1	0	1,5.10 ⁸
	4	0	0	1	0	10 ⁸
	5	0	0	1	0	2,5.10 ⁸
	6	0	0	1	0	10 ⁸

10 Ratones KO de *H-2 clase I/clase II* doblemente transgénicos de *HLA-A2.1-/HLA-DR1* sin tratamiento (A 1-6), ratones KO de *H-2 clase I/clase II* doblemente transgénicos de *HLA-A2.9/HLA-DR1* inmunizados con HBsAg-DNA (B 1-10) y ratones KO de *H-2 clase I/clase II* monotransgénicos de *HLA-A2.1* inmunizados con HBsAg-DNA (C 1-6) se sometieron a exposición intraperitoneal con 10⁷ PFU de rVV-HBsAg. Cuatro días más tarde, se evaluaron individualmente las respuestas de células T esplénicas citolíticas y proliferativas y títulos de anticuerpos séricos, PFU por ovario, usando células diana de RMA-S-HHD cargadas con péptidos restringidos a HLA-A2.1, HBsAg₃₄₈₋₃₅₇, (inmunodominantes) o HBsAg₃₃₅₋₃₄₃ (subdominante), (relación E/T 30/1) para ensayos citolíticos, péptido restringido a HLA-DR1 HBsAg₁₇₉₋₁₉₄ para ensayos de proliferación, y péptido preS₂₁₀₉₋₁₃₄ para la determinación de títulos de anticuerpos (IgG).

Listado de secuencias

- <110> Instituto Pasteur
- 5 <120> RATÓN TRANSGÉNICO QUE TIENE UN FENOTIPO DE COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) HUMANO, USOS EXPERIMENTALES Y APLICACIONES
- <130> 346381-D22368
- 10 <140> PCT/IB2004/002374
<141> 05-07-2004
- <150> 60/490,945
<151> 30-07-2003
- 15 <160> 18
- <170> PatentIn Ver. 3.2
- 20 <210> 1
<211> 4547
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 25 <220>
<221> promotor
<222> (1)..(1205)
<223> promotor del gen HLA-A2
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (1206)..(1265)
<223> secuencia líder HLA-A2
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (1266)..(1565)
<223> ADNc de beta 2 microglobulina humana
- 40 <220>
<221> característica diversa
<222> (1566)..(1610)
<223> ligador de GlySer
- 45 <220>
<221> característica diversa
<222> (1611)..(2440)
<223> exón 2 e intrón 3 parcial del gen HLA-A2
- 50 <220>
<221> característica diversa
<222> (2441)..(4547)
<223> intrón 3 parcial-exón 4-exón 8-gen no codificante 3'
- 55 <400> 1

```

gaattccttag gtttaaatac attgttttat ggattttaat acatccatct acagagccta 60
gcagggtgtc cttggcagtt gtcttttaat acctcatgty ggtctgccta aaaactaatt 120
ttttatgtta atcagggtta aaaaatacta agtgttccta taaaatatac acaacactta 180
gaagtggata cttcctaaaa acaggcagtg catgagcact agtgaggggc attgtgagtg 240
cattgaacag ttgcaacttt gaggtgaata aagcctgtaa tgccttctgg ttgcaacata 300

```

taggaacaca	gtcgcactt	tgtattgagg	agatgtcctg	gactcacaca	gaaactcaga	360
gctatggaat	gatggtaa	ttaaaatact	acaaccagga	gtcacagata	cattgtctgg	420
gaaactgcaa	cttagtagct	ttgtgagtc	ttgtgtaagg	cttttgaca	catttataca	480
tcaaggggct	aaagtcacat	tttttaccta	ttagattcct	gatcattcag	gggttacc	540
gattctgcta	cccactgtag	ttaataaaca	aagagcaaat	tggtctctat	tctgtctcat	600
gcactcaggc	gcaactcttc	ccgattaaaa	acaaaaaca	caacaacaaa	aatctacacc	660
tccattccca	gagcaagctt	actctctggc	accaaactcc	atgggatgat	ttttcttcta	720
gaagagtcca	ggtggacagg	taaggagtgg	gagtcaggg	gtccagttca	gggacagaga	780
ttacgggata	aaaagtga	ggagagggac	ggggcccatg	ccgaggggtt	ctcccttgtt	840
tctcagacag	ctcttgggcc	aagactcagg	gagacattga	gacagagcgc	ttggcacaga	900
agcagagggg	tcagggcgaa	gtcccagggc	cccagggcgtg	gctctcaggg	tctcagggcc	960
cgaagggcgg	gtatggattg	gggagtccca	gctctgggga	ttccccaa	ccgcagtttc	1020
ttttctccct	ctcccaacct	atgtagggtc	cttcttctctg	gatactcagc	acgcggacc	1080
agttctcact	cccattgggt	gtcgggttct	cagagaagcc	aatcagtgtc	gtcgggtctg	1140
cggttctaaa	gtccgcacgc	accacccggg	actcagattc	tccccagacg	ccgaggtatg	1200
ccgtcatggc	gccccgaacc	ctcgtctctg	tactctcggg	ggctctggcc	ctgacccaga	1260
cctgggggat	ccagcgtact	ccaaagattc	aggtttactc	acgtcatcca	gcagagaatg	1320
gaaagtcaaa	tttcttgaat	tgctatgtgt	ctgggttcca	tccatccgac	attgaagtgt	1380
acttactgaa	gaatggagag	agaattga	aagtggagca	ttcagacttg	tctttcagca	1440
aggactggtc	tttctatctc	ttgtactaca	ctgaattcac	ccccactgaa	aaagatgagt	1500
atgcctgccc	tgtgaacat	tgactttgt	cacagcccaa	gatagtttaag	tgggatcgag	1560
acatgggagg	tggcggatcc	ggcggaggcg	gctcgggtgg	cggcggctct	ggatctcact	1620
ccatgaggta	tttcttcaca	tcogtctccc	ggccccggccg	cggggagccc	cgcttcactg	1680
cagtgggcta	cgtggacgac	acgcagttcg	tgcggttcca	cagcgacgcc	gcgagccaga	1740
ggatggagcc	gcgggcgccc	tggatagagc	aggaggggtcc	ggagtattgg	gacggggaga	1800
cacggaaagt	gaaggccac	tcacagactc	accgagtgga	cctggggacc	ctgcgggct	1860
actacaacca	gagcagggcc	ggtgagtgac	cccggcccgg	ggcgcaggtc	acgacctctc	1920
atccccacg	gacgggccag	gtcgcccaca	gtctccgggt	ccgagatccg	ccccgaagcc	1980
gcgggacccc	gagacccttg	ccccgggaga	ggcccaggcg	cctttacecg	gtttcatttt	2040
cagtttaggc	caaaaatccc	cccaggttgg	tcggggcggg	gcggggctcg	ggggaccggg	2100
ctgaccgcgg	ggtccggggc	aggttctcac	accgtccaga	ggatgtatgg	ctgcgacgtg	2160
gggtcggact	ggccttctct	cccggggtac	caccagtagc	cctacgacgg	caagattac	2220
atcgccctga	aagaggacct	gcgctcttgg	accgcggcgg	acatggcagc	tcagaccacc	2280
aagcacaagt	gggaggcggc	ccatgtggcg	gagcagttga	gagcctacct	ggagggcagc	2340
tgcgtggagt	ggctccgcag	atacctggag	aacgggaagg	agacgctgca	gcgcacgggt	2400
accagggggc	acggggcgcc	tccttgatcg	cctgtagatc	ctgtgtgaca	tacctgtacc	2460
ttgtctcca	gagtcagggg	ctgggagtca	ttttctctgg	ctacagactt	tgtgatggct	2520
gttactcgg	actgacagtt	aacgttggtc	agcaagatga	ccacaatggt	tgagtctcag	2580
tgggtggacc	cttccagtag	catatgcccc	taattttgat	atgaaactca	acagatatta	2640
aattacttat	tttccatttc	ctattccatt	ctgtgactat	ctctctcatg	ctattgaaca	2700
tcacataagg	atggccatgt	tcaccactg	gctcatgtgg	attccctctt	agcttctttg	2760
tcccaaaaga	aaatgtgcag	tcctgtctg	aggggaccag	ctctgctttt	gttctactagt	2820
gcaatgacag	tgtagtgtca	aatagacaca	tagttcactc	tcatcattga	tttaactgag	2880
tcttgtgtag	atttcagttt	gtcttgttaa	ttgtggaatt	tctttaaactc	tccacacaga	2940
ttcccaaaag	gcacatgtga	cccatcacc	cagatctaaa	ggtgaagtca	ccctgaggtg	3000
ctgggcccctg	ggcttctacc	ctgctgacat	caccctgacc	tggcagttga	atggggagga	3060
gctgaccag	gacatggagc	ttgtggagac	cagggcctgca	ggggatggaa	ccttccagaa	3120
gtgggcatct	gtgggtggtc	ctcttgggaa	ggagcagaat	tacacatgcc	gtgtgtacca	3180
tgaggggctg	cctgagcccc	tcaccctgag	atggggtaag	gaggggtgtg	gtgcagagct	3240
ggggtcaggg	aaagctggag	ccctctgcag	accctgagct	ggtcagggat	gagagctggg	3300
gtcataacce	tcaccttcat	ttcctgtacc	tgtccttccc	agagcctcct	ccgtccactg	3360
actottacat	ggtgatcggt	gctgttctgg	gtgtccttgg	agctatggcc	atcattggag	3420
ctgtgggtgg	ttttgtgatg	aagagaagga	gaaacacagg	taagaaaggg	cagggctctga	3480
gttttctctc	agcctccttt	agaagtgtgc	tctgtctcatt	aatggggaac	acagccacac	3540
cccacattgc	tactgtctct	aactgggtct	gctgtcagtt	ctgggaattt	ccagtgtaa	3600
gatcttccct	gaactctcac	agcttttctt	tcacaggtg	gaaaaggagg	ggactatgct	3660
ctggctccag	gttagtgtgg	ggacaggatc	gtctggggga	cattggagtg	aagttggaga	3720
tgatgggagc	tctgggaatc	cataatagct	cctccagaga	aatcttctag	gggcctgagt	3780
tgtgccatga	agtgaataca	ttcatgtaca	tatgcatata	catttgtttt	gttttaccct	3840
aggctcccag	agctctgaaa	tgtctctccg	agattgtaaa	ggtgacactc	tagggctctga	3900
ttggggaggg	gcaatgtgga	catgattggg	tttcagggac	tcccagaatc	tcctgagagt	3960

ES 2 381 109 T3

```

gagtgggtggg ttgctggaat gttgtcttca cagtgatggg tcatgactct cattctctag 4020
cgtgaagaca gctgcctgga ctgtactgag tgacagacga tgtgttcagg tctctcctgt 4080
gacatccaga gccctcagtt ctctttacac aacattgtct gatgttcctt gtgagcctgg 4140
gttcagtgtg aagaactgtg gagcccagcc tgccctgcac accaggaccc tatccctgca 4200
ctgcccctgtg ttcccttcca tagccaacct tgctgctcca gccaaacact gggggacatc 4260
tgcacccctgt aagctccatg ctaccctgag ctgcagctcc tcacttccac actgagaata 4320
ataatttgaa tgtgggtggc tggagagatg gctcagcgcct gactgctctt ccaaagggtcc 4380
tgagttcaaa tcccagcaac cacatggtgg ctccacaacca tctgtaatgg gatctaacac 4440
cctcttctgc agtgtctgaa gacagctaca gtgtacttac atataataat aaataagtct 4500
ttaaaaaata atttgaaagt gacccttgat tgtaaacatc ttgatct 4547

```

- <210>2
- <211> 29133
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> promotor
- 10 <222> (1)..(15279)
- <223> promotor 5' del gen HLA-DR alfa (gen HLA-DRA)

- <220>
- <221> gen
- 15 <222> (1)..(29133)
- <223> gen HLA-DR alfa (gen HLA-DRA)

- <220>
- <221> característica diversa
- 20 <222> (15280)..(15425)
- <223> exón 1

- <220>
- <221> característica diversa
- 25 <222> (15344)..(15346)
- <223> partida ATG

- <220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (17838)..(18083)
- <223> exón 2

- <220>
- <221> característica diversa
- 35 <222> (18575)..(18866)
- <223> exón 3

- <220>
- <221> característica diversa
- 40 <222> (19146)..(19311)
- <223> exón 4

- <220>
- <221> característica diversa
- 45 <222> (20008)..(20340)
- <223> exón 5

- <400> 2
- aaaaaattaa gtatataaag ttttaaaagt tagagtaagc taaggttaat tattgtagaa 60
- aaacattttt cataaattta atgttctctt agttacagta tttataaagt ctacagtaat 120
- gtatagtaat gccttaggcc ctgcattca ctcaccactc actcactgac tcatcagggc 180

aacttccagt	cctgcaagct	ccattcatgg	taagtgtcct	agaaagatct	accatttaaa	240
aatctttcat	atggatattt	caccacacct	tttgtatggt	tagatacata	aacagttagc	300
attgtgttac	aattaccaat	agtattcaat	acagtcacat	gctgtacagg	tttgtcgctt	360
aggggtaata	gggtgtacca	tatagcctaa	atgtatagta	ggctataaca	tctagtttgc	420
gtaaggacac	tctgtgatgt	tcacacaaag	atgaaatcac	ctaatagcac	atctcttaga	480
gcttgtccct	ttagctaagt	gatgcatgac	ttcagttttg	ccccatttct	agagcatagt	540
cctcaatgac	tttcaatgaa	aaacccgata	gctttcatct	tctcaatect	gaagagctga	600
aggagattta	ggctgaactt	aaagaaattt	tcagcttagc	tcattagtct	tctactccat	660
acatcttcaa	catttaacaa	gtgttttgaa	aaagacacct	acaaagtgtc	tgaagtcatc	720
aactctcaaa	tcttgcattt	gcagcaccac	gtcaaatgac	aaaacacttg	ctattttctt	780
agtcactagg	aggagcctat	tgtcagaggc	caaacctgga	ttattagctc	caaacaagca	840
ctcagatcag	taagtgtcct	caggtgataa	gtggttggtg	ctacttggca	tcaattcacc	900
agttcttctg	aaacttacgt	ctgttttggt	ttagggccct	tatcaatggg	aggtctttgt	960
ttcctcaaca	ccactggaca	gtgaaagatt	ttgcactgcc	tttcagaagt	tgacacttta	1020
gttttttggt	ttaccttcta	cogtagcatc	agaagttaac	caactgtgtt	tgaagaaacc	1080
agagtgtttg	agatgcctca	gttttctagt	tacatcacac	tggccccata	attgctgctg	1140
atctctttct	tacagcagaa	aactgtagga	aaattgttagc	agaaaacttt	tctacagcag	1200
aaaacggtag	cagaaaaatg	gcactaaaac	gcagcgtaca	cttgcaaca	gcaaatgcta	1260
ccaagagaaa	cagtgatgtc	caaacgtcag	cttaccattg	catggttctt	ctttggaatt	1320
tttattcatc	tagtcttatt	tactttctta	gctaaacaat	gctttttaa	aatatacttt	1380
taaaatttta	tcctattttt	gtagtgttg	ccagtgggac	aatttgcctt	actgtgacct	1440
taatgcatct	tatactgtgg	tggaaaaaag	aataagattt	taaattgtgc	tttctgaaaa	1500
actggatata	gaaacagaca	atggccagac	catatataaa	aataggcctg	gctgggcacg	1560
gtggctcacg	cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggccaag	gcggtatgat	catgaggtca	1620
agagatcgag	accatcctgg	ccaacatggt	gaaacccctg	cctctactaa	aaatacaaat	1680
ttagctgggc	atggtggcgc	gcagctgtag	tcccagctac	tccggaggct	gaggcaggaa	1740
aatcacttga	gcccaggagg	tggaggttgc	agtgagctga	gatcgtgcca	ctgcactcca	1800
acttggcgac	agagcaagac	tccatctaag	aaaaaaaaaa	aaaaaataga	cctttgacct	1860
gcagctcaca	gcagcctgcc	tggggaacca	attcccttat	cttcaataaa	caatccagca	1920
aggtagtctg	cttaagtccg	acttgcagga	agtcagattg	ctgtctctag	taaccaatcca	1980
ggaggctaaa	taataacttt	tataacaatt	gttttaaaat	ggccaggact	tgattaataa	2040
ctgacagttc	ccccaatatt	tgtgctgctt	tccaacttag	gaccaaccag	ggaaagctaa	2100
atatgcatcc	taccaatta	cataggatac	tccacttcta	gttaccctt	aagcattccc	2160
catgccaaca	gcctccaatc	aggtcctttt	taaccactat	aaagtttcct	acttctttgc	2220
ctgtctttga	gtctctgcca	aaatgcaaaa	gatgggtggct	gactcctttg	ttatagcaat	2280
ttgtgaataa	tttttgctct	tttcatttgg	ttgatcttca	tgtattttca	cattattaag	2340
ctttatataa	attaaaatcc	aagaggctaa	catttaatta	atgacattta	agatcttcta	2400
tctcggataa	tgctatacat	tataattaggt	ttaatatttc	tattaaatat	agatttagta	2460
aattactaaa	aattgctaaaa	atcacaataa	tatatatgta	agtacaata	aggaaaatgc	2520
aaagagagat	attagaaaagg	gtaaatatat	tcaggaataa	atattcaaga	tattttaagt	2580
tggagatatt	gtctgttggg	actaaatcaa	tttccccctg	ttttgtgctt	ttttccatat	2640
cacttggggg	tgaagcctgg	acaaccactc	ttccagagtc	cctttcttag	gaaggcactc	2700
acttgcgatt	agaaggcagt	ggaaaattgc	tgtcattctg	cttctgacag	caagtagcag	2760
cagctgccag	gagtggtggg	ttgtttagtg	ctgcagggcc	aatagtagct	tctgcagttt	2820
cctgaccttt	ggaagcacia	ttttgctttt	tctgtcctta	caaaactttt	gcaatgcact	2880
tcactgtatt	acatctctct	gggcttaaaa	taccttgagt	gtgttttttc	ccccttgtaa	2940
atctgggcta	gactgaataa	tcttgtaagt	atgtaaatat	aagcaactat	tttaaaataa	3000
cctgggtttt	taaagttaat	acagatgctc	ttcaacttat	gatgggggta	actcccaata	3060
aatocagtg	aaattgaaaa	tattgtgagt	tgaagtgta	gagtataagt	tgttcacctt	3120
catgatcatg	tggctgaggc	tgcttggcat	tgtgaaagag	tatcttactg	agtatcgctg	3180
gtctggaata	agatcaaaat	ttaaagtatg	gtttatacag	aatggatatt	gcttttacac	3240
cattgaaaag	tcaaaaattc	ctaagtcaaa	ccatcttaag	tcaggtgtgt	ctgtagtttt	3300
aaaaaaatta	caaataaaga	atatccagtg	ttgttgggag	tgcaagaaag	attacaagg	3360
taaacattga	tttgtttaaa	gtttgagaga	aaaaattaga	taatatgctt	tatgattttt	3420
aaatgttaat	ttcaagtaa	ttatcacatt	acaggagttg	atgaaaatag	taagagaggg	3480
tcccttgtac	ccttcaccca	gtttccccca	atggttacat	catacataac	tatagcacia	3540
tatcgaaaca	aggaaatcga	cactgataca	atgtatttgc	agttttctac	tttatcacat	3600
gtgtagattc	atgtaaccac	cactgtgatc	aaaatacaga	actatattcc	atccaccaca	3660
agactcttct	catgccactc	gcccctctta	agagtcacac	cattccccca	ccccaccat	3720
ccctacactg	tgccaaccac	taatttgatt	ttcatctgta	taattttatc	atthagaaaa	3780
tgttatataa	atggaattat	actatatgtg	accttccgag	actggcattt	tgtactcaga	3840

ES 2 381 109 T3

ataatgccct tgggatctgt attaggtgct ccagagcggg tgtactaaca ggatatgtat 3900
 atatagaaag atatttcttt taaagaattt gctcacatga ttgtggaagc ttactgagtc 3960
 caaattctga tgggaagaggc cagcagtgga ggagactggg acagagttgc agtttgagcc 4020
 caaaggtagt ctgctgtgga accaggaaga gccaggattg cagatggagt ctgaggcaat 4080
 ctgttggaga gttccctctt atgctagtca ggcattcaac tgattaaatg aggggaacce 4140
 agttatggag ggcaatgtac ttactttaa atctactgac ttaaataatg aactctcacc 4200
 ccaaaactgc cagattatgt gaaattccat gtcctctact tggctccatt gacactcaga 4260
 tggagtagat taaacaacag acatttactg aaagtccca cttaacatca tcaataggtt 4320
 cttagaagct gtgactttaa gcaaaatgac atataataa actaatttga ccataggcta 4380
 attcagcgat ccccaacatt tttggcacca gggactgggt ttgtggaaga aaatthtggc 4440
 atggatgggg gttggggact agcggtgcca gggagtggga tggcacaacc tagatccctc 4500
 gcatgggcag tccacaatac agttcacaaa ggthtgcact cctgtgagaa tccaatgoc 4560
 ctgcccgatc gacagcaggc cattagtggg ctgtggccca ggggttggga acccctgggc 4620
 taattgatgc gaacaagatt taagtccca tggcttattt ctggtcacaa acacatcacc 4680
 aaactcctaa ataaagactc agaacacttc taatattaaa cattaaaata aatgggaact 4740
 atatatacat ttaaggtagg ttataataa caagtaagat aattaattat ccagthtttg 4800
 gtgaattagt gagtगतggg ggtcacagtg tgggtgggtt acattaagga acaaatgttt 4860
 gtaaaatgaa aatggtaagg agcacctcct gccaccacac agctcaaacg caaagaagaa 4920
 caaatacgtt gaactcactg agtactthtg taccctattg thtactattg tacagttgta 4980
 tgaatatcat gtactttaca aatthttatt ttagaaacat thctattcat tcgcttattc 5040
 atthtccaac ctgcttattc cagttcaagg tcatggatga ctggagccta tcccggcagc 5100
 tcaaggacaa gagaggaacc aacctgtat aggatgccat cccatccatt gtgggatgca 5160
 gacacacaca cacatacaca cacacacaca aagtcactct gctgggacaa 5220
 thtagactca ccaatthacc taacatgcat gtctthggga tgtgggataa aactcaata 5280
 cacaaagaaa acccatgccc acgtggggag aacacacaaa ctctcatgg ccagthggcc 5340
 tggccaggaa cctatthatt thctcaccaa cattgtaaca aaacgttgaa caaaacaatg 5400
 ctataggagg accctctgtg thctcacag thctggaggc tgggaagtcc aagatcaaga 5460
 tgctgacagg thcaattcct ggtgaaacta gaactgaagg ctctctggca ggggtgcctt 5520
 gtggctgcag gctgggtata gaaactcagg ctccccacta ggctccact tacagaatcc 5580
 tgactgggag ggagagggtc tcatcagcgc tcccacatgg cctctactga caccaggaag 5640
 ggagaagtgc ctcttacac ctggacagtg gtgaaagtcc cagctthcta ctthggcctc 5700
 tctgacaaca cctthggcaa gtgggtgagg agtgcctcct tgcaacaggg cagthggaag 5760
 tccaggtctc tcacatgggc thcactaaca ccacagtggt gaggtggctg attactgata 5820
 ggcaggggca aaagtccatg gtccccagtt ggctctctct gacataagcc tgatgggtct 5880
 aggtagtgtc tcattatcgc caggcaatgg gataagacaa agctcctcac tcagthttg 5940
 ctgactgagg cgggatggaa gcccctgatt thtctgtatt tgactggagt agthgggtta 6000
 ctgtcagtha thctgctggg aggtctctct thctgttcc ctthgataga gaaacatgct 6060
 thccttagga ththttgtc thtgactact gatthtctct gthttccagt thctccagca 6120
 ctcatthctg gatataatg gcagaaagaa gacctatgaa actcaccact ctgtcattcc 6180
 ccaatcccat ggtctgaggc caacctgct ctctctcca thattcaagg gctthttatg 6240
 thgtctgta gctgtactta gcaggaagaa taggaagaat thtacctact thactthtgc 6300
 thagaaccag aaactctca ccatatthtt taaaatatgt ththgtcata ththaaata 6360
 thatacatct actcttagat cctthaaata acatataatc thctcttaga ththaaagcc 6420
 ththgttaaca aaataaaaac aagactaaaa ctattaattg ththaaagcc athaaaaata 6480
 thgcaattht thcccaaaat atgggaaat thcgtgtgtg thgtgtgtat thctatgtat 6540
 acacataaaa aaagacataa aatgaaaatt gctgatgtat caatacccgg gggcagggag 6600
 thattctcagg ththactaag tactcatatt caagththta ccataggcca cacctggctc 6660
 thcagatthc thtagaaggat attagacagg agthcttgaa acagthcata atthattcca ggtgctagtt 6720
 thctthttct cagthggaga agthcttgaa actcaggtac aaggagctga atthacact 6780
 thcatctctg ccccatccc ccaagtgaca actcaggtac cctcaggtca thctcagact agthctctc 6840
 ththgaagtth thtccaccgt agcttagaat cctcaggtca thctcagact agthctctc 6900
 athaacaace ctgggcaca cctccagag thctccagag gggcatgctc agthcaag 6960
 thcactgcat thggaaatac ccaactatg gthccccgth atthgttacg gthcatgaaa 7020
 thattctccc agthaaagata caaatgcca accagaagcc atthgtgcca thagcaatgt 7080
 thgtcaaaaa thcagctgac atthctctc catcagthtt ccagaaaaa gctagaaaat 7140
 thagctaaaga thaaatacat catggagaag thgaaaggg thtataaagc atthtccac 7200
 aagatthcaa atgaaataca gthaatthtg thcgtthtaa gacattatt caacctca 7260
 atththtaaa agaagthcat cctatthtt gtgtgcttat thaaaaagg catgthtaata 7320
 ththataaaa gactthaaat atththtaaa gththaaata ththataag thththataa 7380
 atgaaattac aaaccatth aagthaccta thaaatcaaa cacactthga gthtgcacac 7440
 aagaaaaaaa thagthgaag catcctgact thaaaatcc thgatctthc athagthgthc 7500

tgaataactca	atgtcaaaaa	cacttatgaa	gaattaaaca	ctggtgacca	caagagggaa	7560
acctagtcce	agttatacta	taaattagaa	aatcaagggg	aaaatatgtg	tcoctgagaac	7620
ttttgaaata	gtcacatata	aacatagtat	acaagaaaaa	accaaccgtc	atcccctacc	7680
aaggatattg	ttgtggtatg	agtggtttta	gtgttttgag	tggactgggt	cttggactcc	7740
acataattatt	ggctacagag	atagagactt	gatttagaaa	atcacagttg	ccactttcta	7800
agtaagccct	tgaccaaaaag	actagatttc	tttaaaccce	gtttttctcag	gtaaaatgga	7860
aatacaacta	ttatctaata	aatataagta	agcttttagtg	tcatagtcac	agcagtagta	7920
ttttcaattg	gtaaaaagaa	actggacccc	aaaaaagaat	ttcagtgaaa	gcagtaacag	7980
tcttctggca	tattttctcac	ctttctttct	accttaaagg	ttcaaagttc	ctaagtaatc	8040
tcagaaaacct	aaaatagttt	attctctatc	ctcactattg	gttttttaaaa	aacattttgc	8100
agcatggacc	actgctcatg	tacagatgct	ctccaactta	acaatagggg	tatgtcccaa	8160
taaaccctatt	ataacttgaa	aatatcttaa	gctgaaaaatg	catttaatac	accaataaac	8220
ccatcataaa	ggtgaacaat	cataagccaa	attataagtc	agagaccatc	tgtattagct	8280
taagtcttgg	aatggtttat	tttttagatg	ccatttagcc	acttatatc	tcttctattt	8340
tattgtgaga	actaattccc	ctcttacatt	ctgtgcttga	cccagctat	acttagtggtg	8400
aacaagagcc	accttcttct	catgacttct	atthttttgt	gaaaatttcc	ttcactcatt	8460
cacgacattt	ggatttgaaa	tcttacctac	ttaaagtaact	taaaaaatca	ttttctacca	8520
tctttcttat	caggagcctc	tagtgattcc	ttctccacac	ttctaacttc	tcactctcac	8580
actccttgtc	ttcctaactt	cactacagta	agtgttttac	atgttttagaa	ctcagctcct	8640
ttactatgat	tgctaaccat	gtaccttaa	taaaccgtct	tctagttttt	tgthttctac	8700
tctcaattat	acctttttaga	aaagaattaa	gagttagaaaa	agactgctac	atagacattc	8760
ttatgatctt	cagaaatgag	cacagatcac	gcttaatgaa	aaaagatttc	caaataatgc	8820
tgcatatgtc	cagagaaaag	tgggcagaaa	tgactgtcgt	ttggggggcac	tattgtctgg	8880
acatggccag	ttctcagaac	tccagtcctc	aaattcctct	ctaactaaag	gaaaagcctc	8940
ttaagggtct	tatagaaatc	ctgccacttt	cacctgaaag	aataatcttc	agttatgtgg	9000
cacatggcca	agagtaaaaag	tcttttagtca	cttggaagca	gacagacact	gtaatgctaa	9060
ataattggac	ataacatgga	acttactgag	gcctcaaata	tcaattttac	tttgggaaaa	9120
agagcagcaa	ctttaaaagt	gattgaaagt	aactcaagtt	tattccttaa	cagagtgatg	9180
cttaatctaa	caaaaaacat	gttatatgca	cactcttctc	cattaccttg	taagaaaact	9240
ggactaggaa	acacagctga	aatggccagt	tctgcctcca	tttcoctaac	cgtggtataa	9300
ttatgtctat	gtgaccagta	acagacaatg	accatgattt	atactttttc	atatgthttg	9360
tgthttgtht	tcaatgthtt	tggtctttcc	tcagtatcag	ctaagaggcc	ataacacag	9420
atatctatth	atggacatgc	gagactgtht	ttcacctctt	ttgcagaatt	cataaagaaa	9480
tgatggggaa	aacacatcaa	agatagagtg	gataaagcaa	atgtgcccaca	tataccacct	9540
ggaatactat	gcagccatga	aaaagaatga	gthcatgtcc	tttgcagggg	catggatgaa	9600
gctggaaacc	atcattctca	gcaaaataac	acaggaacag	aaaaccacac	actgaatttt	9660
ctcactcata	agtgggagtt	gaacaatgag	aacacatgga	cacagggggc	tgthgggggg	9720
gtggggggca	aggggaggag	agcattagga	caaatacctc	gtgcttgagg	agcttaaaac	9780
ctagatgacg	ggthgatggg	agcagaaaac	caccacggca	catgtatacc	tatgtaacaa	9840
acctgcatgt	tctgcacatg	tatcccagaa	cttaagtag	aataaaataa	ataagtaaat	9900
aaggaatgat	gggacaaaac	agthttctgt	atgtctctc	tactgaccaa	agggthgtca	9960
gagagtatag	gatgaagcag	atthgtgata	tctctgaata	gatctgctct	ttactatgaa	10020
ttctatcatc	tactcccagc	gtatgtggga	aagggaccaa	cttacttgcc	tggaaatttag	10080
tgaattgtht	ttctaggggg	accaagagth	tctctactt	gatatgaagt	tgggtgthtg	10140
aagatgatag	gattggcttc	tgcttccatc	agaatcctaa	agggcagggg	atatggacta	10200
gthggthatt	gatcttggaa	actgtgatgc	atthgggaatg	gtcacactcc	cagagththt	10260
ggacacaaaag	aatgthtttag	tgthccctac	acaccagaca	cggggccatga	aggaatctga	10320
agagcctacc	aaaccttgca	caagagaaaa	gctthacttg	gaacatcatc	caggetcaga	10380
gaacacaaat	atthcatttc	cagtaagacg	thttctggtc	thttctcttc	ctccccttc	10440
ctgaacctac	cctagatgag	ctatggcttc	aaagtgccag	tagaacgtaa	gaaggaagga	10500
gaaccacact	cattcctgcc	ttcaacaatt	tacacagggg	tagaaagaga	thtatattaa	10560
atcaagthtg	gactthcaat	tattatatag	taccacacaa	tctaattgct	gaactaagat	10620
atactthgtg	aatttaaggg	aattgtagaa	tagcatatta	attagaatca	agaaaataat	10680
tcatgaagta	tgctataatt	cctacccaag	cgcagggggg	tagcatctct	aatgaaattc	10740
tctaaagagg	caagagcagg	cacaatgagt	thttgthttg	thaaagattc	catttagthg	10800
ttatccaacc	tagcaattac	atthgtatgc	thcagatgth	thtaaaaaaa	thaacaaaag	10860
aaagthacct	aaataaagaa	taggatcaaa	tagthatttaa	acaattgagt	aaattaaaaa	10920
attatatgaa	thtagattgat	tgaattgat	actthcctaa	thtctctctc	tcaacacaca	10980
gacacacaca	cacacacaca	cacacacaca	cacgthtgca	tacaaacaca	tctgaattct	11040
ataaaatcat	tctgaccttg	atgagattcc	atagthttact	catgcaacag	aacataatgt	11100
ctaaatgaag	thttctggtc	ctgthttaca	tggatgattg	agthaaatca	thcccatttc	11160

ctggaagaat agctaagaaa ggattcacag gtgaggacat gcgttttttc agaagatgag 11220
 aacaaaagatg agaagatgag agcaacagaa tgtcctatat cctaagtctc tgtgctgact 11280
 tcggagtggc caatatgata gagatggaag gaactctgaa aacaaattgc cagaatttct 11340
 aaggaacagg agatggtgag tgagtgaatc aagccatgga ctggctgtat gggggcagct 11400
 attagagaca actaccctta gacttctttg gtgattggtc aagctaactt tttccttcag 11460
 agtctctcaa ttataagact tagcttgtgc catttagaac agacaagaac acagagaatt 11520
 atagaacaat ctgactacag gttcttaagt tatagcaatg aaacttgtag ttggccggca 11580
 ggaaaatatt ctgagatgtg gattcaaagt ttctaagtgt gcacacgtac acacacacac 11640
 ccctacctgc atgctgtttc taattttacaa agactactca agtaaagagg ggtaatttca 11700
 caccacagga ggtctgtata aagataactc tggctcttaa agcatcgggt ttcaggtaga 11760
 ggtgaagaga gaatgaatca aactcaaact gccatcctcc caggttaaag atgagtccag 11820
 tcattgtgga gccctctatt aacacaggac atgttaggaa ggcccattaa cccactgcc 11880
 tagcacattt gttaacgtcc tagtgcattt ttgatataca acagttcaca gtttttattc 11940
 tgatagggat ctattccagc agaccagctt ctgtgacctc tcaggatgcg aaaaagtaac 12000
 acaagaaaag cttcttatgt agtgaattga gaaggaaata cctagatcaa tattecctca 12060
 gcacctctgg taggaagtcc ttagtaggag aaaaacacca tgaagacct tagtgcagaa 12120
 ggaaaagggg gtaggggggtg gtggaagggg agctaaaaga aggggctgga ggttctcaga 12180
 attcaaacca cacaaacaaa tgaagtattg aggtcccaga cttgatctgg gccagtggtg 12240
 aaagccctaa cttattttct cagaagaata tgtcctctgg ttttagactt ggcactgtgg 12300
 ggagaaccag agtgatctat ggtggatata cacacaaaca tagacacaca tatttgcatt 12360
 tagtaatttt tgtaaaattt ccatttgcct ctctgatcct gtctgtatct ttgggaatag 12420
 atgtaagaat attacatctc tcaggcttgc tctgcccag gtttctgaac gtggaatata 12480
 tttctccagg gaaactcagt attatgagat ttgggaggtg gaagttaggc cacagccatc 12540
 tcagggacag gtttcacaga catgagtttt ggcagcagcc ttgtgttcta aagacattta 12600
 ctctagggg ctctagagga tctgcaacat cagcagaggc ttctgtggg ttctgatct 12660
 tttaaaatta gggttctgca gtgacttctg ctctccaga ccccctaaca gttttaaggg 12720
 ctaattccct gtaatatatt cagttctgct tagactgatt acagggatcc ctatttcttg 12780
 actgaattct catggctata gtggctcgtc accatttgac atcaccaaga agtcctcatt 12840
 caggtgcctt tggaaattcc ctcaaacaca caggaaatta gagtttgaag gaaaacggag 12900
 aaccatgagc actgtccaaa taggaacttc tctcctatca cagagaaagg gaactgaag 12960
 tcattttctc agtctcccaa atttagtaat ctcacagaag gaaccaatca gtgttctagg 13020
 actaaacagt gtcataagtt cgtgagcaac aacttggatt gaagatgcta ttataatata 13080
 tgaaatgtct ttgaatttac catgtttttc tcaagcacca ttaagaaca aggcattatg 13140
 gcagccagca aagggcagac atagaaaatt atacatggtt ttgctctaa aagaggagat 13200
 gacaagctta aatcatagga tcagactctt agcacagact gataccatag gctctcatct 13260
 ggccattct cctgactctt tacctttcag gaaaggtatt cctgaaaaat tgcaggagag 13320
 accatgctgt aggtctcttt ctagcgatct aggagttaat gccacagtggt gttcaaagcc 13380
 ctttgatgcg atcagataat cagtaatgta tggaaatatt gtgttcataa cttgtgagaa 13440
 cggctgcatg gcaggacaag accccagcac aacagtatgg aaaatccacc ctaagcagac 13500
 atgtcatgac tgaagtgaag caatggactc accagccagg cacggtggct catgctgta 13560
 atcccagcac tttgggaggc agaagcaggc agatcacgag gtcaggagat caaaacctc 13620
 ctggttaaca tgggtgcaacc ccgtctctac tgaaaataca aaaaaaaaaa aaaaaaatt 13680
 ggccgggcat ggtggcgggt gectgtagtc cttagctactc gggaggctga ggcaggagaa 13740
 tggcgtgaac ccaggaggca gagctttcag tgagccgaga tcgtgccact gcaactccagc 13800
 ctgggcgaca gagcaagact tccgtctcga aaacaaaaca acaacaaaaa aaacaatgga 13860
 ttcaccatcc gatgggctcc ctcaactgcca ggtcactctt catggaagta tttgtattcc 13920
 agtcccttct gtggaaagaa cttaacatcc tcttttctat aacactgtat cttcagaaac 13980
 aagagagtcg aagtctccta attttcagga gtgtctatgt tgaacatcaa aatataattct 14040
 ttagagcaga tctttaataa tcatatgaca agagaaaaac tttcataatc ttatgacatg 14100
 agggaaggaa tattaaagcc gttctgtggg ttattatctc taacgttccc aatagaatag 14160
 gctttgccag ctgggtgctg tggctcatgc ctgtaatccc agcactttga gaggccaagg 14220
 cgggcaaatc acgaggtcag gagtctgaga ccagcctgac caacatgggtg aaacccctc 14280
 tctactaaaa atacaaaaat tagccgggca tgggtgggtgg cgctgtaat ccagctact 14340
 caggaggctg aggcaggaga atcgcttgaa cccgggaggc ggagattaca atgagctgag 14400
 atcacgccac caactccagc ttgggcgaca gagcaagact ctgtctaaaa aaaaaaaaaa 14460
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aggccttgcc cattatactc tctcatattc 14520
 attgacctga atcctcaaat gaggtgtgtc cattagtcaa ctccaatctc ttgtcatata 14580
 taagatggta gagatgagaa gaaggtagct cctttacagc ccactatttc cactaactac 14640
 tacctgtggt tcaagatata gctttctcct cttctccagt gttgagagtg ttgaacctca 14700
 gagtttctcc tcttattttc tctaaatgag atacaatgcc agccatccc agctcttggc 14760
 ctgagttggt catcttgaag tctaggactc caagaagcat gaaagagctt ctttagtgaa 14820

gctatgtcct cagtactgcc aaaattcaga caatctccat ggccctgacaa tttacottct 14880
atltgggtaa tttattgtcc cttacgcaaa ctctccagct gtcattggcac agacatatga 14940
tctgtattta gctctcactt taggtgtttc cattgattct attctcacta atgtgcttca 15000
ggatataccc tgtctagaac tcagattggg gttaaagagt ctgtccgtca ttgaccaaca 15060
gtcttaaata cttgatttgt tgtogttgtt gtcctgtttg tttaaagaact ttacttottt 15120
atccaatgaa cggagtatct tgtgtcctgg accctttgca agaacccttc ccttagcaac 15180
agatgctca tctcaaaata tttttctgat tggccaaaga gtaattgatt tgcattttta 15240
tggtcagact ctattacacc ccacattctc tttctttta ttcttgtctg ttctgcctca 15300
ctcccagact ctactgactc ccaacagagc gcccaagaag aaaatggcca taagtggagt 15360
ccctgtgcta ggatttttca tcatagctgt gctgatgagc gctcaggaat catgggctat 15420
caaaggtagg tgctgagggg atgaaatctg ggacgataga ctacgaagca ttggagaaa 15480
gacctatgga ctttgggaag ataattgtgt gagtgaaga atagtgtgac aggtattatg 15540
tggctcagac agaaagtata acaaattgtg gtttgggtga gttcttccct caccacaaac 15600
tgaagtaagt caaatttggg ttagaggatc aaaactgagt tgtgtattga tgaatagcaa 15660
ggctctgcta caagccaaac tgggggtggg ggtgggggtg ggggaggaag aatattttct 15720
ggcaagcatt aacaagttat atttctgggc ttttaattat cttctggaa aattagtaaa 15780
atataaaact aaaaaccaca catagttttg ctagaattaa atgaaaaaaa aagttattag 15840
ccctgttctt atctgaatac atgatacagt agttattttt tggagtgtaa atctctgctg 15900
tatataattga gcacatatat tgtgttgaag attactagaa ggaaaagtca tcaaaaagca 15960
acaatttacc ccaggaaggg gggaggggag gcatgctgat atgagttgcc tcatgggaca 16020
gtgatagcca tccctgctcc tccatctccc atggtacagc agatcttata tcatgttaac 16080
ttagtaatat ttccaagaga gttagaaaaat gagtaaggaa atggggaatc tgatattatt 16140
ctctctcacc tccagagcaa cattggtgct gttgtaaaga tgtactgtag aaaagtattc 16200
ttcaccagc atgaccccca cagaaggtgt caggtagact tgaataaagc aaagtaataa 16260
cccagctccc ataccatag tggcaattgt agatttctat tgccccaaa gagccataca 16320
tagggatact tacctagaaa gacagaggct cttcccttgg tttgtgaaga ggcagctagt 16380
atatttgtgt gtgtttgcat agatgcaaac ggtaataaaa ttcttaggtt tatcaataca 16440
cagtcaaaca ttaaagtctc tcatcttggc tgggcacggg ggctcacgcc tgaatccca 16500
gcactttggg aggccgaggg agggggatca cgaggtcaag agatcgagac cgtcctgggc 16560
aacatggtga aacccctctc ctactaaaaa tacaaaaaat tagctgggta tggtaggaca 16620
cgcctgtagt cccagctact cgggagctg agccaggagg attgcttgag ccaggaggc 16680
ggaggttgcg gtgagctgag atggtgccac tgcaactccag cctggcgata gagcaagact 16740
ccgtctcaaa caaccaaac aaaacaaaac aaaatatctc acctatctt tgaagactaa 16800
ggaaaaaaaa atctcccact catcgataca ctccacagag gcagcactat ctccaagtgt 16860
agctttctct tttcatgttc attattccct tgggtgttgg tattctcaat gtcaatcata 16920
acagaacatc ttccataata acagtcccaa tttaggagc attaagataa aaggtggaat 16980
tgccaaggtc aatccagaag agaaccctct catagaggta accaccgtgt gggtttgat 17040
gctgggaagc agggggacta tgacgctaca aggtctcagt cttaattttt ggagtatttc 17100
agtcccagg tatattttcc atagatttgg cccttaata aaaagaagct tctgactcta 17160
aaatgtaaac agtgcctgtt acagtctgt tgatatatta agaaattact caccttact 17220
catttaactc taaaaacaaa cccctgacag gatcaaaacc acagcagggc tacataatag 17280
gaaaactata cataaatagg tagaataatc tgctcaggat cactaggtaa gttgctgaat 17340
aagaattcaa gatgtttttg atcccagagt ttaaaacca acctttcaa cagcgtttct 17400
ttcttcttag agtacaatgt tctgagaaag agatcctctg gaattctggc ctaagtgtat 17460
ttaatgccc ggtaaagaaa gtgagagAAC atttctctt aggggctgct gctggatttc 17520
taaaaagaaa ataatttctc agctagtaac atggagccaa acaacagctt cacaagactc 17580
tgggttcttt agccctcatc tcttccaatc caccctcttt ataaccagtc cttcttgttt 17640
ttcccctccc agctttgttc agcagcatgc ccttaccaca gaccttgtct tgtcactcat 17700
cctactcgc catcattctt tcatctctc tggccaatc tctctccacc acttctgccc 17760
tacctgtatg taggttattc atttccctc cttgattccc cccaccaac tctctttctc 17820
cacttctcgc ctttcagaag aacatgtgat catccaggcc gagttctatc tgaatcctga 17880
ccaatcaggg gagtttatgt ttgactttga tgggtgatgag attttccatg tggatatggc 17940
aaagaaggag acggtctggc ggcttgaaga atttggacga tttgccagct ttgaggctca 18000
aggtgcattg gccaacatag ctgtggacaa agccaacctg gaaatcatga caaagcgtc 18060
caactatact ccgatcacca atggtacctc cctctctgct gcaactcctgg acatgggaat 18120
ccatagtttg aaagttagttg cttagctctt ttgtgttaga ttattgtaac tgattttccc 18180
tccaagggcc taaccttggc attaacaagc cccaaattct catgccagag gtctgagaac 18240
ttatggggtt tgatcctatc ttgttgtgt caagtcttgt ctctgtcacc catggctctc 18300
tacaagtc caattggcctaag ttcattgtgg gggagccaga agggaggtcc ttggtatctc 18360
tacctctca tattggctca atttcttggg gagggggtgc tgtcagagat tgttatctga 18420
ggatgtgaca tagatttctc agggcacaat ttcaactact tttcagctt tagggttttt 18480

agatacgttt gtaccacaat tgagcatggg agggagaggg gtgagcctaa gcagtgatgg 18540
 ctgatttctg tcatgtctgt catgtgtccc ccagtacctc cagaggtaac tgtgctcacg 18600
 aacagccctg tggaaactgag agagcccaac gtccatcatc gtttcataga caagttcacc 18660
 ccaccagtgg tcaatgtcac gtggcttcca aatggaaaaac ctgtcaccac aggagtgtca 18720
 gagacagtct tccctgccag ggaagaccac cttttccgca agttccacta tctccccttc 18780
 ctgccctcaa ctgaggacgt ttacgactgc aggttgagc actggggctt ggatgagcct 18840
 cttctcaagc actgggggat ggaccaacac tcaatctcct ttatttcaag gtttccctct 18900
 atgatgcttg tgtgaaactt ggtgttctaa ctgtttcata atatctgcta caattaatat 18960
 aactgtcttc tccactatc cagcttccgc ctttttttaa tctgtaattc tctcaataca 19020
 tcattctgtc tccctctctt ttaatctatg aataactttt ctctttatta agaaccctac 19080
 atttgattct gagtggtact tcttcccaca ctcatacca tgtactctgc cttatttccc 19140
 cccagagttt gatgctccaa gccctctccc agagactaca gagaacgtgg tgtgtgccct 19200
 gggcctgact gtgggtctgg tgggcatcat tattgggacc atcttcatca tcaagggatt 19260
 gcgcaaaagc aatgcagcag aacgcagggg gcctctgtaa ggcacatgga ggtgagttag 19320
 gtgtggtcag aggaagacat atatggagat atctgagggg ggaaaacagg gtggggaaaag 19380
 gaaatgtaat gcatttaaga gacaaggtag taacagatgt ggctcttgat ttctcttgc 19440
 tagaacgaat cagacattgg tatcatctgg taccctcaag cttcagggtc tgtcatcctc 19500
 ttctatagac gggcaccttg atcacggctc cagtcttaga aatcatctcc agtacctaaa 19560
 accattgttt cacattagaa tactgagtct agggatctag aaaatactga gtctagggat 19620
 ctagaaaaat aagcctcaag atttgggcac atcctagctt gtatttctct gggcaggtca 19680
 tcagttcaga agcatttcca gatcctggct cctttcaggt tagggtaaat tcattgcatg 19740
 aatggggaat ctcttagagg ccaatgcctg cttttgcttc tttagtctca aatgtagtat 19800
 gagaaactct aaaaaaaggt aaagcatggg tgcttattat gttcagttgg agagttaggg 19860
 atacagttag ttcatgttgg aaaggttaga tgaacattga aagaattttg caaagtcaaa 19920
 ggattaagag agaagaggaa ggaatctgaa gcaaggagct caaaactgat cttaaactcc 19980
 ttggtaacta tgtgtgtctt gctataggtg atgggtgttc ttagagagaa gatcactgaa 20040
 gaaacttctg ctttaatggc tttacaaagc tggcaatatt acaatccttg acctcagtga 20100
 aagcagtcac cttcagcatt ttccagccct atagccacco caagagtggg tatgcctcct 20160
 cgattgctoc atactctaac atctagctgg cttccctgtc tattgccttt tctgtatct 20220
 attttccctc atttccctatc attttattat caccatgcaa tgectctgga ataaaacata 20280
 caggagtctg tctctgctat ggaatgcccc atggggcacc tcttgtgtac ttattgttta 20340
 aggtttcctc aaactgtgat ttttctgaac acaataaact attttgaaga tcttgggtgg 20400
 aatttttggg gtttaagcca gttctttggg tggcgggtgg ggggtggggag tgggtcctgg 20460
 ggaatatatg tgatccttcc cgggtaaaat atctgaaatg tgaatttacc ttataaattc 20520
 tagaattcat cagacatata ccggttcatt tgggtttgg ctcattttgt ctcaattctcag 20580
 gcaaccctct tgttgtggtc tagtccctcat caggaaaaacc taaagtgggg ttggtttgtt 20640
 gggagatctc tactgagcaa tgatataact ctatcttcag tagagtgaat ctgaaacccc 20700
 aaggtatgga tctcagaatg catgggatgg aggggagcag atgggggttag agtggggaga 20760
 aggaagacag aagaatccat aaacattgca ggatttacet atcaacatcg ttcatccag 20820
 atttaatgag caaagagatt ggacactgaa gactggcctt acccattctg ttagacatag 20880
 tctcagatgc ctatttttatt accgagagag tagtctgact gattcttgaa accaccttat 20940
 atttgaagat gtgtctttga gtggaaaagc tgagtgaat ttgggggttg ggagaaagat 21000
 atgacattaa gatgagagga aggaatattt gaaacacgat gaactgttgc tcaattgtct 21060
 ataaaaacta gacttgatat ttatctctaa aatagtttct agaacctgcc ataaacct 21120
 aagataaaact attcatgata gtgtggtaga ctgcaaaata atgctgttga aatgagttag 21180
 gcttgggttt catcttggct gtatcattta ctagctatgt tttcactggg atcttactta 21240
 acttagcctc acattactca tgaaaatact ggtgttaatt tttactacat tgaattaata 21300
 tcagaattaa aaggaaaacg caagcaaagt aattagatac atgcttagtg ataataaaat 21360
 attgcaaaaa attatacatt ctgttgtttt tctcaaaatt tctatagagt gatgataaaa 21420
 atctaagaga agctaaacaa aacaaggata aaccaaaagc tcatgacctt ctaagcctta 21480
 ctaataaata agaagtttct cggctgggca cgggtgctca cgctgtaat ccagcacttt 21540
 gggaggccga ggtgggocga tcacaaggtc aggaaatcaa gaccatcctg gccaacatgg 21600
 tgaaacccca tctctactaa aaatacaaaa attagccag cgtgggtgata ggcctctgta 21660
 atcccagcta ctctggaggt tgaggcagga gaatctcttg aatccgggag gcagaggttg 21720
 cagtgagccg agatcgccacc actgcgctcc tgcttgccaa cagactgaga ctccgtctca 21780
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagtttc tctactgttg gttcagagaa tcaaagcaga 21840
 atcttgagac tactgacggg agaataggta tgaatgtctt tottacetga ctacaaactt 21900
 tattataaaa taaatagctt aacacagaga atactactaa acttagacaa gcatggatta 21960
 agaaagcaaa aagtaaaccct atatactacc atgtaagaaa accatttttg gccaggcgtg 22020
 gtggctcacg cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag gcgggaggat cacgaggtca 22080
 ggagatcgag accatcctgg ctaacatggt gaaaccccgt ctctactaaa aaaaaaaaaa 22140

aaaattagcc ggggtgtggtg ggggggtgcct gtagtcccag ctactcgaga agttgaggca 22200
 ggaaaatggc gtgaacccaa gaggcagagc ttgcagtaag ccgagatcgc accactgcac 22260
 tccagcctgg gcgacagagc gagactccat ctcaaaaaaa agaaaaaaa aaaaaaaa 22320
 aaaggaaaac cattttaata gacttttatt ttttagagctg ttttaagcta acagaaaaat 22380
 tgcagaaatt gtatacagag ctccccacc cccagtttct acaatgctta acatcctgta 22440
 ttaatgtggt acacttgta caattgatga accaatacta ataattatta ttaactaaaa 22500
 ttcatagtta tacgagggtt cactctgtat tacacagta tatgggttct gacaaataca 22560
 taatatcata tatccaccat tacaggatta acaaaaatag cttcactgat ctaaaaatga 22620
 cccaggctcc atctactcat ccttccttcc tccctctgaa ccattggcat tctctgagct 22680
 atttactagt gttttgcctt tttcagaatg tcacatactt gtaatcatak agcatagagc 22740
 ttttccagat gagattcctt tgcttagcca tatgcataca ggtttctctg gtatattgtc 22800
 atagcttgat agcttatttt tctttaatgt taataatac tccattgtat aaatgtacta 22860
 tggtttattt acccattaat ctattgaagg acatcttggg tgcttctaag ttttggcaat 22920
 tatgaataaa gctgctataa acatccatga acagatgttt gtgcagacac aagttttcca 22980
 ctttggataa atacatagaa gggcagttgc tggatcatat ggttaagagta tgtttagctt 23040
 tgtaagaaac aactagaata tcttccaaa tggctgtatc attttgcatt cctaccagca 23100
 acgaatgaga gtccctggtg ttctatatcc ttgccagcat ttggatttct ggggtttggg 23160
 atttcagcaa gaaagccatt ttaatatattt tttattttaa aataattata gattcagggg 23220
 aaattgcaaa gacagtatag agacattctg catacgcctt caccagttt ctocaaatgt 23280
 ttatatattt agtaattata gcacagtatg aaaaccaaga aaataccttg atacaatgtg 23340
 tatgtataga tttatgcatg tcttaccaca tttgtatatt catgtaacca ccaccacaat 23400
 caagccaca gctattccat atcacagaga tcttcatcat gcttcccttt taatcctcta 23460
 tccccccaca caatcacctt aacaacttaa aaccactaat tctcttgcta ttaactccta 23520
 gaatagtgtc attttgaaaa tactagttaa atggaatcat gcagtatgtg actgggtgtt 23580
 ttcacttagc ataataccca tgagatccat ccaagctgct gcataatca acaatctttt 23640
 tttttttatt gctaaagtag attccatggt ctaaagtcag cacagtttgc ttaactattt 23700
 gcctattgaa ggacattttg gctgtttcta gtttggggtc actataaata aggctgtttt 23760
 gaacatgtgt ttaaggtttt tctatgagca tgagttcatg agttttcatt tctctgggat 23820
 aaatgtctgg gatataattc atgggcatat ggaaatata gtttagtttt tcaagaaact 23880
 gccaaactta gccaaagtat atgggttata cctgtaatcc cagcactttg ggaggccaag 23940
 gaggaaggat aaattgaggc caggaatttg aggccagccc cagcgtctac actttttttt 24000
 ttttttgaga cagagctctg ctctgttgcc agactggagt gccatgatgc actctcggct 24060
 cactgcaacc tccgcctccc aggttcaagc aattcttctg cctcagctc tgcagtagct 24120
 gagactacag gtgcacacca ccacgcccaa ttaatttttg tatttttagt agagacaggg 24180
 tttcaccatg ttggccagga tggctctgac ctcatgacct cgtgatccgc ttgecttggc 24240
 ctcccaaagt gctgagatta caggcatgag ccaccgtgcc cggccaaatg ttttgttttg 24300
 tttttgtttt ttgtttttt gtcaggtgga tgaggtggca tgcccctata gtcacagcta 24360
 cttgggaggg tgaggtggga ggattgcttg agcccaggaa ttcgaggctg cagttagcca 24420
 ctgcacttca gcctatctga cagagcaaga tcctgtctcc aaaaggaagg aaggggagg 24480
 agaagcaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aaggaaggaa ggaaggagaa aaaagaagg 24540
 agggagggg gaaggaaggg agggagggg gaaaaagaa agaagaaagg aaggtaaaa 24600
 gaagggagg agggaggaag gaagaaagga aagatggaag aaaggaagg aagggtggag 24660
 gagaaagaga aagaaaaaga aggaaggaag aaggaagga gggagggag ggaggaagg 24720
 agggaggggt aaaggaagga aagaaggaag gaaggagaa gaaaaggaag agagaaagag 24780
 aaagaaaaa gaaagaagaa agaaagaaga aagaaagaga gagaaggaa ggaaagaagg 24840
 aaggaagga aagaaagaa aagaaaaagg aaggaaggaa agaaggaagg aagaaagaaa 24900
 aagaaagaa gaaggaagga aagaaagaa gaaagagaa gaaagaaacc gataaactat 24960
 tctctaattg ctttgtggga gtatggccac tttcatcata ttgattttt ctttttttt 25020
 ttttttttt ttttttgca tagagtctgg ctctgtcgcc caggctggag tgcaatggcg 25080
 tgatttcggc tcaactgaaac ctctgcctcc tgggttcagg tgattctcct gcctcagct 25140
 ccctagtagc tgggattaca ggtgcacacc atcacgcctg gataatttt ttgtatttt 25200
 actagagatg gggtttcacc atgttgcca ggttggctc aaattcctga cctcaggtga 25260
 ttgcctgccc ttggcctccg gaagtgctag gattacagat gtgagccacc gcgccagac 25320
 aatattgatt cttcctttt catgaacatg atatttttt ccatttatt gtgtcatct 25380
 tgagttcttt gagcagtggg ttgtagtttt cctttagtag atctttctcc tccctagtta 25440
 gctgtattcc taggtatttc gtgtgtgtgt ggcaatcgtg aatgggatta cgttctgat 25500
 ttggctctca gcttgactgt tgtgggtgat aggaatgta gtaattttt cacattaatt 25560
 ttgaatgcca agacttcgct gaagttgta attagcttaa agagctttt ggctgagact 25620
 atggggtttt cttgatatag gatcatgcca tctgcaata ggcatagtt aatttctct 25680
 cttcctgttt ggatgcctt aattccttt cttagctgtt gccctggcca agacttccaa 25740
 tactatgttg gataggagta gtgagagagg gtatccttgt cttgcgctg ttttcaagg 25800

gaatgcttct agctttttcc catttagtat ggtattagct gtgggggtgt cacagaaggc 25860
 tcttattatt ttaagttatg ttcacttact actcagttta ttaagagttt ttaaatagaag 25920
 ggatattgaa ttttatcaaa aaccattcct gcatctattg agctaatacat gtggcttctg 25980
 tcttttagtac tgcttatgta atgaatcaaa tttattgatt tgcatatggt gaactaacct 26040
 tgcataacca agataaagca tacttgatca ttgtagatta gctttttaat gtaactgctgg 26100
 attcagtttg ccagtatctt gtggaggatt ttgcataaa tcttcatcaa taatatttgc 26160
 ctgaagtttt cttttgtgtg tgtgtctgcc aggttttggg gctgatcctg atgatgctgg 26220
 cctcatagaa tgagtttagag aggtatccct ctccctcaat tttttggact aattataaca 26280
 ggaatggtac cagctcttct ttgtacatca ggcagaattc agctgtgaat tattctagtc 26340
 ctaggggttt tttttgtttg gtagtctact tattactgat ttaatttctg agatcattat 26400
 cagtctgttc agggattgaa tttcttctct gttctgtcct gggagggtgt acgtgtccag 26460
 aaatttatca atttcttcta gttttcctag tttatgtgca tagagggtgt ttaaatattc 26520
 tctgatgggt atttgtgttt ctgtggggct agtggtaata tccccattgt aatttctgag 26580
 tgtgattatt tgaatcttct ctcttttctt ctttattagt ctaactagag gtcttttttt 26640
 tttattaatt tttttttagg aaaccaattc ctggactcat tgatcttttg agtgttggtt 26700
 ttttttctgt ctcaatctcc ttttagttcag ctctgatttt ggttatttct tgtcttctgc 26760
 tagccttgat attgggtttg acctggttga ccagttcttt tagttgtgat gttagggtgt 26820
 taaattgagg tctttctttt tcatgtgggc atttgatgca taaatttccc acttaacact 26880
 gccttagctg tgtccagag attctgggat gttgtatcgt tgttctcacc agttttaaag 26940
 aacttctcaa tttcttctct aatttcatta tttacacaaa agtcattcag gacgaggcgg 27000
 tccaacttcc atgtaattgt agggttttga atgaatttct tagtcttaat ttctaatttg 27060
 attgcaactgt tgtctgaaag attgtttttt atgatttcag ttcttgtgca tttgctgagg 27120
 agtatttgac ttccgattat gtgatcaatt ttagagtaca tgccatgtgg tgatgagaag 27180
 aatgtgtata ctgttgtttt ggtgtggata attctataga tgtctatcag gtccatttga 27240
 ttcagtctct agtccaagtc ctgaatatct ttgttaattt tttgtctcga tgactgtctt 27300
 aatattatca gtgagttggt aacatctcca agtattattg tgttggagtc taagtctctt 27360
 tgaaggctcc taagaacttg ctttatgaat ctgggtgttc ctgtgttggg tgctgatctg 27420
 gtttggctgt gttccattc aaatctcacc ttgaattgta gctcccacaa ttctcacatg 27480
 ccacgggagg cacctggtgg gaggtaattg aatcatgggt gcgggtcttt cccatgctat 27540
 tctcatcata gtgaataagt ctcatgagat ctgatagttt tataaagagg agtttccctg 27600
 cacaagttct cttgtcttgt ctgccaccat gtgagatgtg attttcacct tccatcatga 27660
 ttgtgaggca tccctagcca tgtggaactg tcagtcaatt aaatttcttt cttttgtaaa 27720
 ttgccagtc tcaggtaacat ctttgtcagc agcataacag actaatagag gagagtggag 27780
 cactgctgaa aagatatctg aaaatgtgga agtgactttg gaactgggta acaggcagag 27840
 gttgaaacag tttggagggc tcagaagaag atagggaaaat gtgggaaatt ttggaacttc 27900
 ctagagactt gttgaatgcc tttgcccacaa atgtctgtgg tgatgtggac aataatgtcc 27960
 aggctaaggt agtctcagat ggaaatgagg aacttgttgg gaactggagc aaagtgact 28020
 cattatgctt tagcaagag actggtggca ttttgtccct gtccatagaga cttgtggaac 28080
 tttgaaactg agagagatga tttagggtat ctggcagaag atatttctaa gcagcaaagc 28140
 attcaagagg ttaacttgcgt gctgttaaag ccattcagtt ttataaggga agcagagcat 28200
 aaatgttttg aaaatttgca gcctgacaat gcaatagaaa agaaaatcca attttctgag 28260
 gataaattca agctggctgc agaaatttca tgggtaacga ggagctgaat gtttaattatt 28320
 aagacaatgg ggaaaatgtc tccaaggcat gtcagagggt tttttttttt ttttccagag 28380
 tctcgctctg tcgccaggc tggagtgcag tggatgatc tcagctcact gcaagctctg 28440
 cctgccaggt tcatgccatt ctctgcctc agccttccaa gtactggga ctacaggcat 28500
 ccgccaccac acctggctaa ttttttgtat ttttagtaga gacgggggtt caccatgta 28560
 gccaggatag tctcgatctc ctgacctcat gatccacca cctcggcctc ccaaagtgct 28620
 gggattacag gtgtgagcca ccatgcctgg ccatgtcaga ggtcttgatg ccagcctgc 28680
 ccatcaccag cctggaggcc taggaggaag gaatggttcc ttgggctggg ccagctgtcc 28740
 ccgtgctgta tggggtcttt ggacttgggt ccctgtgtct cagccgctcc agctgtgact 28800
 aaaaggggcc aacatagagc tcaggccacg acttcagagg atgcaagccc caagccttg 28860
 cagcttccat gtgggtgttga gcctacgtgt acacagaagt caagagttga ggtttgggaa 28920
 cctccacctg gatttcagag gatgtatgga aatgcctgga tgtccaggca gaagtgtgct 28980
 gcctgggcag ggcactcatg tggaacctct gctagggcag tgcagaaagg aaatgtggag 29040
 tgggcaccct cacacagagt tctcaatggg gcagtgccta gtggagtttt gaaaagagga 29100
 acaccatcct ccagactcca gagtgatgga tcc 29133

- <210>3
- <211> 22485
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

ES 2 381 109 T3

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(22485)
 <223> gen HLA-DRB1*010101
 5
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (7391)..(7552)
 <223> exón 1 - gen HLA-DRB1*010101
 10
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (7453)..(7455)
 <223> codón de partida ATG
 15
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (15809)..(16079)
 <223> exón 2 - gen HLA-DRB1*010101
 20
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (19536)..(19817)
 <223> exón 3 - gen HLA-DRB1*010101
 25
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (20515)..(20624)
 <223> exón 4 - gen HLA-DRB1*010101
 30
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (21097)..(21121)
 <223> exón 5 - gen HLA-DRB1*010101
 35
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (21750)..(22085)
 <223> exón 6 - gen HLA-DRB1*010101
 40
 <400> 3

```

cttgtaact actattgtat tctctgcttc tatgagcttg agtattttag ttacctcata 60
taagaggaat tctgcaatat ttgtcttcoet gtaactggct tatttcactc agcataagcg 120
aaactaaaaa gcttttgcat agcaaagaaa acaataaaca gaatgaaaag ataacctgca 180
gaatggaaga aaatatttgc aaaccatata tttgataagg ggttaatttc aaaaatgtat 240
aagggaactca tacaactcaa gagcaaaaca accaaccaaa caaacaagct gattaaaaaa 300
tgggcaaagg acttgaacag atatgtcttg gaaaaagatg ttatagacta aatgtttgtg 360
ttccctccta atcatatggt aaatocctaag cccaatatt ataggattag aagggtggcc 420
ctttggaagg aattagggtct agagtctatc tagataaaca ctccaattaa ttgcccatat 480
gggaacacaa attgggttct gatgggtgtaa agttattaag gaaaaataat aacaataaat 540
ggataaacag gatcaatttc ttcttaccat ggagggagga tatgtatcct caacagaaga 600
ctgtgccatt taaaggccat attagtatc atcagagttg ataggaccct ttctgtgtag 660
atctcagcaa tgtcatccat cgaggaactt tgggtggagc cagtctttgc accatggcac 720
tatctaggtc atggctgtaa gtctacaagt gaaaaaacca tggccaatat taatgatatt 780
gcaattagta tcagcaatac cactgaagga aacggtgaca gttaaaataa tttaggaggc 840
tgggcacagt ggctcacgcc tgtaatocca gcactttggg aggccaaggt caagagatag 900
agaccatcct agccaacatg gtgaaacccc atctccacta aaaatacaaa aattagctgg 960
gcatggtcgt gtgcacctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatagcct 1020
gaaccagga ggcagaggtt gcagttagtc aagatcacgg cactgcactc cagcctggca 1080
  
```

acagagccag	actctgtctc	aaaaaaaaaa	aaaagaaaaa	aagaaaaaaa	aaagaattta	1140
gtgtttaaat	cctgttctgg	agagaaaata	aacctatgcc	tatgtattht	gcctcagtgg	1200
cagaaccagt	tgcttttaga	actgattcct	gttatgcttt	tttgtttttc	atagctttag	1260
aacttgtaat	agcaataaag	attcctcact	tctggaaaaa	ctcaaaaatt	tctaataatc	1320
cttatattat	cttctgtgtg	ggttattata	aagtatthtc	ctctgggtta	taatatagct	1380
atggcttaga	ttatthttta	ctagctggta	cctthttttc	tattctaaca	gttgactaga	1440
catctcttta	aggtaaaatc	caaaattgtg	aactatggac	actgacaggg	ttttgtttgc	1500
acccaaatca	tcttttagcat	ctctagatgg	atacttaata	gtaccaagtt	ttacaccttt	1560
atcttgctgg	tgtaaccctt	tgaatgacca	catgaccaac	acagggatgc	tagcaaatagt	1620
tagtgtgggt	cttatgcttc	atthttctca	gaattgctgt	atgatactga	gagttgcttt	1680
gtttgacagg	cacacagggg	aggaagagat	gtcatgacaa	aaggattagc	taattcttht	1740
gcacacacat	aagttgattt	tatttaggta	aaatgthgtt	aacataaata	agtactagta	1800
agthttacttt	ttcaagataa	taaattgtct	gcaaggatga	gctattagaa	aaataactgg	1860
taaaagattt	tattattht	tttaataaaa	ataagcaaca	aaccaggcac	acacttcaca	1920
ggacagattg	caaagagggt	ggtacagctc	aacagthtca	tcaatgtctt	cactgtccac	1980
actgcagtca	ctggggagtg	ggctagtggg	gcacaaaaat	gaaatthtga	aaaataacct	2040
ggcctattht	ggactggata	gatagthgga	tacttaccac	agcacaatta	acataagagc	2100
tagaaaagata	aatcaaaaga	aaattcttht	tacttacaat	attagtagaa	aggcctatgg	2160
gaattctagt	tgthttctct	atatgcaatg	gcaagcattc	tgthataaaa	cagctaagtt	2220
gagccaaaga	atgacattht	gaagthaaag	aagtctgtct	aactgacct	gatagthtca	2280
tggtgtaatg	attggcgcta	ccaaagthtc	thaatggagg	acattgtctga	gattthtactg	2340
gaaagggctc	tatcaagtht	gatgaatact	ataaaggcct	ctaaatggca	cagthttctg	2400
ttcaggatac	atatcttcca	tgctgagaag	aaactgthtc	tgthttatcca	tttattgtta	2460
ttgtcattth	ttctthtagat	ataaggatta	gtaatctgtct	thttacttht	aattccagat	2520
agcagthggt	gctthctgaa	aactcctgag	aacatthtgt	gactgctthg	acaagthgaca	2580
gacattctat	gataaccagg	gctthgtgat	agccaaaaaa	gcctatthtt	ccaaaatgtg	2640
ttgcaagctt	tcagccttac	tgcaagthgag	ccccattctg	tgacaatcgg	taggactcaa	2700
gacattctgt	aatcctacca	atgtcaacct	gcctgthgtt	cagcaaaagt	ctgtgcttht	2760
gattthtacct	gthtagtctt	gagaatgctg	ggattthatt	cctgthaaac	caagcctatg	2820
gthttcattca	tcaagaccag	agaccatgca	actthcgtac	ggaaaaccac	thttctccag	2880
aaaccaattt	aattggcatt	tcctcaggaa	ataagctctc	gthattgaca	ctctccacac	2940
acagcagagt	tgagaggatt	ctctctthgt	thtcagthca	aaagthtcagc	cctagatcca	3000
cctgtacgat	tgatgthttg	gtgacagtht	ctacattgth	tagcctgaac	tatgcttata	3060
ttgaaatatt	aaggaaagt	tgagatatat	aattthaaaga	agcatatctg	ttatagthta	3120
agthgtctgc	ctthaaaatt	cagthtaggac	tcctcactga	tgaatgggat	taaggcctth	3180
gtaaaaaacg	cttcacacag	thtttagcct	ctthgtctthc	cacctctac	catgtgagaa	3240
cacagthattc	atcccctctg	taggathgcaa	gthgcccatt	tggaagthgga	gagcatgccc	3300
thtgccagac	attgaaacct	ctggthgcct	aatctthggac	thctcagcct	ccatgtattc	3360
thtataaatt	accagthcta	cogthatttht	tcacagcaca	aataaactaa	gacaacatct	3420
thgtthactca	thaatgtata	aaacatacag	aattthagthc	atthgccattg	gccattthtt	3480
aaataataat	thgtatgatt	tatgaataagc	gthgcaaat	thataaaaca	aaattthgaa	3540
atthctcttht	aactatattt	tagthacattc	thgtatgtaga	attactthatt	thtgccctctg	3600
cattthtctct	gtaataataa	gthgaaacct	agctthcctth	cctagattac	cacaccacaa	3660
thtagthtaatt	agthaaattac	gattthcctat	tatcaaatga	aatgtgatat	thctcctggth	3720
gcaattgcaac	aattgtcaat	agthactgaa	tatcactgta	gthgtagaac	acagththgt	3780
ctcaaatcca	gggactthcta	cccaacctct	ccaagaaatc	thcaactthc	cacattaaca	3840
gaaatataatt	thtccaaagt	aaacgagaca	ctatthttat	thtattctga	aatgatcaaa	3900
ctthgcactac	thcgtgctga	gaaattagaa	atgatgattg	agagthataa	accggagthta	3960
ggaaatgthga	ggctgthgtt	atctthtaata	agaaggagat	thgtgcagga	gctatgggtg	4020
tcctthattgta	acataaacgc	aaactgthtc	atthccagag	gagagthaac	atgatgatga	4080
ggggaatctth	thgaaggaac	tagcattgct	acacagthtc	taccccaaag	thtataaaat	4140
gthgcccattc	actaaaagaa	gthgtcttac	tgattthgcac	agccatgaa	thaaagggata	4200
aaaataattt	tagthataagg	gacataattc	thctthtagaaa	thgaaatgthga	gthgtagthata	4260
thacaacagthta	gagcctgagg	gththtggaa	cacatataata	atacctggt	thcaatagagth	4320
thgacagaaaa	actctgctth	aaaataatta	ataththtatg	thgaaagthgt	thcaatccctc	4380
atthcctggct	cccattatga	thctcctcatt	thgtthgaggc	tatggccct	tactattcca	4440
ctthctctthgt	thtatcataa	agggagatath	aagaaagact	thgctggccgg	atgcaactggc	4500
thcatgcctgt	aatcccagca	ctthtgggagg	ccgagthtaca	atthctgagaa	thgtctacaat	4560
thctgagthaca	aagcaaaatg	ctcaaaaatt	gctgaagaaa	ththtagthcat	ththtattgca	4620
gcatgthgtgag	tatcccacc	ctagaaacac	thaaaggcac	aaggaaggag	thgtgatccag	4680
aactgthgthta	gggtgthgaa	thaatgcagaa	ctthtctctgt	atagthgtac	thtgaagthcc	4740

attctgaatc ttagatgcta catttatata aatataaagc ataataagta tctaaatgta 4800
 gaattataty tttaaaatta tatgattaca ttaactgatg taattcatag attttcccta 4860
 gggttctggt tectgaacat tctgtaacgt attagttagc aaagtctttt ttttttttga 4920
 aactgagtcct cactctatcg accgactgg agtgcagtg catgctcccg actcactgca 4980
 acctctgcct cctggaatca agcaattctc gtgcttcagc ctcttgagta gctgggatta 5040
 caggcatgca ccaccacacc cagctgattt ttgtattttt tctgtagta gagacaagg 5100
 ttcccatggt gggccaggct ggtttcaaac tctgacctc aagtggcca cccacctggg 5160
 cctcccaaag tgetgggatt acaggcatga cccactgtgt cctgccagca aagtcttctt 5220
 atatattccc ttatgataaa acaagagaag tggaaacagta aagggccata gcctcaatca 5280
 aatgaggaaa tcctaattggg aaccaggaat gagggattga acactcttca cataaaatat 5340
 taattattht aaaactattg ggggaaattc agccagatat caggcaaat tcacccccga 5400
 tatttcacgt agtttctttt ctatattccc taagtgtcgg ccggtctgag aaataaaggg 5460
 acagagtacc aaagagagaa attttaaagc tgggtgtccc caggagacgt cacatggtgg 5520
 caggttctgt gatgccccac aagccacaaa accagcaagt ttttattagt gattttcaaa 5580
 aggggagggg gagtgtatga ataggtgtg ggtcacagag atcacatgct tcacaaggta 5640
 atagaatata acaaggcaaa tggaggcagg gcgagatcac aggaccacag gaccggggcg 5700
 aaattaaaat tgctaattgaa gtctgggca ccatgtcat tgataacatc ttatcaggag 5760
 acagggtttg agagcagaca accggtctga tcaaaaattt attaggcggg aatttctca 5820
 tctaataaag cctgggagcg ctatgggaga ctggggttta tttcatccct aagcttgacc 5880
 acagaagacg gccacccct gaagcagcca tttcagaggc ctaacctcag ggaagtattc 5940
 tctttctcag ggatgttctc tgctgagaaa aagaattcag cgatatttct cccatttgc 6000
 tttgaaagaa gagaaataty gctctgttcc acgtggctca ccagtggcca gagtttaagg 6060
 ttatctctct tgttccctga acattgctgt tatctgttc ttttttcaag gtgccagat 6120
 ttcatattgt tcaaacacac atgctctaca acaatttgt gcagttaaca caatcatcac 6180
 aggtctctga ggtgacatac atctctca gattacaaag atgacaggat taagagatta 6240
 aagtaaagac agggatagga aatcacaagg gtattgattg gggaaagtga gtgtccatga 6300
 aatcttcaca atttatggtg agagattgca gtaaagacag gtgtaagaaa ttataaaagt 6360
 attaatttgg ggaactaata aacgtccatg aaatcttcac aatctatggt cttctgccat 6420
 ggcttcaggc ggtccctcca ttgggggtcc ctgacttccc gcaacaaaaa cagagtgtt 6480
 ctgtcaacag ctgactttga gtcttgatc ggtctctcag acccctgaat acttgattg 6540
 cacagttgac cttatcacat tgttagggta agtgcataca aaggcaactt cagaccctcc 6600
 attgcacata ggtggccct gcaagccgct tgctgtgtg tgttctggag ctgccactaa 6660
 acttggggac agcatcagga gatacacttg aaaaaacct ttttactcag attaaattat 6720
 taacaaactt tccatttctt taaacttact aaagaatctc tacctgtaa taggtacaga 6780
 tcaaaactgc tagtcaacag ctatcattct gtcatacaa cagatactcg tggctgtgc 6840
 tcttgaggc atccacagaa tcacagcatt ttccagtatt gaaagacctg aaagatcacg 6900
 gtgccttcat tttactgtg agacatgaag taattttccc aagtctaca cagtaagata 6960
 tggtgcaata aggaccagat taaaagtctc ctgatttgca accatgttcc ctccatctcc 7020
 tttactccta agcacactca cacactcact cctgcaaaaa attctcttgt caagtgggaa 7080
 atgaatgctc ttacaaggct caaatttgtg aacacatcac tgaccagcac agagctggct 7140
 aacaataggg acacaattaa ggtgttttac acgcaactgg ttcaaacctt tcaagtacta 7200
 aattaaaaca atcctttaa gaaggaatt gtttcagaaa aggaccttca tacagcatct 7260
 ctgaccagcg actgatgat ctattgtact cagatgctga ttctgtctcc aacactagat 7320
 taccatcc acgagcaagg aatcagtaa ctcttccc ataatttgga atgtgggtgg 7380
 agaggggcca tagttctccc tgagtgagc tcacctgctc ctctggccc tggctctgtc 7440
 ctgttctcca gcatgggtg tctgaagttc cctggaggct cctgcatggc agctctgaca 7500
 gtgacactga tgggtgtgag ctccccactg gctttggctg gggacacccg acgtaagtgc 7560
 acattgtggg tgctgacct ctatgggggtg gggaaaaaag ggagtgtgt taacattgtg 7620
 ccaggccat gtcccttaag aaagtgtgac attttcttca gggattgccc atctttatca 7680
 tatggatccc aaattattht caccacaaat ggaacttggc tacttgccc attcatgaga 7740
 ctgtgtaaaag ggcctttgta caggccatgt tttactttaa atctctacca ataaaacctt 7800
 tgcatacat gtccctcaggg tctttagagg atttagaat aaggatgcta aaataaattc 7860
 ctacatacgc acttcccttt atcatgttga cttatgtcag acgaaacaag gttttgttt 7920
 gaaaattttg tgggagtcaa aggaattcaa aggtctctc ctagacgac ctgtgtgtc 7980
 ctccacagga cctgtgggtg tggccctctc tctcatatg tgaggatgta cccagtggcc 8040
 tccccattgt tctcttctt tttttctga actccagtgt ttataaagcc tgtatccctg 8100
 tagcatatgt aggttctctg acagaagtta tacttagtgc tctttcttcc ttatggggaa 8160
 aaatccctgg atctgaaact gacatcttta gtacttggag tcacctaca ggtaagacc 8220
 atttatgagg tattcattgg tgcctcctct tgatcggctc ctgaccccc tgaatacttg 8280
 gatactctc aagaacttaa ggcacctct gaaaaactgg cccagattag tgcttattat 8340
 taatctttta taacctttct atacttgttt ctctgcatg ctctaactag acatgacaga 8400

agagattcaa	ctaacaatag	ataaattata	tgaaattcta	tttttgtaag	tcaaaaatag	8460
tcaaatacca	gaaaattaat	aatgttcaaa	ctatatactc	tgtgtggggg	taccgagacg	8520
acgtggacat	tgttcacatc	taatagggct	gaaagtcaat	gaagaagtc	tggaaactcc	8580
ttgtcttact	ggggtcttgt	cctaaatttc	ataggttcac	ccatcatgcc	ctcagctttc	8640
cttaattagc	catgtctgct	tatctctacc	tccagtttct	ctctattttt	cccagctat	8700
gttgtcatca	tttccagaaa	tctctaaaac	ttgcaaagat	ccttagcact	atgagatcca	8760
ttgaaagaga	taattttttt	ctttttgaga	cagggcttgg	ttctgtcacc	caggtgttag	8820
tgacgtggg	tgatctaggc	tcaactgcaac	ctctgcttcc	cacgctcaag	tgatcctccc	8880
tcctcagcct	ccagagtagc	ggagactaca	ggcaggcaaa	catgtgcagc	taattttcat	8940
gattttgtta	gagatgagat	tttgccatgt	tgcccaggct	gttcttaaac	tcctggactc	9000
aagcaatcct	cctgccttag	cctcccaata	tgctaggatt	atagatgtga	gccattgtgc	9060
ccaggcaaaa	agagatgaac	cttaatttaa	aaatttcctt	tttcttaaat	cactgtttct	9120
ctatctgtga	attcttcttc	caactagaag	gaggagaaag	aagaagtttg	cctgtatttc	9180
tcaccaggag	gaggagtcta	gtgtgatatc	aaaatgaaag	agtgtctggg	cttgatcccc	9240
ttcttgcttt	ccaggatccc	tgacgtgac	agttcccaca	ccttggttta	ttcatgtaaa	9300
gcacacttat	ttttttcagc	agctactcct	tactgggctc	cattctaagt	tcaaatcatt	9360
ctatttgagt	aagatagaga	gggtcccagc	tctcatggaa	gttacacaag	agtagaggag	9420
acagacacta	acccaataag	catttaacaa	agaagaaaat	gttagagaga	catagtgcac	9480
tgaagaaaag	acatcagggt	tgtgaaaaag	agagacatgg	attcacttac	tttggttcat	9540
atgcttaggc	agctataact	gagaaagtga	cattcagctg	agacaacaaa	ataaatagac	9600
agtcgtgaag	atctaaagga	cgaaagttcc	agggagaatg	aatggggggg	aagctctggg	9660
gtgggaaatt	atgtggaagg	acagaaaaga	ggctagaggg	actgaactat	agcaagcaag	9720
gaaatggaga	ggcagaagat	gaggtaggac	acagagagga	agtcaggagc	ctcatcatat	9780
tagactctga	tggccatggg	aaaaaaattg	aaatttattt	tatttttatt	tatttttga	9840
gacggagatt	tgttcttggg	gcccaggctg	gagtgcaatg	gcgcatctc	gactcactgc	9900
aacctctgcc	tcctgggttc	aagtgattct	cctgcctcag	cttcccaagt	agctgggatt	9960
acaggtgcct	gcgaccatac	tcggcttatt	tttttgatt	tttagtagag	acagggatc	10020
accatgttgg	ccaggctggg	ctcaaaactc	tgacctcaga	taatctgcct	ggcttcccaa	10080
agtgctgaga	ttacaggcgt	gagccaccat	gccaacctg	aaatttattt	gaatagatat	10140
gagaagctac	tgatgggtta	caaggacagt	caatttatat	tcgatttttt	ttttttgaga	10200
cagagtcttg	ctctgttgcc	caggctagat	tgacgtggta	caatctcagc	tcaactgcaac	10260
ctctgcctcc	tgggttccag	caatttctct	gcctcagcct	cccaagtagc	tgagaccaca	10320
ggtacatgcc	actacacctg	gctaattttt	tgtattttta	gtagagatgg	ggtttcaccg	10380
tgtagcagag	gatggcttg	atctctgac	ctctgtagcc	actcccctcg	gcccctcaaa	10440
gtgctgggat	tacagggtg	agccaccacg	cccggcctat	attcaattat	taaaattaat	10500
tctagctact	ctgtggggat	tggattgttg	ggtttcacaa	gtggtcagga	agactattta	10560
ggatcacagc	agggaattct	ccagggaaaa	caggttgtg	gcttcataga	gtgcattagt	10620
gataaagaca	gtgaaaacga	caaagtggac	agactaggca	tgtatttttg	cttagcttgt	10680
taatggatta	ctctaaaggg	ggtagaaaaa	tcaagcttat	tctaaggat	tttgttttga	10740
caataaagtg	gatgggtggg	tttattgaga	taggaaaaac	tgtgggagga	aatgatttga	10800
agtgggtggg	tggaaataaa	agttttgttt	aaatttgaga	tgatttattg	acatttatgt	10860
ggagcaatcc	gaaggtcaat	ggcattttaag	agactcatgg	tgaggtgagg	ccagggcttc	10920
aggtatttat	gttggcggca	tcagtacgtg	taatgtgtta	aattccaggg	agtggaagag	10980
gatacatagg	gagatggatt	gtgtggagaa	aaaagaagag	ggtacagggc	agcaaaaggg	11040
gctgagacag	agcccagggg	tgctggagaa	aacccaagag	aacataatgg	gtgtaagtca	11100
tggaaaatag	attattttca	aggagaaggg	agaggtcaat	tgtgggtgag	accaactaaga	11160
ggagggggaa	gtgagaacgt	gacagagaag	caagtgtctg	gtttgctgga	gttgatattt	11220
gcagtcaatg	gagtatccag	ggaggaaact	ggattggacc	atgtgaagag	caagtagaag	11280
tgaggacgag	gttaaggggtg	actattttaa	gtagagagct	tcaggggaagg	actgtgctct	11340
gggttcaggg	agcctgctgg	atctaaagga	aaagggctga	agagggctgaa	gagaaggagg	11400
aggacctgtg	aaccagagat	actgagttat	tattagcaag	gaaatactag	agggtccctg	11460
ttgtcagctg	catagatctca	tgcaaaaagg	cacacagaca	atatttcaca	cagccagtat	11520
ttattagtga	tgactgctca	gcccagttatt	actctaggtc	atgagaatag	agtgataaat	11580
aaaatgaaatc	tggtcgccat	cggtatatgc	catgtaacat	tttgcagtga	ctgtgtacca	11640
ggcctatgaa	tttcagtatg	caatttcaat	aacgatcctg	ttgtatctgt	gggttttaaa	11700
aacatataca	tctctggaat	ctaaaattga	gaggatataa	gtaaaaccca	gtattagaaa	11760
tttagtgctg	gaaatcagac	tgacgtttaa	atctgagcat	atagaaagtc	cctttcttct	11820
atgtcagcag	atgccttttg	tgtgaggttt	aggtatacta	cattattaga	cataaaccag	11880
tgattctgcc	ctatgttttc	agaatgacaa	ttctttatga	aactaataga	agaacagaag	11940
acaattgcaa	aatcatgatg	aagatgctag	tggctttaga	accaaggaat	acaaaaata	12000
atgtgagctg	cagttatagg	gattataaaa	gttaaatgg	gaatgcattt	gagtgtttat	12060

tatgtgatca	gtgctaataa	gagtcacat	ttaattttac	acttaacaat	aatcctgtga	12120
ggattaagct	attattaaat	gcatttgata	gattacaaaa	aggcttaccg	ttggtaaaaa	12180
ttgacccaag	gggaagaggt	cacatthtta	ttcagattht	ctgattctag	agtttgagag	12240
tctgtccatc	attagttagt	agtgacaata	ctgtgtctaa	attatcgaca	gaatttctga	12300
tattcatatg	tactatgthg	tttcttagag	tgtgggcaga	gattcagggc	tgctagthcc	12360
aatgtatagg	agaaactthc	attcattgtg	catttatcat	tttaaaagtt	ctaggctggg	12420
tgcggtggct	catgcctgta	atcccagcac	tttgggaggc	caaggcgggc	agatcacgag	12480
gtcaggagat	gaagaccatc	ctggctaaca	tggtgaaacc	tcgtctctac	taaaaataca	12540
aaaaattagc	tgggcgtggg	gggtgtgcacc	tgtagtccca	gctacttggg	aggctgaggc	12600
aggagaatgg	catgaacctg	ggaggcggag	cttgcaagtga	gctgagatcg	tgccactgca	12660
ctccagctcc	accctgggca	aaagagcgaa	actccgtctc	aaaaaaaaaa	aaaagttcta	12720
tatgtctgtc	atggcatatg	ttgaagaaca	caaggaagta	ttaaatcact	ccttctgagg	12780
tttgtctagc	aagttgggct	aggattgcca	aataaaaatac	aggthtctag	ttaaatctga	12840
atthcagata	cacaactata	atthtactgaa	aatccaaatg	taacttggca	tcctctgatt	12900
ttatthgcca	aatctgtcaa	ccctacatga	gacacatgag	catggattac	ggtgttacc	12960
atggaagcca	cagccacagt	gacagcgact	tcacacatgt	ttatthttta	actthtctctc	13020
tgtaaagaaa	gtgcttagat	aatthaggga	taaaaagata	gacattgttt	gatccaggat	13080
gcactcctct	ctgccatcgt	ttctaaaggg	caaagagaga	thtccacagg	thtactcac	13140
agtctgactc	acagtctggg	gacctgctca	tgctthgaaa	ctgtctgtat	gagaatgtca	13200
thttctthgg	thctccctth	ctgaggggac	thgactacaa	aactgagagt	thctacctctg	13260
gccaaggctg	gaaatthgat	gcctgctagt	atthgttggga	atgggagact	gaaataaatg	13320
agthtagttgg	ggcattaaac	aggaataaaa	tagctgtggg	tgtgattcat	tactacaatt	13380
agtggactag	tgccagagaa	atthaagaaag	aagatgatgt	gagagataaa	thatatgatt	13440
tggtaaaggca	agggaaatcag	taaatctthgg	thctgaacaa	gthcattthtc	tggaaagata	13500
gcactgtact	gggaccagaa	thctacaaaa	catccgthtt	atgtaagacc	aagatthtca	13560
acaaatattt	thcaatgcag	thctcagctg	ctccataact	aatagtgact	tattcaacac	13620
agatattthc	agatggthca	cacctatgtt	thctaccag	ggacagthca	ccacctctc	13680
cctthcctcc	catcactctt	gaggaacatg	tgccaatgtt	agaataatth	thggthgtca	13740
caacaggggt	thctthctgat	atthaatgag	cagaagccag	ggacactgct	agagaacca	13800
caatgttcag	aatagactcc	atcaccaacc	aagatthtct	tcgtccaaaa	tgtcaatagt	13860
gctgaggctg	gaagcattgg	thcacactgt	gctctthctg	aaaaatgtag	actcgtthtt	13920
ththththth	thththgagat	ggggthcttg	thctgtcggc	agactggagt	gcagtggctc	13980
catctcagct	cactacaacc	thctgcctcc	agthtcaagc	gattctctctg	thctcagctc	14040
ccagtagct	gggattacag	ctgcaccctg	ccatggccgg	ctaaththtt	gtatthtagt	14100
agagatgggg	thtccaccatg	thgcccaggc	tggthctgaa	ctctgagct	caggcaatcc	14160
accgctthg	gtctcccaaa	gtgctaggat	tacagcctg	agccaccgcg	ccggcctag	14220
actcacatct	thtatacact	tactgcccac	thcagthctt	tatggthttat	ththgctthg	14280
thcattataa	aaaactagac	agthgcataa	atthcaaccac	thactthgtt	aatccattta	14340
gtcaatgcaa	gctcaacatt	thcatatthta	thththtgct	tatgcaatat	tgttcaacat	14400
thtcataagt	tgtthggthcag	cactatctct	atthaactthc	aacagthtgc	cctthctaagt	14460
cacaaatagt	gatgctgctg	caatththtt	thcactaacat	gcctcagatt	thctgtagtga	14520
thctacattt	gatattatthc	acaatgttaa	atgthctctat	thattcattt	cactthtacc	14580
caacaggtta	thththaaagt	atththgtca	ththtccact	tcaaccaaac	ataaaagcaa	14640
aaacatcaaa	aatatgtaca	tagthgttata	catagthgtga	tatthtacaca	catatatgca	14700
catatgtthta	tatgtattga	aactacagaa	gcacatgtca	ccaataagag	ctctgagaca	14760
cctthgacca	cttaccctta	tcagatgaga	thtgccaaat	gagththtggg	aacaaatthc	14820
ththtaactga	atthctgagc	ththgtggatt	tagaaatgca	actgaaagth	tgtggacatt	14880
tacgaggatc	atagththttat	thctctthaaa	actctthcaat	actthtccat	tgtctthtagt	14940
aaatccaaaa	thctaacacc	actcacgagg	ctththcaaca	cctggctthct	tgtgattthct	15000
ccaatctaac	ctththaccct	cctthcctctc	agctctctctg	ctthtagtgaa	ctthgtthcta	15060
gthththtgaa	gthctatctc	aattcaagct	thgttacatg	ggattthctca	aactgaaat	15120
gtgctccgg	thththtccaa	acagacacac	agctctcaact	ctgccccctg	gctcacacct	15180
gcttaacttg	thtaagtcaca	thctgtaactg	thcactctctc	ctggcaccct	aaaggatttg	15240
agatcatctc	atthctctctc	gthcttagaac	thccacacttc	tgaatthtct	cattctctgtc	15300
thagctctthg	tgtgtthtggg	thththggccat	cactthtcaact	gctctthaaag	ctccccagc	15360
ggagtggaga	ggtctgthttt	cccgtgthttg	gattctctaga	ggcagcgcag	gcctggcaca	15420
aggtcatcac	thaggaagtg	thcacaggat	gaaagcgggtg	ctgtctgtth	aaggaaagg	15480
thaaagcctth	aaatggtaaa	gggtthgagag	aaggagcaaa	gtgcctthtg	ggtggaggct	15540
cccaggagga	ggggcgcgg	gctgcgggtgc	tggacggatc	ctctccagc	thctgctgg	15600
aggtctccag	aacaggctgg	aggcaggag	gggtcccaa	aagcctthggg	atcagaggtta	15660
gthththccac	ctggthcccc	agacccccgt	ctgctcaga	aagacagagg	atgagcccc	15720

gggctgcgtg ttgtcggggg tgcgggtggg gccagatagt gtcttccccg gaggccgctt 15780
 ctgtaaccgg atcgttcttg tccccccage acgtttcttg gagcaggta aacatgagtg 15840
 tcatttcttc aacgggacgg agcgggtgcy gtctctggac agatacttct atcaccaaga 15900
 ggagtacgtg cgcttcgaca gcgacgtggg ggagtaccgg gcggtgacgg agctggggcg 15960
 gcctgatgcc gagtactgga acagccagaa ggacctctg gagcagaagc gggccgcggt 16020
 ggacacctac tgcagacaca actacggggg tggtgagagc ttcacagtgc agcggcgagg 16080
 tgagcgcggc gcggggcggg gcctgagtc ctgtgagcgg agaactctgag tgtgtgtgtg 16140
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgagagag agagagagag agagagagag 16200
 agagagcgcc atctgtgagc atttagaadc ctctctatcc tgagcaagga gttctgcggg 16260
 cacagggtgtg tgtgtagagt gtggatttgt ccgtgtctgt gaggctgttg tgggagggga 16320
 ggcaggaggg ggctgcttct tattcttgga gacttctgtg gggagggtgac aagggaggtg 16380
 ggtgctgggg gctggagaga gaggcgacct tgattgtctc gggctccttag agatgcaagg 16440
 aagggaatg tatgggggtg gtggttgggg tgaaggttta ggggaggaga gctgaggggt 16500
 aagggaaggtt tgggataatg tgaagaggcc agtttcagac tgtccctggc acacaccctt 16560
 catgtaatct ctgaaataaa agtgtgtgct gtttgtttgt aaaagcatta gattaacttc 16620
 taggggaatt gagtagacct ctgaggcacc tctgaagctt ctttaggtat aaatttcttg 16680
 ctagtttttt gtttctctag tgttatattt ttacatagtt gaaatgactg tgaactaac 16740
 tttttgaaat aaagtttgaa aacctgtta ctattttatt ataatgctaa taatttcata 16800
 gttacttttt aaatatataa tagttgtgac acaaattacc tcactttctt tgtttttttt 16860
 tttcttacac ttttaagttt aggttacatg tgcacaacgt gcaggtttgt tacatatgta 16920
 tacatgtgcc atgttgggtg gctgcaccca ttaactctgc atttaacatt aggtatatct 16980
 cctaattgcta tccccccca cccccacc ccacaacagg cccagtgctg acatgctccc 17040
 ctctctgtgt ccatgtgttc tcaactgttca attcccacct atgagtgaga acatgctggg 17100
 ttoggttttt tgtccttgc atagtttgc gagaatgatg gttccagct tcatccatgt 17160
 cctacaaaag gacatgaact cattctttt tgtggctgca tagtattcca tagtgtatat 17220
 gtgccacatt ttcttaatcc agtctatcat tgttggacat ttgggttgg tccaagtctt 17280
 tgctattgtg aatagtgccg caataaacat acatgtgcat atgtctttat agcagcatga 17340
 tttataatcc ttgggttata taccagtaa tgggatggct gggcctaatg gtatttctag 17400
 ttctagatcc ctgaggaatc gccacactga ctccacaat ggttgaacta gtttagagtc 17460
 ccaccaacag ggtaaaagtg ttctatttc tccacatcct ctccagcacc tgttgccttc 17520
 tgacttttta atgatgcga ttctaactgg tgtgagatgg gcatttttcc atgtgtcttt tggtttgata 17580
 ttgcaattct ctgatggcca gtgatgatga gcaatttttcc atgtgtcttt tgggttcata 17640
 aatgtcttct tttgagaagt gtctgttcat gctctttgcc cactttttga tgggttattt 17700
 tgtttttttc ttgtaaat ttttgagttc attgcagatt ctggatatta gccctttgtc 17760
 atatgagtag attgcaaaaa tttctccca ttctgtaggt tgcctctca ctctgatggg 17820
 agtttctttt gctgtgcaga agctctttag ttttaattaga tcccatttgc ccattttggc 17880
 ttttgttgcc attgcttttg gtgttttaga catgaagttc ttgcccagc ctatgtcctg 17940
 aatggatttg cctaggtttt ctctagggg ttttatgggt tcaggctcaa catttaagtc 18000
 tttaatccat ctgtaattaa tttttgtata agcaaattac gtcactttcc ccattgatga 18060
 cctttattat gacattcacc aatagttgaa aatgtatggt tctggttaat ttttgattta 18120
 tttttttttg atttgtaatt attttgacct atttattggc cagttgtaat 18180
 tactgtctg ctctacgaat tacctgttgt atttggtagg taatggcaa tgaatctattg 18240
 tctcttatct ttagggctta gtatttttct cagtgcactt gtgggtttgt tgaactgtaa 18300
 gattattaac actttattga tatttgattc agtattttct ccagtttgtg gtatgtatat 18360
 tttgaaaatt cttttccatg ttaagaattt gaacattttt atttaataaa atatatgca 18420
 aatgttaat taatgattca caaactagct caagtctacc attttgggt attgatgtct 18480
 ccaggtttct ccttccttct taaaaaaaaa tgtatttatt gagagtatgc tagtgcagg 18540
 gatttcccta ggcataagca ctccaagtaa tgagtccag acactgcctt gatccaaatg 18600
 tcattctgga aagaaaaatc attttacagt gataagccta ataatagttt tacttgtttt 18660
 gcctgggaga tgcattgatc agctaaatgt aaatataaga actttcaaaa ctaaaatgac 18720
 gttccttaat ctttctctct gctttaggaa tcatgcttcc ttaggaactt aaagatttgg 18780
 agaatcattt ctgtctgtcc caccttccca ggagcataac catttctgtg gtgttctaag 18840
 gtgtgagtg atggcagtag tattcctaaa aatccatatt cagtttctct atgtgcctta 18900
 ctccgtccct ttctctatcc acattgcttt aaatcatatt tttctctcaa ggtgtacaag 18960
 gatgataaat aggtgccaa tggagaacc aagtgtgacg agccctctca cagtagaatg 19020
 gagtgagaag ctttctgacc tcataaattg aaggctatcg taattcattc ttttatatat 19080
 tttacttgca ttaatcctca tataacctca agaggtaaat taatataatt atcctccatt 19140
 attggagaga aagttgagac acaaaagaat caaaaactct tccaggatca accagtaaaa 19200
 ggcagacctt ggatttgaac caggcaacct ggctcagaag tcagttttaa ttaccacact 19260
 ctgtactttc aaagatttgt aaacgctttg acaatgcatg tcaatttcaa gctatgaaga 19320
 gccaaacata atttttcaca atatctctca aatctaattg gtccccacta taaagattaa 19380

attccagget gatgacactg tgaggccaca tggccagctg tgctggaggg ctgctcaagg 19440
ccagagceta ggtttacaga gaagcagaca aaaagctaaa caaggagact tactctgtct 19500
gcatgactta ttccctctac cttgttttct cctagtctat cctgaggtga ctgtgtatcc 19560
tgcaaagacc cagcccctgc agcaccacaa cctcctggct tgctctgtga atggtttcta 19620
tccagycagc attgaagtca ggtgggtccg gaocggccag gaagagaaga ctgggggtgg 19680
gtccacaggg ctgatccaga atggagactg gaccttccag accctgggtga tgctggaaac 19740
agttcctcgg agtggagagg tttacacctg ccaagtggag cacccaagcc tgacgagccc 19800
tctcacagtg gaatggagtg agcagcttct tgacttcata aatttctcac ccaccaagac 19860
gcgaacttta ctaatccctg agtatcaggg ttctcctatc ccacatccta ttttcatttg 19920
ctccacgttc tcatctccat cagcacaggt cactgggggg tagccctgta atactttcta 19980
gaaacacctg taccctctgg ggaagcagtc atgcctgcc a ggcaggagag gctgtccctc 20040
ttttgaaact ccccatgatg tcacaagtgc gggtcacctg ctgtctgtgg gctccaggcc 20100
ctgcctctgg gtctgagact gagtttctgg tactgttgcct ctgagtcggt ttgttgaatc 20160
tgagaagagg agaagtatag ggaccttctc gacatgaggg gagtccaatc tcagctccgc 20220
cttttattag atctgtcact ctaggcaact acttaacctc attgggtctc aggctttctg 20280
ttcatcagat gttgaagtcc tgtcttacat caaggctgta atatttgaat gagtttgatg 20340
actgaacctt gtaactgttc agtgtgattt gaaaacctt ctcaagaaat ggctcagttat 20400
tttagttctt gcagagcagc cttctttctc attttcaaag ctctgaatct caagggtgca 20460
attaagagg ttccatttg gataaaaaatc actaaacctg gcttctctc tcaggagcac 20520
ggctgaatc tgcacagagc aagatgctga gtggagtcgg gggcttctg ctgggcctgc 20580
tcttcttg ggccgggctg tcatctact tcaggaatca gaaaggtgag gagcctttgg 20640
tagctggctg tctccatacg cttttctgga ggaggaacta tggctttgct gaagttgggt 20700
ctcagcatat gaatggccct ggataaagcc tctctactcc caaatgacct ccaatgttct 20760
gcaaattccag aatcatcag tgcattggtg ctatgtcaaa gcataatagc ttgtggccta 20820
cagagataac agaaagatta acaggtatag gtgctttggt tgagatcgtg gagcaaatca 20880
aggaagagca actaaagcta atacaattac actggatcct gtgacagaca cttcacactt 20940
catgggtcac atggctgtt tctgtcctc tctgcctgg ctgggtgtgg ttgtgggtgc 21000
agagaactct caggtgggag atctggagct gggacattgt gttggaggac agatttgctt 21060
ccatctcct taagtgtata tcttctctt ttcttaggac actctggact tcagccaaca 21120
ggtaatacct tttcatcctc tttagaagaa agatttgagg gccaggcgca gtggctcacg 21180
cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag gcgggcgaat catgaggtca ggagttcgag 21240
accagcctga ccaacgtggg gaaacccct ctctactaaa aatacaaaaa aaaatcagtc 21300
gggcgtgggt gtgtgcgct gtaatcccag ctactcagga ggccaaggca ggagaatcgc 21360
tggaaccag gaggcagagg ttgcagtgc cogagattgg gccactgcac tccagcctag 21420
gtgacagagt gagaccccat ctcaaaaaaa caaaaaaaag aaagaaagaa acagatttcc 21480
ttccctaga atgatggtag aggtaataag gcatgagaca gaagtaatag caaagacatt 21540
ggatccaaat ttctgatcag gcaatttaca ccagaactcc tcctctccac ttagaaaagg 21600
cctgtgctct gcaggagat tgactcatgg agacttcaga acttgttttt cttcttctg 21660
cagtgtctc atctgagtcc ttgaaagagg gcaaaataaa ctgtagtag agccaggctc 21720
gaaaacaaca ctttcttgcg tctctgcagg attcctgagc tgaagtgaag atgaccacat 21780
tcaaggaaga accttctgcc ccagctttgc aggatgaaac acttccccgc ttggctctca 21840
ttcttcaca agagagacct ttctccggac ctgggtgcta ctggttcagc agctctgcag 21900
aaaatgctc ccttgtggc tgcctcagct cgtaccttg gcctgaagtc ccagcattaa 21960
tggcagccc tcatctcca agttttgtgc tcccctttac ctaatgcttc ctgcctccca 22020
tgcatctgta ctctgctgt gccacaaaaa cattacatta ttaaattgtt ctcaaacatg 22080
gagttaaaaa tegtctggtc atttggcccc aaggacaaaa aataaaaaaga aaagaaaaag 22140
tgaagattat ttccgatag aataatggt ttcatggata tgtcataagt atgtgagata 22200
gtgcatatgt taaatagggt gatttagaca ttttacta caggcatata tcaaaacttc 22260
atgctgtatg acataaatgc acaattttta cttgtcaatt taaaaagtaa acctaacttc 22320
taaaaagggt atgcataaaa actgagaaca gactataaga actgaacaaa acttgcaaaa 22380
catgagatga taaaccagct agcaagtcaa tcagaactct ttctcaacct cgtctacaat 22440
attgtgtgct tataactgta aattagtata tagtttttca ttcca 22485

<210>4
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Ligador Sintético Gly-Ser

ES 2 381 109 T3

<400> 4
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

5 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5

15 cattgagaca gagcgcctgg cacagaagca g 31

<210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25 <400> 6

ggatgacgtg agtaaactg aatcttggga gtacgc 36

<210> 7
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7

40 ttctcaacg ggacggagcg ggtg 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 8

50 ctgcactgtg aagctctcac caac 24

<210> 9
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

60 <400>9

ctccaagccc tctcccagag 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 10
 10 atgtgcctta cagaggcccc 20
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20
 <400> 11
 Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 30
 <400> 12
 Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val
 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 40
 <400> 13
 Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu
 1 5
 45
 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 14
 Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser
 1 5 10 15
 55

ES 2 381 109 T3

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 15
 Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 26
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20 <400> 16
 Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg
 1 5 10 15
 Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly
 20 25
 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 30 <400> 17
 Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 <210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 40 <400> 18
 Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
 1 5 10 15
 Val Trp Leu Ser Val
 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ratón transgénico que tiene genes endógenos no funcionales de H2 clase I y de H2 clase II, que comprende un transgén funcional de HLA-A2 y un transgén funcional de HLA-DR1, en el que dicho transgén de HLA-A2 es una monocadena que comprende la beta 2 microglobulina humana enlazada covalentemente a la cadena pesada de HLA-A2.
- 10 2. Ratón transgénico según la reivindicación 1, en el que el transgén de HLA-A2 comprende la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID nº 1, y el transgén de HLA-DR1 comprende la secuencia de HLA-DR1 proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3.
- 15 3. Método para identificar simultáneamente la presencia de uno o más epítomos en un antígeno o grupo de antígenos candidatos, en el que el epítomo provoca una respuesta humoral específica, una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH, y/o una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL, comprendiendo el método:
- 20 a) administrar el antígeno candidato o grupo de antígenos candidatos al ratón de la reivindicación 1 o 2;
 b) analizar una respuesta humoral específica en el ratón frente al antígeno;
 c) analizar una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH en el ratón frente al antígeno; y
 d) analizar una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL en el ratón frente al antígeno;
- 25 en el que
 la observación de una respuesta humoral específica en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta humoral en el antígeno;
- 30 la observación de una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta restringida a HLA-DR1 de TH en el antígeno; y
 la observación de una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta restringida a HLA-A2 de CTRL en el antígeno.
- 35 4. Método según la reivindicación 3, que comprende además analizar una respuesta específica de Th1 en el ratón frente al antígeno y analizar una respuesta específica de Th2 en el ratón frente al antígeno; en el que
 la observación de una respuesta específica de Th1 en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta específica de Th1 en el ratón frente al antígeno; y
 la observación de una respuesta específica de Th2 en el ratón frente al antígeno identifica un epítomo que provoca una respuesta específica de Th2 en el ratón frente al antígeno.
- 40 5. Método para identificar la presencia de un epítomo en un antígeno candidato o grupo de antígenos candidatos, comprendiendo el método:
 a) administrar el antígeno candidato o grupo de antígenos candidatos al ratón de la reivindicación 1 o 2; y
 b) analizar la respuesta epitépica en el ratón frente al antígeno; en el que
 la observación de una respuesta epitépica T auxiliar restringida a HLA-DR1 de TH identifica un epítomo T auxiliar restringido a HLA-DR1 en el antígeno, y
 la observación de una respuesta epitépica T citotóxica (CTL) restringida a HLA-A2 identifica un epítomo T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 en el antígeno.
- 50 6. Método para comparar la eficacia de una respuesta inducida por dos o más vacunas, comprendiendo el método:
 a) administrar una primera vacuna candidata a un ratón de la reivindicación 1 o 2 y medir la respuesta inducida en el ratón por la primera vacuna candidata;
 b) administrar una segunda vacuna candidata a un ratón de la reivindicación 1 o 2 y medir la respuesta inducida en el ratón por la segunda vacuna candidata;
 c) administrar cada vacuna candidata adicional a comparar a un ratón de la reivindicación 1 o 2 y medir la respuesta inducida en el ratón por cada vacuna candidata adicional a comparar; y
 d) determinar la eficacia de cada vacuna candidata para inducir una respuesta comparando las respuestas con cada una de las vacunas a comparar entre sí,
- 65

en el que dicha respuesta es una respuesta de célula T auxiliar, una respuesta de célula citotóxica o ambas.

7. Método según la reivindicación 6, en el que la respuesta de célula T auxiliar es una respuesta restringida a HLA-DR1.

8. Método según la reivindicación 6, en el que la respuesta de célula T citotóxica es una respuesta restringida a HLA-A2.

9. Método según la reivindicación 6, en el que la respuesta de célula T auxiliar es una respuesta restringida a HLA-DR1, y en el que la respuesta de célula T citotóxica es una respuesta restringida a HLA-A2.

10. Método para determinar simultáneamente la respuesta humoral, la respuesta de célula T auxiliar y la respuesta de célula T citotóxica de un ratón tras su inmunización con un antígeno o una vacuna que comprende uno o más antígenos, comprendiendo el método:

- a) administrar el antígeno o la vacuna que comprende uno o más antígenos a un ratón de la reivindicación 1 o 2;
- b) analizar una respuesta humoral específica en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos;
- c) analizar una respuesta de célula T auxiliar en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos; y
- d) analizar una respuesta de célula T citotóxica en el ratón frente al antígeno o vacuna que comprende uno o más antígenos.

11. Método según la reivindicación 10, en el que la respuesta de célula T auxiliar es una respuesta restringida a HLA-DR1, de TH.

12. Método según la reivindicación 10, en el que la respuesta de célula T citotóxica es una respuesta restringida a HLA-A2, de CTRL.

13. Método para optimizar dos o más composiciones de vacunas candidatas para la administración a un ser humano, basándose en criterios preseleccionados, comprendiendo el método: determinar simultáneamente la respuesta humoral, la respuesta de célula T auxiliar, y la respuesta de célula T citotóxica de un ratón tras su inmunización con las dos o más composiciones de vacunas candidatas, usando un método que comprende administrar dichas composiciones de vacuna que comprenden uno o más antígenos al ratón transgénico de las reivindicaciones 1 o 2, analizar una respuesta humoral específica en dicho ratón frente a dichas composiciones de vacuna, analizar una respuesta de célula T auxiliar en dicho ratón frente a dichas composiciones de vacuna, analizar una respuesta de célula T citotóxica en dicho ratón frente a dichas composiciones de vacuna, y seleccionar una vacuna optimizada aplicando a los resultados criterios preseleccionados.

14. Método según la reivindicación 13, en el que las dos o más vacunas candidatas difieren sólo en la proporción entre el antígeno y el adyuvante presente en la vacuna.

15. Método según la reivindicación 13, en el que las dos o más vacunas candidatas difieren sólo en el tipo de adyuvante presente en la vacuna.

16. Método para determinar si una vacuna presenta un riesgo de inducción de una enfermedad autoinmunitaria cuando se administra a un ser humano, comprendiendo el método:

- a) administrar la vacuna a un ratón de la reivindicación 1 o 2; y
- b) analizar una respuesta autoinmunitaria en el ratón; en el que

la observación de una respuesta autoinmunitaria en el ratón indica que la vacuna presenta un riesgo de inducción de una enfermedad autoinmunitaria cuando se administra a un ser humano.

17. Célula de ratón transgénico aislada que tiene genes endógenos no funcionales de H2 clase I y H2 clase II, y que comprende un transgén funcional de HLA-A2 y un transgén funcional de HLA-DR1, en la que dicho transgén de HLA-A2 es una monocadena que comprende la beta 2 microglobulina humana enlazada covalentemente a la cadena pesada de HLA-A2.

18. Célula de ratón transgénico según la reivindicación 17, en la que el transgén de HLA-A2 comprende la secuencia de HLA-A2 proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID nº 1, y el transgén de HLA-DR1 comprende la secuencia de HLA-DR1 proporcionada en el listado de secuencias en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3.

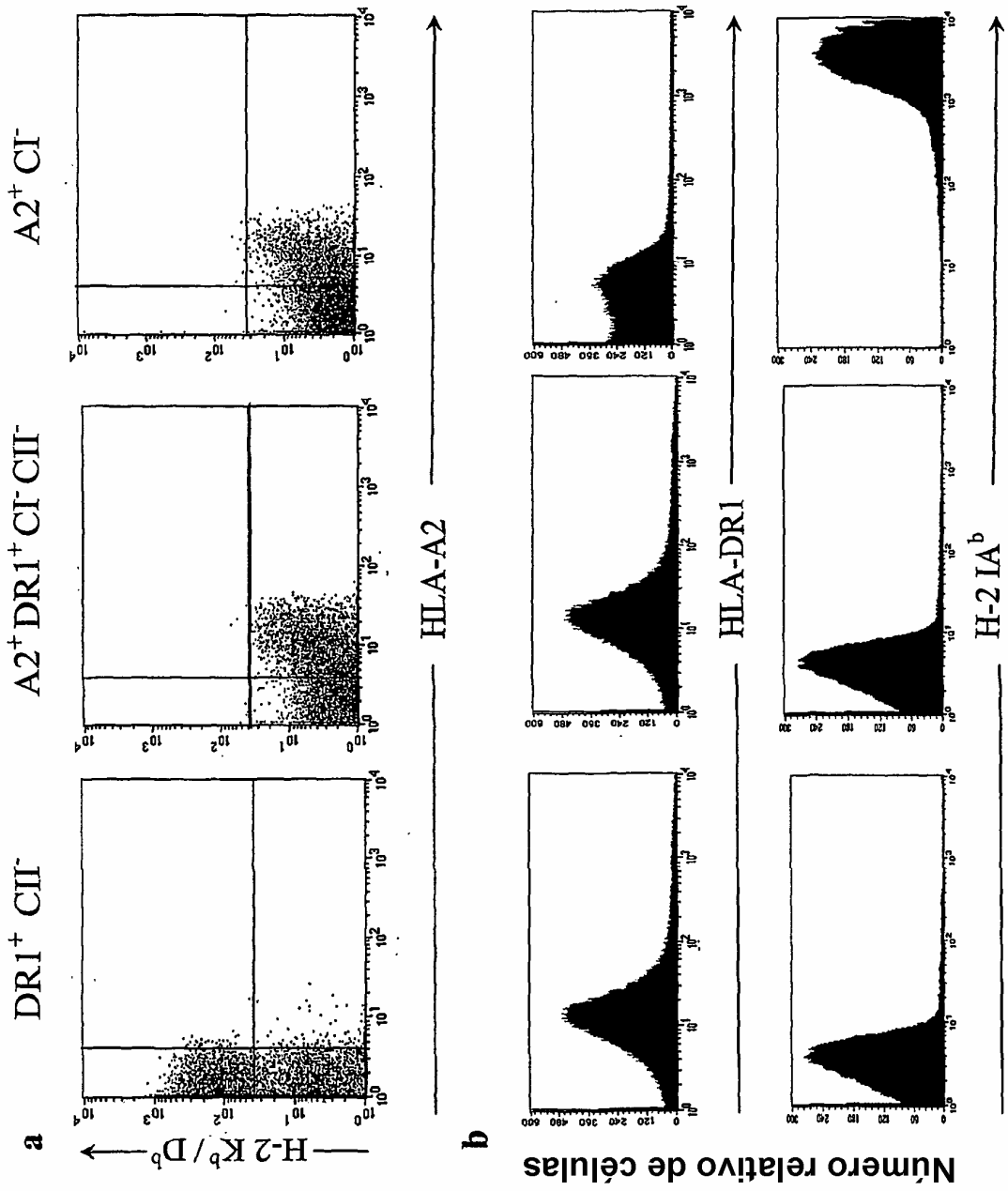
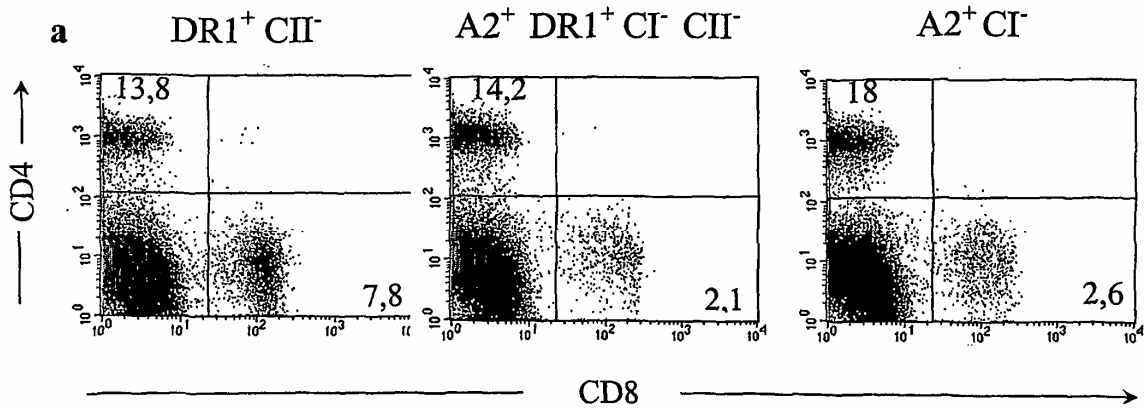
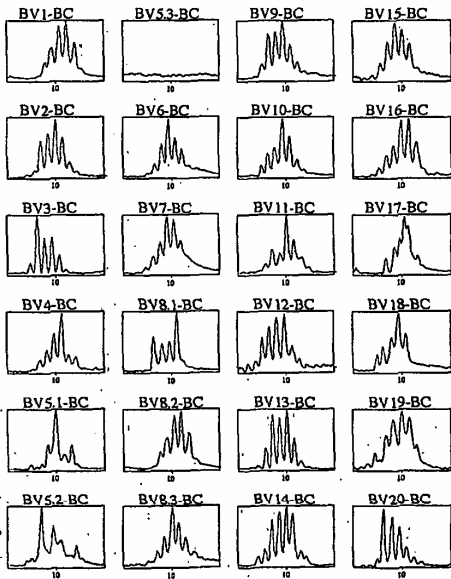


Figura 1



b



c

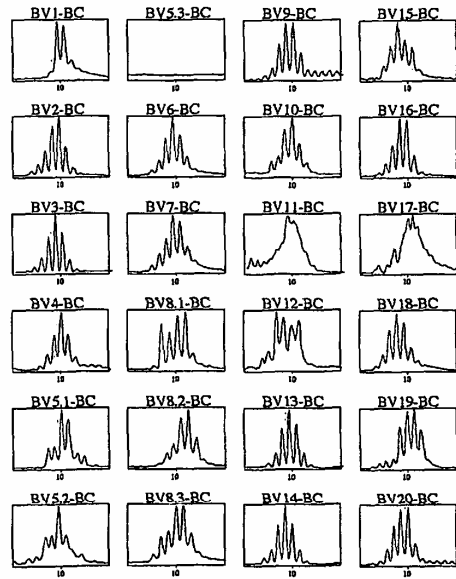
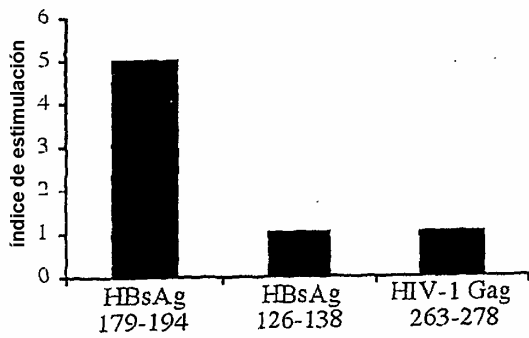
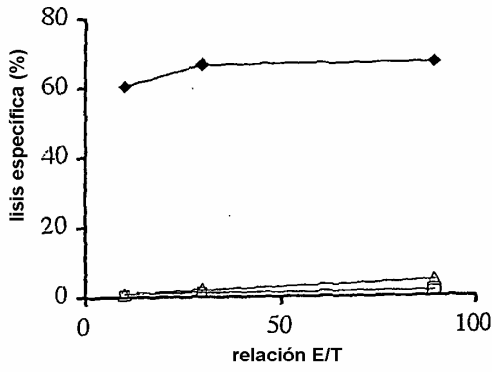
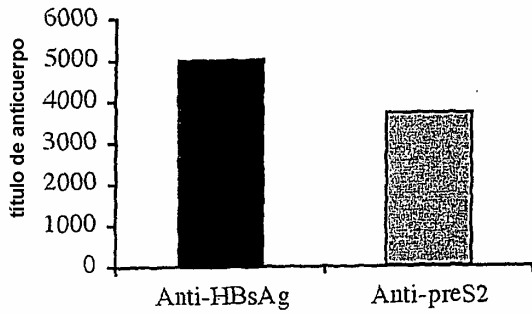


Figura 2

a



b

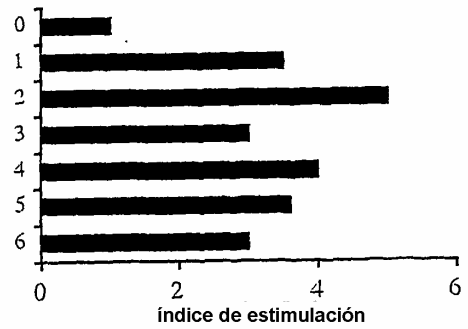
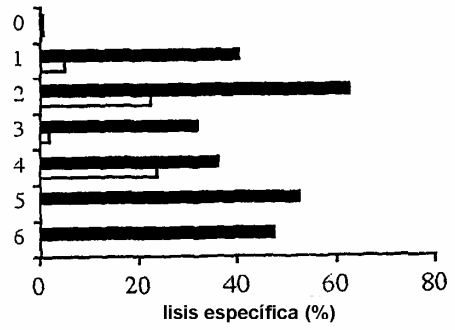
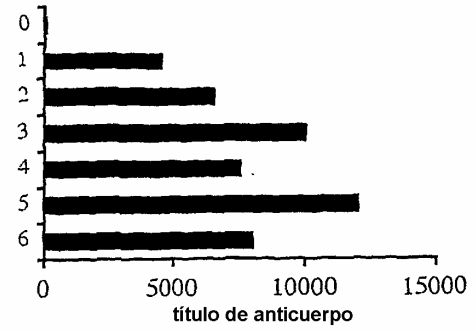
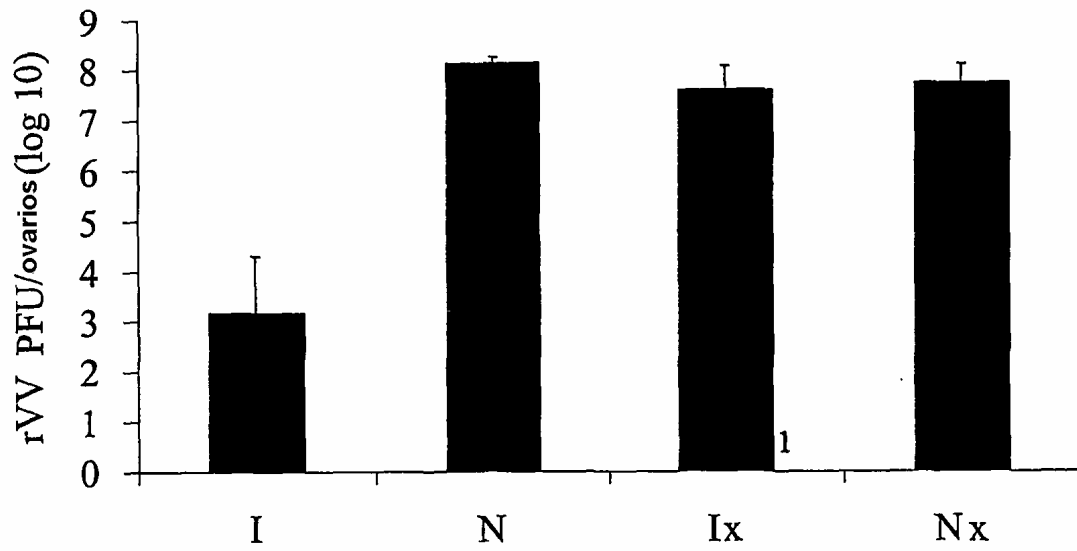


Figura 3

Figura 4



**Respuesta anti-PreS2 de HLA-A2 + DR1 + CI - CII-AC
tras la inmunización con pcmv S2/S**

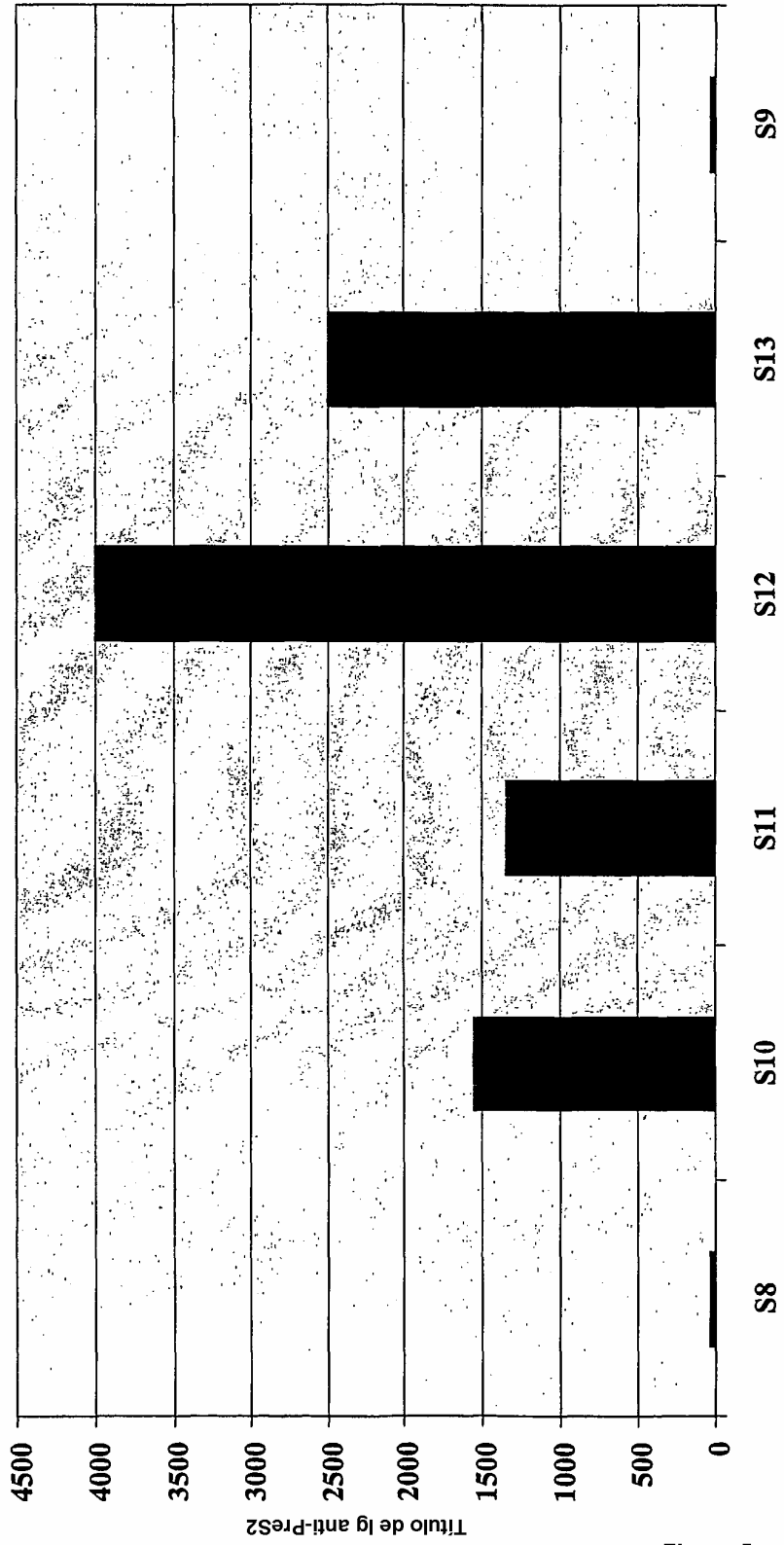


Figura 5

Respuesta proliferativa de HLA-A2+DR1+CI-CII-T CD4 frente a epítomos restringidos a HLA-DR1 tras la inmunización con pcmv S2-S

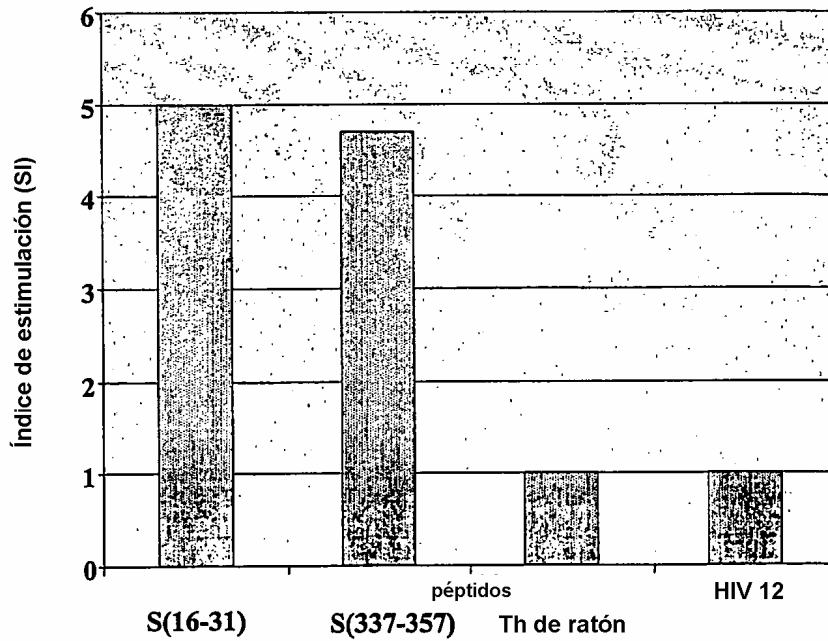
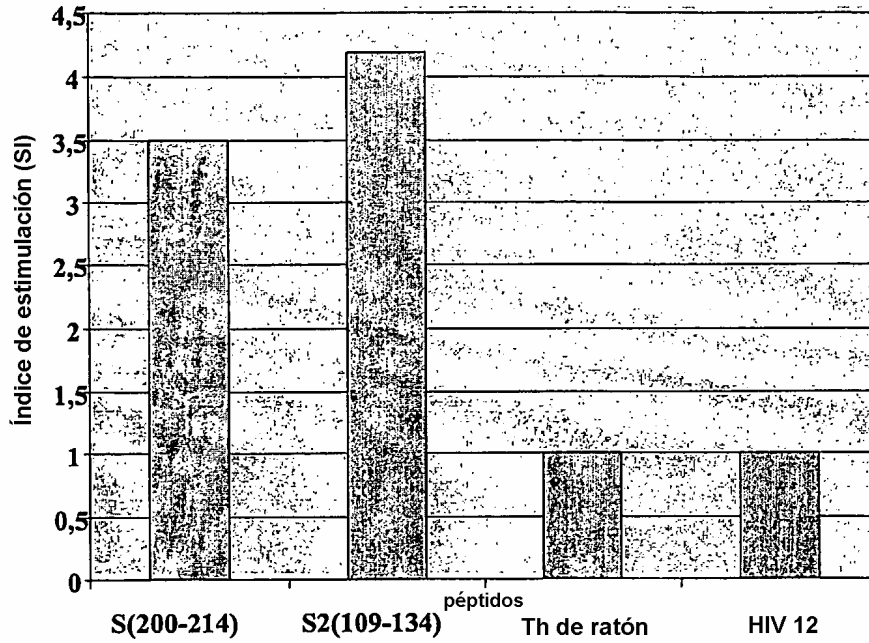


Figura 6

Respuesta T CD8 citotóxica de ratones HLA-A2+DR1+CL-CIII frente al péptido de HBS (348-357) restringida a HLA-A2 tras la inmunización con pcmv S2/S

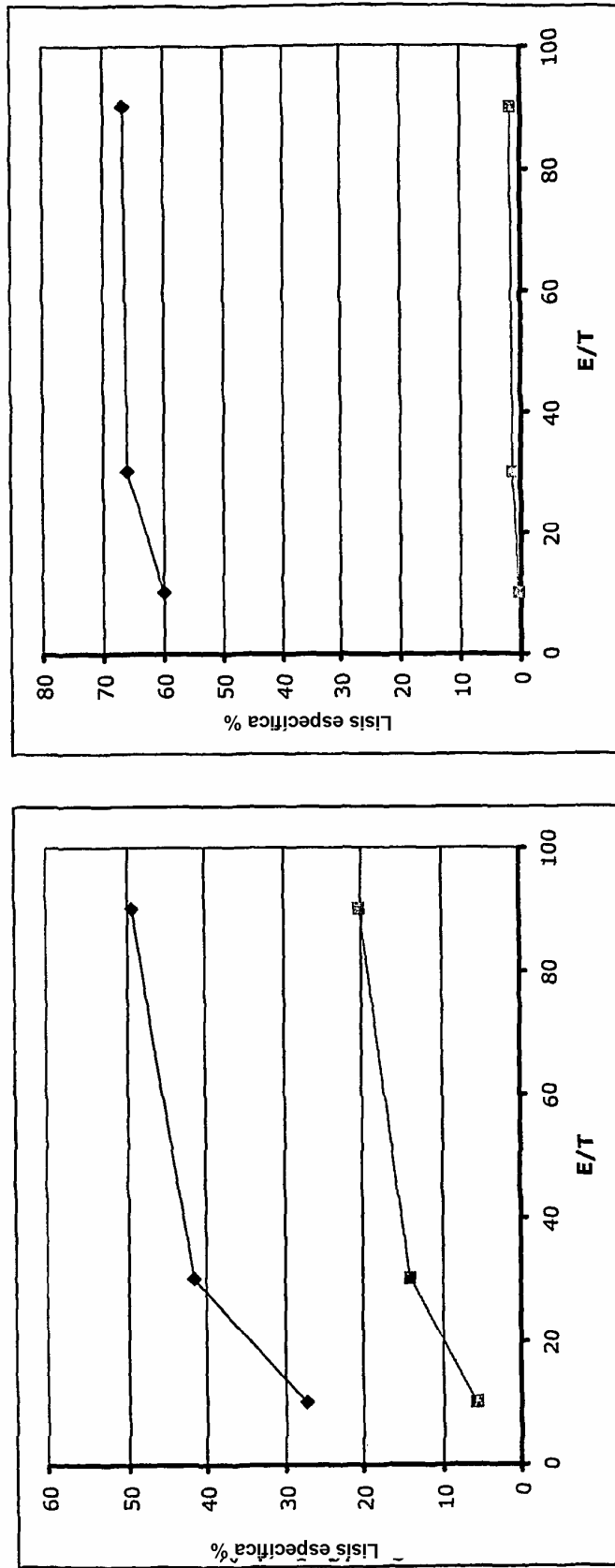


Figura 7