(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 280**

(51) Int. CI.:

A01K 67/00 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/US2014/055492**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15038959**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14843371 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3043641**

(54) Título: **Métodos de producción de animales transgénicos con receptores de células T que son específicos de una proteína fluorescente**

(30) Prioridad:

12.09.2013 US 201361877120 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2020

(73) Titular/es:

ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI (100.0%)
One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029, US

(72) Inventor/es:

AGUDO, JUDITH y
BROWN, BRIAN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Métodos de producción de animales transgénicos con receptores de células T que son específicos de una proteína fluorescente

Campo de la invención

La presente invención se refiere a receptores de células T que son específicos de una proteína fluorescente en los que el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente sobre un alelo H-2K^{d}, ratones transgénicos y métodos de su producción, células T de ratón aisladas, y métodos no terapéuticos de su uso.

Antecedentes de la invención

El sistema adaptativo de los vertebrados defiende a los hospedadores contra la infección. Las células T tienen el papel de organizador central de la respuesta inmunitaria reconociendo antígenos mediante los receptores de células T ("TCR"). La especificidad de una célula T depende de la secuencia de su TCR. El armazón genético de este receptor se crea durante el desarrollo de la célula T en el timo mediante el proceso de reorganización del ADN V(D)J, que transmite una especificidad única por el antígeno a cada TCR. El TCR tiene un papel esencial en la función, desarrollo y supervivencia de células T. Las lesiones genéticas que interfieren en la generación de los receptores antigénicos bloquean el desarrollo de células T y da como resultado inmunodeficiencias. Debido a la importancia de células T en la organización de la respuesta inmunitaria, es deseable ser capaces de generar células T que tengan una especificidad antigénica particular.

Una de las maneras de estudiar la respuesta inmunitaria frente a un virus o un autoantígeno, es mediante el uso de ratones transgénicos TCR (TCR-Tg) (Bluthmann et al., "T-cell-specific Deletion of T-cell Receptor Transgenes Allows Functional Rearrangement of Endogenous Alpha- and Beta-genes," *Nature* 334:156-9 (1988); Lafaille, "T-cell Receptor Transgenic Mice in the Study of Autoimmune Diseases," *Journal of Autoimmunity* 22:95-106 (2004)). Estos ratones se producen de manera que cada célula T del ratón exprese un único TCR, que reconoce un único antígeno. Se han producido al menos 30 ratones TCR-Tg diferentes. Los antígenos que reconocen las células T de los distintos ratones TCR-Tg son péptidos derivados de proteínas expresadas por un agente patógeno, tal como el virus de gripe, o un péptido derivado de una proteína propia que esté implicada en una enfermedad autoinmunitaria, tal como la proteína mielínica básica (MBP). Esto hace posible que las células T TCR-Tg se utilicen para el estudio de la respuesta inmunitaria frente a un agente patógeno o frente a un modelo de enfermedad autoinmunitaria.

El TCR de ratones específico de antígeno más comúnmente utilizado reconoce un epítopo de la ovoalbúmina (OVA) de pollo. Específicamente, los ratones OT-I y OT-II reconocen un epítopo de la OVA presentado por el MHC clase I y MHC clase II, respectivamente. Estos ratones se han utilizado para estudiar respuestas de células T y para modelos de enfermedad autoinmunitaria.

Aunque los ratones TCR-Tg son un recurso invaluable para el estudio de aspectos particulares de la inmunología, hay varias limitaciones clave para todos los modelos de TCR-Tg existentes que evitan su uso para tipos particulares de aplicaciones. Específicamente, ninguno de los ratones TCR-Tg se puede utilizar para estudiar la respuesta inmunitaria contra un antígeno que pueda visualizarse por citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, o creación de imágenes de células vivas.

La generación de una célula T de ratón específica de GFP (αGFP) afrontaría un déficit principal de las herramientas del inmunólogo proporcionando un modelo de células T específico de antígeno que se dirige a un indicador fluorescente que se utiliza comúnmente, fácilmente controlable. La proteína fluorescente verde ("GFP") es un modelo antigénico ideal ya que es intracelular, se puede detectar fácilmente, incluso con una resolución de una sola célula y mediante creación de imágenes de célula viva, y se han generado más de 1.000 ratones transgénicos diferentes en los que se expresa la GFP en tejidos específicos, tipos celulares, o estados celulares (Schmidt et al, "BAC Transgenic Mice and the GENSAT Database of Engineered Mouse Strains," *Cold Spring Harbor Protocols* (2013)). Además, hay docenas de líneas celulares de cáncer, virus y otros agentes patógenos que se han modificado para que expresen la GFP. La abundancia de reactivos basados en GFP y modelos animales, hace que el ratón αGFP sea relevante inmediatamente para las valoraciones de laboratorio haciendo que una amplia variedad de investigación intente entender la capacidad de presentación de antígeno de tipos celulares específicos a los virólogos que caracterizan las interacciones hospedador-agente patógeno.

La presente invención se dirige a superar estas y otras deficiencias en la técnica.

Siliciano et al (1986) *Cell,* 47(2): 161-171 se refiere a la detección mediante citometría de flujo y cromatografía de afinidad, de la unión de un antígeno nomina, o alfa-beta heterodímeros Ti sobre los clones de células T humanas restringidas al MHC específicas del 5-isotiocianato de fluoresceína (FL). El documento WO 91/18019 Al se refiere a receptores de células T de cadena sencilla solubles, secuencias de ácidos nucleicos, particularmente secuencias de ADN, que codifican el receptor de células T de cadena sencilla solubles, vectores de expresión que contienen las secuencias de ADN, y células hospedadoras que contienen los vectores de expresión. El documento EP 1852123 A2

se refiere a la inducción de una respuesta anérgica mediante inhibidores de NF-kB y la inhibición de la respuesta inmunitaria mediante la administración de un inhibidor de NF-kB. También se desvela en el documento EP 1852123 A2 vectores que codifican inductores e inhibidores de NF-kB, por ejemplo, vectores adenovíricos.

El documento US 2009/0217403 A1 se refiere a un método para la generación de una célula T que comprende un receptor de células T capaz de unirse específicamente a un antígeno de interés, que comprende: proporcionar una célula madre hematopoyética y/o una célula precursora de una célula T con una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos parte de un gen reordenado que codifica una cadena de TCR, o un equivalente funcional de la misma; y que permite la diferenciación de dicha célula madre y/o célula precursora y la generación de al menos una célula T derivada de dicha célula madre y/o cella precursora. Park et al (2011) *Trends in Biotechnology,* 29(11):550-557 se refiere al tratamiento del cáncer con células T modificadas genéticamente. En particular, Park et al. se refiere a: la modificación genética de los linfocitos que expresan receptores de células T (TCR) altamente activos o receptores antigénicos quiméricos (CAR) que se dirigen a varios antígenos tumorales que se expresan en pacientes de cáncer; el desarrollo de tecnología de transferencia genética de TCR y CAR, y la expansión de estas terapias en diferentes cánceres.

Sumario de la invención

La invención es como se describe en las reivindicaciones. Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un ratón transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en el que el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^{d} y en el que una célula T del ratón comprende el receptor T. También se desvela un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en el que la célula T del mamífero no humano comprende el receptor de células T.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una célula T aislada del ratón transgénico de la presente invención, en el que la célula T comprende un receptor de células T específico de una proteína fluorescente y en el que el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en el alelo H-2K^{d}. También se desvela una célula T aislada del mamífero no humano transgénico de la presente divulgación.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula T de ratón aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en el que el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^{d}. También se desvela una célula T aislada que comprende una construcción de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de un ratón transgénico. Este método implica la introducción de una construcción de expresión en un embrión de ratón para producir un embrión transgénico, comprendiendo dicha construcción de expresión un polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente en unión operativa con un promotor, en el que el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^{d}; el trasplante del embrión transgénico en un ratón seudogestante; permitir que el embrión transgénico se desarrolle a término; y el aislamiento de al menos una cría transgénica que contenga el polinucleótido. También se desvela un método de producción de un mamífero no humano transgénico. Este método implica la introducción de una construcción de expresión en un embrión de mamífero no humano para producir un embrión transgénico, comprendiendo dicha construcción de expresión un polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente en unión operativa con un promotor; el trasplante del embrión transgénico en un mamífero no humano seudogestante; permitir que el embrión transgénico se desarrolle a término; y el aislamiento de al menos una cría transgénica que contenga el polinucleótido.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de un ratón. Este método implica la provisión de una célula o núcleo de una célula somática de ratón que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente unido operativamente a un promotor, en el que el receptor de la célula T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^{d}; la inserción de la célula o núcleo de la célula somática de ratón en un oocito enucleado en condiciones adecuadas para la formación de una célula reconstituida; la activación de la célula reconstituida para formar un embrión; el cultivo del embrión hasta el estadio de desarrollo de más de 2 células; y la transferencia del embrión cultivado a un ratón hospedador de manera que el embrión se desarrolle en un feto quimérico capaz de crecer hasta convertirse en un ratón. También se desvela un método de producción de un mamífero no humano. Este método implica la provisión de una célula o núcleo de una célula somática de mamífero no humano que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente unido operativamente a un promotor; la inserción de la célula o núcleo de la célula somática de mamífero no humano en un oocito enucleado en condiciones adecuadas para la formación de una célula reconstituida; la activación de la célula reconstituida para formar un embrión; el cultivo del embrión hasta el estadio de desarrollo de más de 2 células; y la transferencia del embrión cultivado en un mamífero hospedador de manera que el embrión se desarrolle dando un feto quimérico capaz de

crecer hasta convertirse en un mamífero no humano.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un método no terapéutico de privación de las células de un ratón. Este método implica la provisión de un ratón que expresa una proteína fluorescente en uno o más tipos celulares y la introducción en el ratón de una célula T aislada que comprende una construcción de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de la proteína fluorescente, en el que el receptor de la célula T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^{d}, en el que la célula T aislada ataca el uno o más tipos celulares para la privación del uno o más tipos celulares en el ratón. También se desvela un método de privación de células en un mamífero no humano. Este método implica la provisión de un mamífero no humano que expresa una proteína diana en uno o más tipos celulares y la introducción en el mamífero no humano de una célula T aislada que comprende una construcción de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de la proteína diana, en el que la célula T aislada ataca el uno o más tipos celulares para la privación del uno o más tipos celulares en el mamífero no humano.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un método no terapéutico de caracterización de la respuesta de células T a un agente. Este método implica la provisión de un ratón transgénico de acuerdo con la presente invención; la introducción en el ratón transgénico de un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en una vacuna, un virus, un agente patógeno, una célula trasplantada, y una línea celular de cáncer, en el que el agente comprende una proteína fluorescente y/o una secuencia que codifica la proteína fluorescente; y el control de la interacción entre el receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente y el agente para caracterizar la respuesta de células T en el ratón transgénico. También se desvela un método de caracterización de una respuesta de células T a un agente. Este método implica la provisión de un mamífero no humano transgénico de acuerdo con la presente divulgación; la introducción en el mamífero no humano transgénico de un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en una vacuna, un virus, un agente patógeno, una célula trasplantada, y una línea celular de cáncer, en el que el agente comprende una proteína fluorescente y/o una secuencia que codifica la proteína fluorescente; y el control de la interacción entre el receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente y el agente para caracterizar la respuesta de células T en el mamífero no humano transgénico.

La presente invención supera las limitaciones de los ratones TCR-Tg existente y se dirige a un nuevo modelo de TCR específico de antígeno. Específicamente, se han generado ratones TCR específicos de GFP que reconocen la proteína fluorescente verde. En consecuencia, la presente invención es útil para la optimización de vacunas que se utilizan para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas y cánceres, o para la inducción de tolerancia inmunitaria. Únicamente, la presente invención permite el estudio de la respuesta de células T a la plétora de vacunas, virus y líneas celulares del cáncer que codifican GFP, y otras proteínas fluorescentes.

Además, la presente invención proporciona una manera para modelar las enfermedades autoinmunitarias en tejidos y órganos de una manera no posible previamente. Por ejemplo, la presente divulgación tiene la ventaja de los cientos de variedades disponibles de ratones que expresan GFP y otras proteínas fluorescentes específicamente en tipos celulares o tejidos particulares. Los mamíferos no humanos transgénicos de la presente divulgación se pueden utilizar para estudiar cómo responden las células T al antígeno presentado por estos tipos celulares.

Además, la presente invención hace posible caracterizar la respuesta de células T a diferentes canceres y metástasis utilizando las células tumorales que expresan GFP.

Además, la presente invención proporciona un nuevo método no terapéutico para la privación de células que se desee en los ratones para estudiar la función de las células. Las células T específicas de la GFP pueden infundirse ratones que expresen la GFP en un tipo celular particular, y estas células T eliminarán específicamente esas células. Privando estas células, este modelo proporciona un fenotipo de "pérdida de función" que se puede estudiar para entender el papel de las células equivalentes.

Además, la presente invención hace posible llevar a cabo análisis de creación de imágenes vivas y microscopía intravital de la destrucción mediada por células T específicas de antígeno de un tipo celular particular, incluyendo las células infectadas por virus.

El ratón transgénico de la presente invención es el primer ratón con TCR específico de antígeno en el que las células T reconocen un epítopo de una proteína fluorescente. El mamífero no humano transgénico de la presente invención se puede utilizar para el estudio de la respuesta inmunitaria a proteínas fluorescentes, y de esta aprovecha los cientos de ratones transgénicos de GFP (y otras proteínas fluorescentes), líneas celulares tumorales que expresan la GFP (y otras proteínas fluorescentes), y agentes patógenos que expresan GFP (y otras proteínas fluorescentes) para estudiar la respuesta inmunitaria en contextos no posibles previamente. En otra aplicación de la tecnología de la presente divulgación, los mamíferos no humanos transgénicos de la presente divulgación se pueden utilizar como método para privar tipos celulares raros en mamíferos no humanos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un par de gráficas que muestran la detección de las células T CD8+ específicas de GFP en ratones αGFP fundadores generados por transferencia nuclear celular somática ("SCNT"). Las células se recolectaron de los ganglios linfáticos de ratones αGFP fundadores. Las células se tiñeron en cuanto al CD8 y un pentámero anti-H-2K^d-GFP$_{200-208}$. La FACS representativa se muestra en los 14 fundadores. Nótese que son ratones fundadores y por lo tanto quiméricos.

La FIG. 2 es la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 1) de la cadena alfa del receptor de células T específica de GFP en el ratón. Los nucleótidos 1-476 de la SEQ ID NO: 1 son el dominio Trav7-4, los nucleótidos 479-537 de SEQ ID NO: 1 son el dominio traj30, y los nucleótidos 477-478 son la región hipervariable. Los nucleótidos 141-950 de SEQ ID NO: 1 son la región codificante.

La FIG. 3 es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una cadena alfa del receptor de células T específica de GFP en el ratón.

La FIG. 4 es la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 3) de una cadena beta del receptor de células T específica de GFP en el ratón. Los nucleótidos 1 -343 de SEQ ID NO: 3 son el dominio trbv2 (Vb4), los nucleótidos 354 -403 de SEQ ID NO: 3 son el dominio Trbj1.6, los nucleótidos 404 -924 de SEQ ID NO: 3 son el dominio Trbc1, y los nucleótidos 344.-353 son la región hipervariable. Los nucleótidos 1 -924 de SEQ ID NO: 3 son la región codificante.

Las FIG. 5A-B son las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de una cadena beta del receptor de células T específica de GFP en el ratón.

Las FIG. 6A-B muestran que la transferencia de células T αGFP destruyen rápidamente los esplenocitos que expresan GFP. Las células T de control CD8+ αGFP marcadas con eFluor670 se transfirieron en los ratones que expresaban GFP en un subconjunto de esplenocitos. Como se muestra en la FIG. 6A, después de 5 días, se analizó el bazo en cuanto a GFP por microscopía de fluorescencia (panel de la derecha) y mediante FACS (panel de la izquierda). La FIG. 6B muestra que se midió la proliferación de células T mediante un análisis FACS de la dilución del eFluor670. Nótese que solo proliferaban las células T αGFP con la transferencia adoptiva.

Las FIG. 7A-B muestran que la transferencia de células T CD8+ αGFP induce diabetes en ratones con el promotor GFP (MIP-GFP) de insulina de ratón. Se transfirieron 3 x 10^6 células T de ratones de tipo silvestre o ratones αGFP en ratones MIP-GFP en el escenario B10D2 (n = 4/grupo). En la FIG. 7A, se midieron los niveles de glucosa de la sangre antes de la inyección de células T y 6 días después de la inyección. Todos los ratones que recibieron las células T αGFP eran diabéticos basándose en que tenían niveles de glucosa > 250 mg/dl. En la FIG. 7B, después de 6 días, se recolectó el páncreas de los ratones, y se evaluó la presencia de células β mediante histología de rutina y microscopía de fluorescencia utilizando la GFP para valorar las células β. Los ratones también se tiñeron en las células T CD8+ y en los núcleos utilizando DAPI. Las imágenes son representativas de 4 ratones por grupo. En los ratones MIP-GFP que recibieron las células T GFP, se detectaron células positivas a la GFP en el páncreas.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en el que la célula T del mamífero no humano comprende el receptor de células T.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, el mamífero no humano transgénico de la presente divulgación es un roedor, tal como un ratón o una rata. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden incluir otras especies de mamífero. Por ejemplo, los procedimientos transgénicos se han utilizado satisfactoriamente en varios mamíferos no murinos, que incluyen ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, monos, chimpancés, hámsteres, conejos, vacas y cobayas (véase, por ejemplo, Kim et al., "Development of a Positive Method for Male Stem-cell Mediated Gene-transfer in Mouse and Pig," *Mol. Reprod. Dev.* 46(4): 515-526 (1997); Houdebine, "The Production of Pharmaceutical Proteins from the Milk of Transgenic Animals," *Reprod. Nutr. Dev.* 35(6):609-617 (1995); Petters, "Transgenic Livestock as Genetic Models of Human Disease," *Reprod. Fertil. Dev.* 6(5):643-645 (1994); Schnieke et al., "Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts," Science 278(5346):2130-2133 (1997); Amoah & Gelaye, "Biotechnology Advances in Goat Reproduction," *J. Animal Science* 75(2):578-585 (1997)).

Como se expone con más detalle *infra*, los mamíferos no humanos transgénicos de la presente divulgación se pueden producir mediante varios diferentes métodos incluyendo transfección, electroporación, microinyección, direccionamiento genético en células madre embrionarias, e infección retrovírica y vírica recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 4.736.866 de Leder et al.; la Patente de EE. UU. N.º 5.602.307 de Beaudet et al; Mullins et al, "Transgenesis in Nonmurine Species," *Hypertension* 22(4):630-633 (1993); Brenin et al., "Transgenic Technology: An Overview of Approaches Useful, in Surgical Research," *Surg. Oncol* 6(2)99-110 (1997); *Methods in Molecular Biology,* vol. 62: Recombinant Gene Expression Protocols, R. Tuan (ed.) Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1997); Patente de EE. UU. N.º 5.489.743 de Robinson et al; Patente de EE. UU. N.º 5.602.307 de Beaudet et al.; y Lois et al., "Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors," *Science* 295(5556):868-872 (2002).

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, el mamífero no humano transgénico de la presente divulgación comprende un genoma que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de

células T que es específico de una proteína fluorescente. En otras palabras, el mamífero no humano transgénico expresa, a través de su genoma, una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico (por ejemplo, específico de antígeno) de una proteína fluorescente. Por lo tanto, el mamífero no humano transgénico comprende linfocitos que expresan un receptor de células T deseado. El mamífero puede producirse de manera que sustancialmente todos los linfocitos expresen el receptor de células T específico de antígeno deseado. En consecuencia, el mamífero transgénico puede producirse mediante un método que comprende poner en contacto una célula madre embrionaria no humana con un sistema de suministro de polinucleótido que comprende un polinucleótido específico de antígeno que codifica el receptor de células T deseado específico de antígeno. En una realización, el sistema de suministro del polinucleótido comprende un vector retrovírico, tal como un vector lentivírico.

De manera alternativa, el mamífero no humano puede producirse de manera que solo una subpoblación de linfocitos exprese el receptor de células T deseado específico de antígeno. De acuerdo con esta realización de la presente divulgación, esta subpoblación de células tiene una única especificidad antigénica y no expresa ningún otro polipéptido específico de antígeno que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En particular, los linfocitos puede que no expresen ningún otro receptor de células T. Dichos mamíferos no humanos pueden producirse poniendo en contacto las células madre hematopoyéticas con un sistema de suministro de polinucleótido que comprende un polinucleótido específico de antígeno que codifica el polipéptido deseado específico de antígeno. Las células madre hematopoyéticas se transfieren entonces en un mamífero no humano donde maduran en linfocitos con una especificidad antigénica única.

Como se utiliza en el presente documento, el término "específico" como se utiliza con respecto a un receptor de células T es decir *específico* de una proteína fluorescente significa, de acuerdo con una realización, que el receptor de células T se une preferentemente a una proteína fluorescente con una afinidad de unión mayor que las interacciones de fondo entre las moléculas. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, "interacciones de fondo" son interacciones con una afinidad menor de una K_D de 10E-4 M. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente con una afinidad mayor de una K_D de aproximadamente 10E-5 M.

De acuerdo con otra realización, un receptor de células T que es *específico* de una proteína fluorescente el receptor de células T reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, y/o con mayor afinidad con una proteína fluorescente o célula que expresa la proteína fluorescente que a proteínas no fluorescentes o células que expresan proteínas no fluorescentes. Por ejemplo, un receptor de células T que se une específicamente a una proteína fluorescente se une a esa proteína fluorescente con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de lo que se une a proteínas no fluorescentes.

Los receptores de células T que son *específicos* de una proteína fluorescente pueden, de acuerdo con una realización, tener la capacidad de destruir una célula que exprese una proteína fluorescente. En otra realización, los receptores de células T que son *específicos* de una proteína fluorescente tienen la capacidad de destruir una célula que expresa una proteína fluorescente, y sigue careciendo de la capacidad de destruir una célula que exprese una proteína no fluorescente.

Un receptor de células T que es *específico* de una proteína fluorescente puede, de acuerdo con una realización, se une a la proteína fluorescente en un sitio de unión particular, o epítopo, de la proteína fluorescente como se describe en el presente documento.

En el mamífero no humano transgénico de la presente divulgación, el receptor de células T es específico de una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente amarilla. La proteína fluorescente puede ser una proteína de origen natural o una proteína modificada, tal como un derivado de las proteínas fluorescentes de origen natural. Las proteínas fluorescentes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, proteínas derivadas de *Aequorea* tal como GFP, proteína fluorescente verde aumentada ("eGFP"), y Proteína fluorescente amarilla ("YFP").

La proteína fluorescente verde es una proteína fluorescente natural producida por la medusa *Aequorea victoria*. Algunos restos de aminoácido de la proteína nativa forman espontáneamente un fluoróforo cuando se pliega el polipéptido en un cilindro de cadena beta 11 ensartado en una hélice alfa que recorre hacia arriba el eje del cilindro interno. Debido a que tolera la fusión en el extremo N y C con una amplia variedad de proteínas, se ha utilizado la GFP primariamente como un marcador proteico fluorescente, es decir, para producir proteínas quiméricas de GFP unida a otras proteínas donde funcione como un indicador para revelar, cuándo, dónde y cuánta proteína a la que se une está presente. Gracias a esta capacidad, se ha expresado en bacterias, levaduras, hongos mucilaginosos, *Drosophila*, pez cebra, y células de mamífero.

En la medusa de la que se aisló, la GFP está implicada en interacciones fisiológicas con la proteína bioluminiscente aecuorina y cambia su absorción de luz azul a la emisión de luz verde mediante una transferencia de energía. En la mayoría de las aplicaciones de la GFP esta configuración de componentes dobles no se recapitula, y la excitación de GFP o sus derivados se consigue mediante instrumentación óptica.

Las proteínas fluorescentes para las que el receptor de células T de mamífero no humano transgénico de la presente divulgación es específico incluyen las que contienen una o más de las siguientes modificaciones: permutación circular (Baird et al., "Circular Permutation and Receptor Insertion Within Green Fluorescent Proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11241-11246 (1999)), división (Zhang et al., "Combinatorial Marking of Cells and Organelles with Reconstituted Fluorescent Proteins," *Cell* 119:137-144 (2004)), aumento del plegamiento (Pedelacq et al, "Engineering and Characterization of a Superfolder Green Fluorescent Protein," *Nat. Biotechnol.* 24:79-88 (2006)), u otras modificaciones (Zhang et al, "Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:906-918 (2002)).

Ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes (y sus ácidos nucleicos codificantes) adecuados para la presente invención incluyen, sin limitación, los N.º de registro de GenBank AB195239, AY013821, AY013824, AY013825, AY013826, AY013827, AF435427, AF435428, AF435429, AF435430, AF435431, AF435433, DQ525025, X83959, X83960, X96418, BD136947, BD136948, BD136949, U73901, AF302837, AF183395, AF058694, U50963, L29345, M62653, y M62654.

En una realización, la proteína fluorescente es una proteína fluorescente que comprende el dominio de aminoácidos HYLSTQSAL (SEQ ID NO: 5).

En otra realización, la secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específica de una proteína fluorescente comprende la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: (FIG. 2), SEQ ID NO: 3 (FIG. 4), o una combinación de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de polinucleótido que se expone en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3 son a modo de ejemplo. También se pueden utilizar otras secuencias de polinucleótido que codifican un receptor de células T que es específico para una proteína fluorescentes. Por ejemplo, también se pueden utilizar secuencias de polinucleótido que son similares y codifican receptores de células T específicos de antígeno. Dichas secuencias pueden ser al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 % 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con la presente divulgación, cuando se utiliza una especie de mamífero no humano distinto del ratón, la secuencia de polinucleótido normalmente será al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 % 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica la secuencia codificante del receptor de células T nativo de esa especie.

Como apreciarán los expertos habituados en la técnica, dentro de cada gen de receptor de células T hay una "región C", que codifica un dominio constante del receptor. Esta región no se refiere directamente a la especificidad de una proteína fluorescente. Todos los demás dominios (regiones V, regiones J, región hipervariable) son variables y es su recombinación específica la que proporciona la especificidad para una proteína fluorescente. Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación, se pueden diseñar numerosas secuencias de polinucleótido para generar mamíferos no humanos transgénicos cuyo genoma comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en el que la célula T del mamífero no humano comprende el receptor de células T.

En otra realización, el receptor de células T específico de antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (FIG. 3), SEQ ID NO: 4 (FIG. 5A-B) o una combinación de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. Las secuencias de receptor de células T específico de antígeno de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 son a modo de ejemplo, y la presente divulgación no se limita a mamíferos no humanos transgénicos que contienen solo estas secuencias. Por ejemplo, también se pueden utilizar las secuencias de aminoácidos que son similares a la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. Dichas secuencias pueden ser al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 % 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. De nuevo, de acuerdo con la presente divulgación, cuando se utiliza una especie de mamífero no humano distinto del ratón, el receptor de células T específico de antígeno será normalmente al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 % 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica al receptor de células T nativo de esa especie.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, la secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T es específico de una proteína fluorescente cargada en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I o II.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una célula T aislada del mamífero no humano transgénico de la presente divulgación.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, la célula T aislada del mamífero no humano transgénico de la presente divulgación es una célula T purificada. Las células T aisladas, purificadas de los mamíferos no humanos transgénicos de la presente divulgación se puede obtener por varios métodos conocidos y utilizados por los expertos habituados en la técnica. En una realización, la célula T aislada está en forma purificada (por ejemplo, al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 % 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % pura).

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una célula T aislada que comprende una construcción de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente.

La introducción de una secuencia de polinucleótido (es decir, una molécula de ácido nucleico) que codifica un receptor de células T que es específico a una proteína fluorescente en un sistema de expresión de elección se puede llevar a cabo utilizando tecnología recombinante convencional. En general, esto implica la inserción de la secuencia de polinucleótido en un sistema de expresión al cual la molécula es heteróloga (es decir, no está presente normalmente). La introducción de un gen ajeno o nativo en particular en un hospedador mamífero no humano se facilita por la primera introducción de la secuencia genética en una construcción o vector de expresión adecuada. La "construcción" o "vector" se utiliza en el presente documento para significar cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que sea capaz de replicación cuando se asocia con elementos de control apropiados y que sea capaz de transferir secuencias genéticas entre las células. Por lo tanto, el término incluye los vectores de clonación y expresión, así como vectores víricos. La molécula de ácido nucleico heteróloga se inserta en la construcción o vector de expresión en el sentido de orientación apropiado (5'→3') y fase de lectura correcta. El vector contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de las secuencias codificantes del receptor de células T.

La Patente de EE. UU. N.º 4.237.224 de Cohen y Boyer describe la producción de sistemas de expresión en forma de plásmidos recombinantes utilizando la escisión enzimática y la unión con una ADN ligasa. Estos plásmidos recombinantes se introducen entonces por medio de transformación y se replica en cultivos unicelulares incluyendo organismos procariotas y células eucariotas cultivados en cultivos tisulares.

Los genes recombinantes también se pueden introducir en virus incluyendo virus vaccinia, adenovirus, y retrovirus, incluyendo lentivirus. Los virus recombinantes pueden generarse por transfección de plásmidos en células infectadas con virus.

Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes vectores víricos tales como el sistema de vector lambda gt11, gt WES.tB, Charon 4, y vectores plasmídicos tales como pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pKC37, pKClOl, SV40, pBluescript II SK+/- o KS+/- (véase el *Stratagene Cloning Systems* (1993) Catálogo de Stratagene, La Jolla, Calif.), pQE, pIH821, pGEX, serie pFastBac (Invitrogen), pET series (véase F. W. Studier et al., "Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes," *Gene Expression Technology,* 185 (1990)), y cualquier derivado de los mismos. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células mediante transformación, particularmente transducción, conjugación, movilización o electroporación. Las secuencias de ADN se clonan en el vector utilizando procedimientos de clonación convencionales en la técnica, como se describe en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, N.Y. (1989).

Se puede utilizar varios sistemas vector-hospedador para expresar la secuencia que codifica el receptor de células T en una célula. Primariamente, el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora que se utilice. Los sistemas vector-hospedador incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico, o ADN cosmídico; microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; sistemas celulares de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insecto infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); y células vegetales infectadas con bacterias. Los elementos de expresión de estos vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema vector-hospedador utilizado, se puede utilizar uno cualquiera de entre varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

Las señales genéticas diferentes y eventos de procesamiento controlan muchos niveles de la expresión genética (por ejemplo, transcripción de ADN y traducción de ARN mensajero ("ARNm")). La transcripción de ADN depende de la presencia de un promotor que ese una secuencia de ADN que dirige la unión de ARN polimerasa y de esta manera promueve la síntesis de ARNm. Las secuencias de ADN de promotores eucariotas se diferencias de las de los promotores procariotas. Además, los promotores eucariotas y las señales genéticas que los acompañan pueden no reconocerse o pueden no funcionar en un sistema procariota, y, adicionalmente, los promotores procariotas no se reconocen y no funcionan en células eucariotas.

De manera similar, la traducción de ARNm en procariotas depende de la presencia de señales procariotas apropiadas que se diferencian de las de eucariotas. La traducción eficaz de ARNm en procariotas necesita un sitio de unión al ribosoma llamado secuencia Shine-Dalgarno ("SD") en el ARNm. Esta secuencia es una secuencia de nucleótidos corta de ARNm que se localiza antes del codón de inicio, habitualmente AUG, que codifica la metionina del extremo amino de la proteína. Las secuencias SD son complementarias al extremo 3' del ARNr 16S (ARN ribosómico) y probablemente promueve la unión del ARNm a los ribosomas mediante duplicación con el ARNr para permitir el posicionamiento correcto del ribosoma. Para una revisión de maximización de la expresión genética véase Roberts y Lauer, *Methods in Enzymology* 68:473 (1979).

Los promotores varían en su "fuerza" (es decir, su capacidad para promover la transcripción). Con fines de expresar

un gen clonado, es deseable utilizar promotores fuertes con el fin de obtener un alto nivel de transcripción y, por lo tanto, expresión del gen. Dependiendo del sistema de célula hospedadora utilizado, se puede utilizar uno cualquiera de entre varios promotores adecuados. Por ejemplo, cuando la clonación es en *E. coli*, es pueden utilizar sus bacteriófagos, o plásmidos, promotores tales como el promotor PH, el promotor del fago T7, el promotor lac, promotor trp, promotor recA, promotor de ARN ribosómico, los promotores P_R y P_L del colifago lambda y otros, incluyendo, pero sin limitarse a, lacUV5, ompF, bla, lpp, y similares, para dirigir altos niveles de transcripción de segmentos de ADN adyacentes. Adicionalmente, se pueden utilizar un promotor híbrido trp-lacUV5 (tac) u otros promotores para *E. coli* producidos por ADN recombinante u otras técnicas de ADN sintético para proporcionar la transcripción del gen insertado.

Se pueden escoger cepas bacterianas de células hospedadoras y vectores de expresión que inhiban la acción del promotor a menos de que se induzca específicamente. En ciertos operones, la adición de inductores específicos es necesario para la transcripción eficaz del ADN insertado. Por ejemplo, el operón lac se induce por la adición de lactosa o IPTG (isopropiltio-beta-D-galactósido). Varios otros operones, tales como trp, por, etc., están bajo diferentes controles.

También se necesitan señales de inicio específicas para la transcripción y traducción genética eficaz en células procariotas. Estas señales de inicio de la transcripción y traducción pueden variar en cuanto a la "fuerza" según se mide por la cantidad de ARN mensajero específico del gen y la proteína sintetizada, respectivamente. El vector ADN de expresión, que contiene un promotor, también puede contener cualquier combinación de distintas señales de inicio "fuertes" de la transcripción y/o traducción. Por ejemplo, la traducción eficaz en *E. coli* necesita una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) aproximadamente de 7-9 bases a 5' del codón de inicio (ATG) para proporcionar un sitio de unión al ribosoma. Por lo tanto, se puede emplear cualquier combinación de SD-ATG que pueda ser utilizada por los ribosomas de la célula hospedadora. Dichas combinaciones incluyen, pero no se limitan a la combinación de SD-ATG del gen *cro* o el gen *N* del colifago lambda, o de los genes E, D, C, B o A de triptófano en *E. coli.* Adicionalmente, se puede utilizar cualquier combinación de SD-ATG producida por ADN recombinante u otras técnicas implican la incorporación de nucleótidos sintéticos.

Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado, se puede utilizar cualquier cantidad de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo los promotores constitutivos, inducibles y reprimibles, así como elementos promotores 5' mínimos.

El ácido nucleico que codifica un receptor de células T, una molécula promotora de elección, una región reguladora 3' adecuada, y si se desea, un gen indicado, se incorporan en un sistema de vector de expresión de elección para preparar una construcción de ácido nucleico utilizando procedimientos de clonación convencionales conocidos en la técnica, tal como se describe por Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001).

La molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente se inserta en un vector en la dirección en sentido (es decir, 5'→3'), de manera que la fase de lectura abierta se oriente apropiadamente para la expresión del receptor de células T codificado que es específico de una proteína fluorescente bajo el control de un promotor de elección. Los ácidos nucleicos únicos o múltiples se pueden ligar en un vector apropiado de esta manera, bajo el control de un promotor adecuado, para preparar una construcción de ácido nucleico.

Una vez que la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente se ha insertado en el vector de expresión, es fácil de incorporarse en una célula hospedadora. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células mediante transformación, particularmente transducción, conjugación, lipofección, fusión de protoplastos, movilización, bombardeo de partículas, o electroporación. Las secuencias de ADN se incorporan en la célula hospedadora utilizando procedimientos de clonación convencionales en la técnica, como se describe en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Segunda Edición, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, N.Y. (1989). Los hospedadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, bacterias, virus, hongos, células de mamífero no humano, células de insecto, células vegetales, y similares.

Normalmente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el cultivo selectivo solo de las células transformadas como suplemento del medio. El compuesto que se va a utilizar estará dictado por el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula hospedadora. Los genes adecuados son los que transmiten resistencia a la gentamicina, G418, higromicina, puromicina, estreptomicina, espectinomicina, tetraciclina, cloranfenicol, y similares. De manera similar, son adecuados los "genes indicadores" que codifican enzimas que proporcionan la producción de un compuesto identificable, u otros marcadores que indiquen la información relevante con respecto al resultado del suministro genético. Por ejemplo, también son apropiados distintos genes indicadores luminiscentes o fosforescentes, de manera que se pueda asegurar visualmente la presencia del gen heterólogo.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de producción de un mamífero no humano

transgénico. Este método implica la introducción de una construcción de expresión en un embrión de mamífero no humano para producir un embrión transgénico, comprendiendo dicha construcción de expresión un polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente en unión operativa con un promotor; el trasplante del embrión transgénico en un mamífero no humano seudogestante; permitir que el embrión transgénico se desarrolle a término; y el aislamiento de al menos una cría transgénica que contenga el polinucleótido.

En este método, una secuencia que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente se puede integrar en el genoma del mamífero no humano transgénico mediante cualquier método convencional bien conocido por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica para introducir el transgén en un animal para producir la línea fundadora de animales transgénicos (véase, por ejemplo, Hogan et al, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Hogan et al, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, 1994; y Patente de EE. UU. N.º 5.602.299 de Lazzarini; Patente de EE. UU. N.º 5.175.384 de Krimpenfort; Patente de EE. UU. N.º 6.066.778 de Ginsburg; y Patente de EE. UU. N.º 6.037.521 de Sato et al). Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, microinyección pronuclear (Patente de EE. UU. N.º 4.873.191 de Wagner et al.); transferencia genética mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148-6152 (1985)); direccionamiento genético en células madre embrionarias (Thompson et al, *Cell* 56:313-321 (1989)); electroporación de embriones (Lo et al, *Mol. Cell. Biol.* 3:1803-1814 (1983)); y transferencia genética mediada por esperma (Lavitrano et al, *Cell* 57:717-723 (1989)).

Por ejemplo, se pueden utilizar células embrionarias en distintos estadios de desarrollo para introducir transgenes para la producción de animales transgénicos. Se utilizan diferentes métodos dependiendo del estadio de desarrollo de la célula embrionaria. El zigoto es una buena diana para la microinyección, y los métodos de microinyección del zigoto son bien conocidos en la técnica (véase, la Patente de EE. UU. N.º 4.873.191 de Wagner et al). En el ratón, el pronúcleo del macho alcanza un tamaño de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro lo que permite la inyección reproducible de 1-2 picolitros (pl) de solución de ADN. El uso de zigotos como diana para la transferencia genética tiene la ventaja de que en la mayoría de los casos el ADN se incorporará en el genoma del hospedador antes de la primera escisión (Brinster et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442 (1985)). Como consecuencia, todas las células del animal no humano transgénico llevarán el transgén incorporado. Esto también se reflejará en general en la transmisión eficaz del transgén a las crías del fundador ya que un 50 % de las células germinales albergará el transgén.

Los animales transgénicos de la presente divulgación también se pueden generar mediante la introducción de vectores de direccionamiento en células madre embrionarias ("ES"). Las células ES se obtienen mediante cultivo de embriones pre-implantación *in vitro* en condiciones adecuadas (Evans et al., *Nature* 292:154-156 (1981); Bradley et al, *Nature* 309:255-258 (1984); Gossler et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069 (1986); y Robertson et al, *Nature* 322:445-448 (1986)). Los transgenes se pueden introducir eficazmente en las células ES mediante transfección de ADN utilizando varios métodos conocidos en la técnica que incluyen electroporación, coprecipitación en fosfato cálcico, fusión de protoplastos o esferoplastos, lipofección y transfección mediada por DEAE-dextrano. Los transgenes también se pueden introducir en las células ES mediante transducción mediada por retrovirus o mediante microinyección. Dichas células ES transfectadas pueden a continuación colonizar un embrión tras su introducción en el blastocele de un embrión en estadio de blastocisto y contribuye a la línea germinal del animal quimérico resultante (revisado en Jaenisch, *Science* 240:1468-1474 (1988)). Antes de la introducción de las células ES transfectadas en el blastocele, las células ES transfectadas se pueden someter a distintos protocolos de selección para enriquecer las células ES que integren el transgén si el transgén proporciona un medio para dicha selección. De manera alternativa, se puede utilizar una PCR para explorar las células ES que tengan integrado el transgén. Esta técnica obvia la necesidad de cultivar las células ES transfectadas en condiciones selectivas apropiadas antes de la transferencia al blastocele.

Además, también se puede utilizar la infección retrovírica para introducir transgenes en un mamífero no humano. El embrión no humano en desarrollo se puede cultivar *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retrovírica (Janenich, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 73:1260-1264 (1976)). El sistema de vector vírico que se utiliza para introducir el transgén normalmente es un retrovirus deficiente en replicación que lleva el transgén (Jahner et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6927-6931 (1985); Van der Putten et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148-6152 (1985)). La transfección se obtiene fácil y eficazmente cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células productoras de virus. De manera alternativa, se puede llevar la infección en un estadio más tardío. Los medios adicionales de utilización de vectores retrovíricos para crear animales transgénicos que se conocen en la técnica implican la microinyección de partículas retrovíricas o células tratadas con mitomicina C productoras de retrovirus en el espacio perivitelino de huevos fertilizados o embriones tempranos (véase, la Publicación PCT N.º WO 90/08832 de Onions).

La presente divulgación proporciona mamíferos no humanos transgénicos que llevan el transgén en todas sus células, así como animales que llevan el transgén en algunas, pero no en todas sus células, es decir, la expresión del transgén se controla mediante elementos promotores y/o amplificadores específicos de la célula situados corriente arriba del transgén. Las construcciones de expresión o clonación adecuadas para dirigir la expresión del

transgén en un mamífero no humano transgénico se conocen bien en la técnica. Otros componentes de la construcción de expresión incluyen un sitio de poliadenilación fuerte, sitios de endonucleasas de restricción apropiados, e intrones para asegurar que la transcripción se corta y empalma.

Como se ha expuesto *supra* en relación con la presente divulgación, el polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente se pueden insertar en cualquier mamífero no humano. En una realización de la presente divulgación, el animal es un roedor, por ejemplo, un ratón. Las estirpes de ratón adecuadas que se utilizan comúnmente en la generación de modelos transgénicos incluyen sin limitación, ratones atímicos CD-I®, ratones NU/NU, ratones atímicos BALB/C, ratones BALB/C, ratones NIH-III, ratones SCID®, ratones exogámicos SCID®, ratones SCID Beige, ratones C3H, ratones C57BL/6, ratones DBA/2, ratones FVB , ratones CB17, ratones 129, ratones SJL, ratones B6C3F1, ratones BDF1, ratones CDF1, ratones CB6F1, ratones CF-1, ratones Swiss Webster, ratones SKH1, ratones PGP, ratones y ratones B6SJL.

Los mamíferos transgénicos no humanos se seleccionan y evalúan para seleccionar los animales que tienen un fenotipo, por ejemplo, células T que tienen receptores de células T que sean específicos de una proteína fluorescente. La exploración inicial se puede llevar a cabo utilizando la detección fluorescente o, por ejemplo, un análisis de transferencia de Southern o técnicas de PCR para analizar las células animales para verificar que ha tenido lugar la integración del transgén. El nivel de expresión de ARNm del transgén en las células de los animales transgénicos también se puede evaluar utilizando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, detección de fluorescencia, análisis de transferencia de Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ*, y PCR de transcriptasa inversa (rt-PCR).

Para llevar a cabo este método de la presente divulgación, se trasplanta un embrión transgénico en un mamífero no humano seudogestante. El embrión es la mejor diana para la introducción de un transgén por microinyección. El uso de embriones como dianas para la transferencia genética tiene la ventaja principal de que en la mayoría de los casos el ADN inyectado se incorporará en el gen hospedador antes de la primera escisión (Brinster et al., "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Micro injecting Eggs," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:4438-4442 (1985)). Como consecuencia, todas las células del mamífero no humano transgénico llevarán el transgén incorporado. Esto también se reflejará en general en la transmisión eficaz del transgén a las crías del fundador ya que un 50 % de las células germinales albergará el transgén.

Un medio disponible para la producción de un mamífero no humano transgénico (por ejemplo, un ratón) es el siguiente: Se cruzan ratones hembra, y los huevos fertilizados se disecan de sus oviductos. Los huevos se almacenan en un medio apropiado tal como el medio M2 (Hogan et al, "Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual," *Cold Spring Harbor Laboratory* (1986)). Se purifica un ADN o ADNc del gen, minigén o un sustrato recombinatorio codificante (tal como plásmidos) por métodos bien conocidos en la técnica. Los promotores inducibles pueden fusionarse con la región codificante del ADN para proporcionar un medio experimental para regular la expresión del transgén. De manera alternativa, o adicionalmente, los elementos reguladores específicos del tejido se pueden fusionar con la región codificante para permitir la expresión específica de tejido del transgén. El ADN, en una solución tampón apropiada, se pone en una aguja de microinyección (que se puede hacer a partir de un tubo capilar utilizando una pipeta extractora), y el huevo que se va a inyectar se pone en una depresión de un portaobjetos. La aguja se inserta en el pronúcleo del huevo, y se inyecta la solución de ADN. El huevo inyectado se transfiere entonces al oviducto de un mamífero no humano seudogestante (por ejemplo, un ratón estimulado con las hormonas apropiadas para mantener la gestación, pero que no está gestante actualmente), donde progresa en el útero, se implanta, y se desarrolla a término. Esta microinyección de ADN pronuclear es un método clásico para la transferencia genética y se describe en Brem, *Transgenic Animals* pp. 745-832 (1993); y Hammer et al, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection," *Nature* 315:680-683 (1985). El método básico de la microinyección de ADN como se utiliza en los ratones se describe en Rulicke et al., "Germline Transformation of Mammals by Pronuclear Microinjection," *Experimental Physiology* 85:589-601 (2000). Sin embargo, son necesarias algunas modificaciones específicas de especie en la utilización de este método. Por ejemplo, en la recuperación de embriones, el procedimiento de microinyección y transferencia de los embriones inyectados a los receptores puede necesitar una modificación (Brem, *Transgenic Animals* pp. 745-832 (1993)). La microinyección de ADN no es el único método para la inserción de ADN en la célula huevo y se utiliza aquí solo con fines a modo de ejemplo.

La etapa de introducción de la construcción de expresión se puede llevar a cabo mediante varios métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a (i) microinyección de genes en el pronúcleo de huevos fertilizados; (ii) transferencia de ADN mediante retrovirus; (iii) inyección de células madre embrionarias y/o células germinales embrionarias, expuestas a un ADN ajeno, en la cavidad de los blastocistos; (iv) transferencia de ADN exógeno mediada por esperma durante la fertilización *in vitro*; (v) transferencia de ADN mediada por liposomas en las células y embriones; (vi) electroporación de ADN en espermas, huevos, o embriones; (vii) biolística; y (viii) transferencia nuclear con células somáticas o embrionarias, que se describen en Wheeler et al, "Transgenic Technology and Applications in Swine," *Theriogenology* 56:1345-1370 (2001); Wolf et al, "Transgenic Technology in Farm Animals -Progress and Perspectives," *Exp Physiol.* 85.6:615-625 (2000).

En una realización, la construcción de ácido nucleico se puede introducir en el embrión infectando el embrión con un virus que contiene la construcción de ácido nucleico. Se puede utilizar un retrovirus recombinante para suministrar

un transgén de interés a una célula, por ejemplo, un oocito o una célula embrionaria, o un embrión de una célula. El transgén y cualquiera de los elementos genéticos asociados se integran de esta manera en el genoma de la célula hospedadora como un provirus. Se puede dejar entonces que la célula se desarrolle en un animal transgénico. El embrión de mamífero no humano en desarrollo se puede cultivar *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Durante este periodo, los blastómeros pueden ser las dianas para la inyección retrovírica (Jaenich, "Germ Line Integration and Mendelian Transmission of the Exogenous Moloney Leukemia Virus," *Proc Nat'l Acad Sci USA* 73:1260-1264 (1976)). La infección eficaz de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (Hogan, et al, *Manipulating the Mouse Embryo* (1986)). El sistema de vector vírico que se utiliza para introducir el transgén normalmente es un retrovirus deficiente en replicación que lleva el transgén (Jahner et al., "Insertion of the Bacterial *gpt* Gene into the Germ Line of Mice by Retroviral Infection," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:6927-6931 (1985); Van der Putten et al, "Efficient Insertion of Genes into the Mouse Germ Line via Retroviral Vectors," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:6148-6152 (1985)). La transfección se obtiene fácil y eficazmente cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células productoras de virus (Van der Putten et al., "Efficient Insertion of Genes into the Mouse Germ Line via Retroviral Vectors," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:6148-6152 (1985); Stewart et al., "Expression of Retroviral Vectors in Transgenic Mice Obtained by Embryo Infection," *EMBO J.* 6:383-388 (1987)). De manera alternativa, se puede llevar la infección en un estadio más tardío. Se pueden inyectar virus o células productoras de virus en el blastocele (Jahner et al, "De *novo* Methylation and Expression of Retroviral Genomes during Mouse Embryogenesis," *Nature* 298:623-628 (1982)).

En otra realización, las construcciones de ácido nucleico se pueden introducir en el embrión introduciendo una célula madre embrionaria que contiene la construcción de ácido nucleico en el embrión. Se pueden utilizar células madre embrionarias ("ES") en distintos estadios de desarrollo para introducir transgenes. Se utilizan diferentes métodos dependiendo del estadio de desarrollo de la célula embrionaria. Las células ES se pueden obtener de embriones pre-implantación cultivados *in vitro* y fusionadas con embriones (Evans et al., "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos," *Nature* 292:154-156 (1981); Gossler et al., "Transgenesis by Means of Blastocyst-derived Embryonic Stem Cell Lines," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:9065-9069 (1986)). Los transgenes se pueden introducir eficazmente en las células ES mediante transfección de ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. De acuerdo con la presente divulgación, dichas células ES transformadas pueden combinarse a continuación con blastocistos de un mamífero no humano. Las células ES colonizan a continuación el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante (Jaenisch, "Transgenic Animals," *Science* 240:1468-1474 (1988)). Por ejemplo, un método que se puede utilizar es la inyección asistida por láser de células ES endogámicas o híbridas en embriones en estadio de ocho células (Poueymirou et al., "F0 Generation Mice Fully Derived from Gene-targeted Embryonic Stem Cells Allowing Immediate Phenotypic Analyses," *Nat. Biotech.* 25:91-99 (2007)). Este método produce eficazmente ratones de generación F0 que se derivan completamente de células ES y sanos, que presentan un 100 % de transmisión en la línea germinal y permite el análisis fenotípico inmediato, acelerando enormemente la asignación de la función genética.

Los animales que llevan el transgén se pueden seleccionar identificado los animales que llevan un gen indicador contenido en la construcción transgénica. Dicha identificación se puede llevar a cabo explorando una proteína expresada por el gen. Por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos de la proteína que se expresa. Los anticuerpos también se pueden marcar química o radioactivamente para facilitar la detección. La etapa de identificación también se puede llevar a cabo por exploración de un fenotipo transmitido por el gen (por ejemplo, fluorescencia). Dicha identificación se puede llevar a cabo adicionalmente mediante exploración directa del gen, el producto genético o una molécula de ARN producida por el gen utilizando técnicas de hibridación de ácido nucleico.

En una realización, el polinucleótido se expresa en al menos un precursor celular de una célula T.

En otra realización, el precursor celular es una célula madre.

En otra realización más, la célula T es una célula T auxiliar madura o una célula T citotóxica madura.

Para llevar a cabo este método de la presente invención, el embrión es un zigoto o un blastómero y la introducción del polinucleótido en el zigoto se lleva a cabo mediante microinyección y la introducción del polinucleótido en el blastómero es mediante infección retrovírica.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de producción de un mamífero no humano. Este método implica la provisión de una célula o núcleo de una célula somática de mamífero no humano que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente unido operativamente a un promotor; la inserción de la célula o núcleo de la célula somática de mamífero no humano en un oocito enucleado en condiciones adecuadas para la formación de una célula reconstituida; la activación de la célula reconstituida; el cultivo del embrión hasta el estadio de desarrollo de más de 2 células; y la transferencia del embrión cultivado en un mamífero hospedador de manera que el embrión se desarrolle en un feto quimérico capaz de crecer hasta convertirse en un mamífero no humano.

La transferencia nuclear somática para la generación de mamíferos no humanos transgénicos se conocen bien (véase, por ejemplo, Cibelli et al, "Bovine Chimeric Offspring Produced By Transgenic Embryonic Stem Cells

Generated From Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos," *Theriogenology* 49:236 (1998); Baguisi et al, "Production of Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer," *Nature Biotechnology* 17:456-461 (1999); Polejaeva et al, "New Advances In Somatic Cell Nuclear Transfer: Application In Transgenesis," *Theriogenology* 53:117-126 (2000)).

La presente divulgación también se refiere a un método no terapéutico la privación de células en un mamífero no humano. Este método implica la provisión de un mamífero no humano que expresa una proteína diana en uno o más tipos celulares y la introducción en el mamífero no humano de una célula T aislada que comprende una construcción de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de la proteína diana, en el que la célula T aislada ataca el uno o más tipos celulares para la privación del uno o más tipos celulares en el mamífero no humano.

Para llevar a cabo este método de la presente divulgación, la proteína diana es, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, una proteína fluorescente como se describe en el presente documento, y la secuencia de polinucleótidos que codifica un receptor de células T que es específico de antígeno para una proteína fluorescente.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, para llevar a cabo el método de este aspecto de la presente divulgación, el uno o más tipos celulares del mamífero no humano se privan aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un método no terapéutico de caracterización de la respuesta de células T frente a un agente. Este método implica la provisión de un mamífero no humano transgénico de acuerdo con la presente divulgación; la introducción en el mamífero no humano transgénico de un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en una vacuna, un virus, un agente patógeno, una célula trasplantada, y una línea celular de cáncer, en el que el agente comprende una proteína fluorescente y/o una secuencia que codifica la proteína fluorescente; y el control de la interacción entre el receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente y el agente para caracterizar la respuesta de células T en el mamífero no humano transgénico.

Al llevar a cabo este método de la presente divulgación, control de la interacción entre el receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente y el agente que se puede llevar a cabo detectando la localización y concentración de fluorescencia, o cambios en las localizaciones y/o concentraciones de fluorescencia. La fluorescencia se puede detectar mediante observación visual. De manera alternativa, la detección de fluorescencia se puede llevar a cabo con un espectrofotómetro, o un sistema microscópico o macroscópico acoplado a una cámara o tubo fotomultiplicador. Acoplado con la instrumentación apropiada, la lectura óptica puede seguir en tiempo real en sistemas en vivo para obtener la información espaciotemporal (creación de imágenes intracelulares funcionales).

Estos aspectos de la presente invención se ilustran adicionalmente mediante los ejemplos posteriormente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar las realizaciones de la presente invención, pero no como un medio para limitar su alcance.

Ejemplo 1 - Generación de un ratón con un receptor de células T específico de GFP (αGFP) restringido al MHC clase I

Para crear un ratón con un TCR específico de GFP, se utilizó una estrategia de transferencia nuclear de célula somática (SCNT). Se inmunizaron ratones BALB/c x C57BL/6 (B6CF1) con un vector de ADN que codifica la GFP. Al utilizar el cruce BALB/c x C57BL/6, era posible inducir células T específicas de GFP que reconocen la GFP en el alelo H-2K^d. El alelo H-2K^d permite el uso más diverso de un ratón con TCR específico de antígeno ya que los ratones BALB/c, ratones NOD, y ratones NOD/SCID todos tienen el alelo H-2K^d, y hay varias estirpes congénicas de los ratones C57BL/6 con el haplotipo H-2K^d, más extraordinariamente los ratones B10.D2 y ratones B6.D2. Esto significa que cualquier ratón C57BL/6, incluyendo los que expresan GFP se pueden cruzar con B10.D2 o ratones B6.D2 y toda la progenie F1 tendrá el alelo H-2K^d. El epítopo inmunodominante de la GFP presentado sobre H-2K^d es conocido ($GFP_{200-208}$) y esto permite la detección de células T específicas de GFP que se van a determinar por tinción tetramérica/pentamérica (FIG. 1).

Dos semanas después de la vacunación con GFP, se clasificaron las células T CD8+ + pentámero $GFP_{200-208}$-H-2K^d con FACS a partir del bazo hasta > 99 % de pureza. Se llevó a cabo la SCNT transfiriendo el núcleo de una célula T específica de GFP a un oocito enucleado. Las ESC que resultaban de la SCNT se expandieron, y se confirmó que las células llevaban el TCR reordenado. Las ESC TCR-GFP se inyectaron en los blastocitos, y se transfirieron los embriones a hembras seudogestantes. Nacieron quince crías fundadoras, mostrando todas ellas una evidencia clara de quimerismo basándose en el color del manto. Los análisis posteriores indicaban que, en cada ratón, al menos el 30 % de las células T específicas del pentámero $GFP_{200-208}$-H-2K^d (FIG. 1), y el análisis PCR reveló que el TCR reordenado eran Val-J30 y VpM-DI-J1.6-CI (Las FIG. 2-4 proporciona el ADNc y las secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa y beta).

Ejemplo 2 - Transferencia de células T αGFP en ratones que expresan GFP en el bazo induce la destrucción de esplenocitos GFP+

La capacidad de destrucción específica de GFP de las células T se caracterizó en los ratones αGFP. Las células T CD8+ se aislaron de los ratones αGFP o los ratones de control (B10D2), marcados con colorante eFluor670, y se transfirieron a ratones B10D2 normales, o ratones que expresan GFP en un pequeño número de esplenocitos. Los ratones se inmunizaron con GFP y tras 5 días, se recolectó el bazo y la frecuencia de células GFP+ se valoró mediante microscopía de fluorescencia y mediante FACS (FIG. 6A). En los ratones que recibieron las células T αGFP, las células GFP+ eran virtualmente indetectables indicando que las células T αGFP destruyeron los esplenocitos que expresaban GFP. De manera importante, el colorante eFluor670 se diluyó completamente en células T αGFP que se transfirieron en ratones que expresaban GFP (FIG. 6B), mientras que no había dilución cuando las células T αGFP se transferían a los ratones de tipo silvestre. Tampoco había dilución del colorante con las células T CD8+ transferidas en ratones que expresaban GFP. Por lo tanto, los datos demuestran que las células T αGFP proliferan en respuesta a la presentación de GFP y destruyen las células que expresan la GFP.

Ejemplo 3 - Transferencia de células T αGFP en ratones MIP-GFP induce la destrucción de las células β que expresan GFP y T1D

Se determinó a continuación si las células T αGFP se podrían utilizar para inducir la destrucción de células β y diabetes en ratones que expresan GFP específicamente en células β que producen insulina (ratones MIP-GFP). Las células T CD8+ se recolectaron de ratones αGFP o controles B10D2, se transfirieron 3 x 10^6 células T αGFP en los ratones MIP-GFP, y al día siguiente los ratones se inmunizaron contra la GFP. Sorprendentemente, dentro de 6 días, los 4 ratones inyectados con células T específicas de GFP tenían niveles de glucosa > 250 mg/dl, indicando una caída en el nivel de insulina (FIG. 7A). Por el contrario, los ratones MIP-GFP que recibieron las células T de control todos eran normoglucémicos en todas las determinaciones.

Los ratones se sacrificaron a los 6 días, y se evaluó la masa de células β valorando las células positivas a la GFP. En los ratones que recibieron las células T específicas de GFP y se vacunaron con GFP, no se encontraron células positivas a GFP. Mientras que en los ratones que recibieron las células T de control, no se veía ninguna infiltración de células T, y la frecuencia de islotes que expresaban la GFP era comparable a los ratones MIP-GFP no tratados (FIG. 7B). Estos resultados demuestran claramente que las células T αGFP pueden transferirse en ratones MIP-GFP, destruyen las células β que expresan GFP, e inducen diabetes. Esto representa un nuevo modelo inducible y específico de antígeno de T1D. A señalar, este es uno de los únicos modelos de T1D en el entorno C57BL/6 y el único modelo de diabetes en el que se puede visualizar el antígeno de islote diana.

Conclusión de los ejemplos 1-3

Se ha inventado el primer ratón con TCR específico de antígeno que reconoce un gen indicador utilizado comúnmente, la proteína fluorescente verde (GFP). Ya que su aplicación inicial como indicador en *C. elegans* (Chalfie et al., "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression, "*Science* 263:802-805 (1994)), la GFP ha encontrado su camino en miles de aplicaciones diferentes y modelos animales, y se ha convertido en una tecnología invaluable para los inmunólogos, biólogos tumorales, y virólogos (Chudakov et al., "Fluorescent Proteins and their Applications In Imaging Living Cells and Tissues", *Physiol. Rev.* 90:1103-1163 (2010)). Sin embargo, la GFP no se ha utilizado como modelo de antígeno inmunológico. Hay muchos tipos de estudio que se harán posibles mediante los ratones αGFP, que no eran concebibles previamente. A señalar particularmente, están: (1) la capacidad de visualizar el antígeno, y la eliminación de la células que contiene el antígeno, utilizando tecnologías de creación de imágenes de fluorescencia (citometría de flujo, microscopía, etc.); (2) la capacidad para utilizar reactivos de GFP existentes, que incluyen virus que expresan GFP y ratones GFP; (3) la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en virtualmente cualquier tipo celular para modelar las respuestas autoinmunitarias; (4) la capacidad para estudiar respuestas inmunitarias contra diferentes agentes patógenos que expresen GFP y agentes patógenos mutantes; y (5) la capacidad para visualizar el antígeno y marcar las células que presentan el antígeno para estudios de creación imágenes de células vivas o de las respuestas de células T específicas de antígeno.

Por ejemplo, una cuestión principal en inmunología es cómo interactúan las células T con una célula diana particular que está presentando su antígeno. Debido a que hay cientos de modelos de ratón que expresan GFP en diferentes tipos celulares (The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) vende más de 400 estirpes diferentes que expresan GFP), se pueden recolectar células T αGFP de los ratones, y transferirlas en uno de los ratones que expresan GFP, y determinar qué ocurre con las células T (por ejemplo, ¿se convierten en activadas? ¿Se han eliminado o están anérgicas?), y qué ocurre con las células (¿se han destruido?). El hecho de que las células diana expresen GFP hace que esto último sea particularmente fácil de evaluar. Con la capacidad para transferir células αGFP en muchos ratones diferentes, los inmunólogos serán capaces de encontrar células que promuevan tolerancia e inmunidad, desarrollar potencialmente vacunas que se dirigen a estas células para inducir inmunidad o tolerancia.

Además de estudiar las respuestas inmunitarias, también se propone que los ratones αGFP se pueden utilizar como

un medio para la eliminación específica de células para los estudios de pérdida de función. Es decir, las células T αGFP se pueden transferir en un ratón que exprese la GFP en un tipo celular particular en el que no se conoce o no se conoce completamente la función. Esto dará como resultado la destrucción de las células que expresan GFP, y se puede evaluar el fenotipo del ratón para determinar la consecuencia de la destrucción de las células particulares.

Todas las características descritas en el presente documento (incluyendo cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquiera de los métodos o procedimientos desvelados, se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto las combinaciones en las que al menos algunas de dichas características y/o etapas se excluyan mutuamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Icahn School of Medicine at Mount Sinai

<120> RECEPTORES DE CÉLULAS T QUE SON ESPECÍFICOS DE UNA PROTEÍNA FLUORESCENTE, ANIMALES TRANSGÉNICOS Y MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN, CÉLULAS T AISLADAS, Y MÉTODOS DE USO

<130> 29539.0501

<150> 61/877.120
<151> 12-09-2013

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1464
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 1

agatggtgga gagtcactgt tgtgattgct agcaaagctg ctttttatgt ttcctatagg 60

agatgtgaaa acttatgaac acaactatat gagtttagga ttgagaatct aaatccacag 120

tgaagaggga agaggagaga atgaaatcct tgagtgtttc actagtggtc ctgtggctcc 180

aggtaaactg cgtgaggagc cagcagaagg tgcagcagag cccagaatcc ctcagtgtcc 240

cagagggagg catggcctct ttcaactgca cttcaagtga tcgtaatttt cagtacttct 300

ggtggtacag acagcattct ggagaaggcc ccaaggcact gatgtcaatc ttctctgatg 360

gtgacaagaa agaaggcaga ttcacagctc acctcaataa ggccagcctg catgtttccc 420

tgcacatcag agactcccag cccagtgact ccgctctcta cttctgtgca gctagtcatg 480

acacaaatgc ttacaaagtc atctttggaa aagggacaca tcttcatgtt ctccctaaca 540

tccagaaccc agaacctgct gtgtaccagt taaaagatcc tcggtctcag gacagcaccc 600

tctgcctgtt caccgacttt gactcccaaa tcaatgtgcc gaaaaccatg gaatctggaa 660

cgttcatcac tgacaaaact gtgctggaca tgaaagctat ggattccaag agcaatgggg 720

ccattgcctg gagcaaccag acaagcttca cctgccaaga tatcttcaaa gagaccaacg 780

ccacctaccc cagttcagac gttccctgtg atgccacgtt gactgagaaa agctttgaaa 840

cagatatgaa cctaaacttt caaaacctgt cagttatggg actccgaatc ctcctgctga 900

aagtagccgg atttaacctg ctcatgacgc tgaggctgtg gtccagttga ggtctgcaag 960

actgacagag cctgactccc aagctccatc ctcctcaccc ctccgctcct tcttcaagcc 1020

aaaaggagcc ctcccacctc gtcaagacgg ctgtctgggg tctggttggc cctgattcac 1080

aatcccacct ggatctccca gatttgtgag gaaggttgct ggagagctaa gcactgctgc 1140

cgcacccact cagctccctc actgctgctg accattcaca aaaaacggca ggggcggggc 1200

ttctcctgga tctgaagacc cctcccccat ggcagactcc cctgtaaaat ctcttggaga 1260

atgttgtaaa aaaaatatcg gttgtttttt gttttttttt tttttgcggg tttatttttt 1320

taagcatcca tgaagaaatg catattactc tttcatcaag gtgtagaaat tatctcattg 1380

tctagaccct cctgctactg tgtgtattga gccacattgt atattattct gctgtccatg 1440

acatcattaa aggtgattca gaaa 1464

<210> 2
<211> 269
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

```
Met Lys Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Val Leu Trp Leu Gln Val Asn
1               5                  10                  15

Cys Val Arg Ser Gln Gln Lys Val Gln Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Val Pro Glu Gly Gly Met Ala Ser Phe Asn Cys Thr Ser Ser Asp Arg
        35                  40                  45

Asn Phe Gln Tyr Phe Trp Trp Tyr Arg Gln His Ser Gly Glu Gly Pro
    50                  55                  60

Lys Ala Leu Met Ser Ile Phe Ser Asp Gly Asp Lys Lys Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80

Phe Thr Ala His Leu Asn Lys Ala Ser Leu His Val Ser Leu His Ile
                85                  90                  95

Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ala Ser
            100                 105                 110

His Asp Thr Asn Ala Tyr Lys Val Ile Phe Gly Lys Gly Thr His Leu
        115                 120                 125

His Val Leu Pro Asn Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu
    130                 135                 140

Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe
145                 150                 155                 160

Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile
                165                 170                 175

Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn
```

```
            180                 185                 190

Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile
        195                 200                 205

Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp
    210                 215                 220

Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe
225                 230                 235                 240

Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
                245                 250                 255

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
            260                 265
```

<210> 3
<211> 924
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 3

```
atgggctcca ttttcctcag ttgcctggcc gtttgtctcc tggtggcagg tccagtcgac       60
ccgaaaatta tccagaaacc aaaatatctg gtggcagtca cagggagcga aaaaatcctg      120
atatgcgaac agtatctagg ccacaatgct atgtattggt atagacaaag tgctaagaag      180
cctctagagt tcatgttttc ctacagctat caaaaactta tggacaatca gactgcctca      240
agtcgcttcc aacctcaaag ttcaaagaaa aaccatttag accttcagat cacagctcta      300
aagcctgatg actcggccac atacttctgt gccagcagcc aaggggcagg gatctataat      360
tcgcccctct actttgcggc aggcacccgg ctcactgtga cagaggatct gagaaatgtg      420
actccaccca aggtctcctt gtttgagcca tcaaaagcag agattgcaaa caaacaaaag      480
gctaccctcg tgtgcttggc caggggcttc ttccctgacc acgtggagct gagctggtgg      540
gtgaatggca aggaggtcca cagtggggtc agcacggacc ctcaggccta caaggagagc      600
aattatagct actgcctgag cagccgcctg agggtctctg ctaccttctg gcacaatcct      660
cgcaaccact tccgctgcca agtgcagttc catgggcttt cagaggagga caagtggcca      720
gagggctcac ccaaacctgt cacacagaac atcagtgcag aggcctgggg ccgagcagac      780
tgtgggatta cctcagcatc ctatcaacaa ggggtcttgt ctgccaccat cctctatgag      840
atcctgctag ggaaagccac cctgtatgct gtgcttgtca gtacactggt ggtgatggct      900
atggtcaaaa gaaagaattc atga                                             924
```

<210> 4
<211> 307
<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

```
Met Gly Ser Ile Phe Leu Ser Cys Leu Ala Val Cys Leu Leu Val Ala
1               5                  10                  15

Gly Pro Val Asp Pro Lys Ile Ile Gln Lys Pro Lys Tyr Leu Val Ala
            20                  25                  30

Val Thr Gly Ser Glu Lys Ile Leu Ile Cys Glu Gln Tyr Leu Gly His
        35                  40                  45

Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Phe
    50                  55                  60

Met Phe Ser Tyr Ser Tyr Gln Lys Leu Met Asp Asn Gln Thr Ala Ser
65                  70                  75                  80

Ser Arg Phe Gln Pro Gln Ser Ser Lys Lys Asn His Leu Asp Leu Gln
                85                  90                  95

Ile Thr Ala Leu Lys Pro Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Ser
            100                 105                 110

Ser Gln Gly Ala Gly Ile Tyr Asn Ser Pro Leu Tyr Phe Ala Ala Gly
        115                 120                 125

Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys
    130                 135                 140

Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys
145                 150                 155                 160

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu
                165                 170                 175

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr
            180                 185                 190

Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe
    210                 215                 220

Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro
```

```
225                 230                 235                 240

Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp
                245                 250                 255

Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val
            260                 265                 270

Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu
        275                 280                 285

Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg
    290                 295                 300

Lys Asn Ser
305
```

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio de proteína fluorescente

<400> 5

```
His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
1               5
```

REIVINDICACIONES

1. Un ratón transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en donde el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^d y en donde una célula T del ratón comprende el receptor de células T.

2. El ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente amarilla o en el que la proteína fluorescente comprende la SEQ ID NO: 5.

3. El ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de polinucleótido comprende la secuencia de polinucleótido seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 y tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 3.

4. El ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el receptor de células T comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y tanto la SEQ ID NO: 2 como la SEQ ID NO: 4.

5. Una célula T aislada del ratón transgénico de la reivindicación 1, en el que la célula T comprende un receptor de células T específico de una proteína fluorescente y en el que el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^d.

6. Una célula T aislada de ratón que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en donde el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^d, y opcionalmente en donde la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente amarilla o en donde la proteína fluorescente comprende la SEQ ID NO: 5.

7. La célula T aislada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la secuencia de polinucleótido comprende la secuencia de polinucleótido seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 y tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 3.

8. La célula T aislada de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el receptor de células T comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y tanto la SEQ ID NO: 2 como la SEQ ID NO: 4.

9. Un método para producir un ratón transgénico, comprendiendo dicho método:

introducir una construcción de expresión en un embrión de ratón para producir un embrión transgénico, comprendiendo dicha construcción de expresión una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente unida operativamente a un promotor, en donde el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^d;
trasplantar el embrión transgénico en un ratón seudogestante;
permitir que el embrión transgénico se desarrolle a término; y
aislar al menos una cría transgénica que contenga el polinucleótido.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el polinucleótido se expresa en al menos una célula precursora de células T, opcionalmente en donde la célula precursora es una célula madre o en donde la célula T es una célula T citotóxica madura.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el embrión es un zigoto o un blastómero y dicha introducción del polinucleótido en el zigoto se lleva a cabo mediante microinyección y dicha introducción del polinucleótido en el blastómero es mediante infección retrovírica.

12. Un método de producción de un ratón, comprendiendo dicho método:

proporcionar una célula somática o un núcleo celular de ratón que comprenden una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente unida operativamente a un promotor, en donde el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en un alelo H-2K^d;
insertar la célula somática o el núcleo celular de ratón en un oocito enucleado en condiciones adecuadas para la formación de una célula reconstituida;
activar la célula reconstituida para formar un embrión;
cultivar el embrión hasta más del estadio de desarrollo de 2 células; y
transferir el embrión cultivado en un ratón hospedador de manera que el embrión se desarrolle dando un feto quimérico capaz de crecer hasta dar un ratón.

13. Un método no terapéutico de privación de células en un ratón, comprendiendo dicho método:

proporcionar un ratón que exprese una proteína fluorescente en uno o más tipos celulares e
introducir en el ratón una célula T aislada que comprende una construcción de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente, en donde el receptor de células T reconoce la proteína fluorescente en el alelo H-2K^{d}
en donde la célula T aislada ataca al uno o más tipos celulares para mermar el uno o más tipos celulares en el ratón.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente amarilla, opcionalmente en el que la proteína fluorescente comprende la SEQ ID NO: 5.

15. Un método no terapéutico de caracterización de una respuesta de células T frente a un agente, comprendiendo dicho método:

proporcionar un ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
introducir en el ratón transgénico un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en una vacuna, un virus, un agente patógeno, una célula trasplantada y una línea celular de cáncer, en donde el agente comprende una proteína fluorescente y/o una secuencia que codifica la proteína fluorescente; y
controlar la interacción entre el receptor de células T que es específico de una proteína fluorescente y el agente para caracterizar la respuesta de células T en el ratón transgénico.

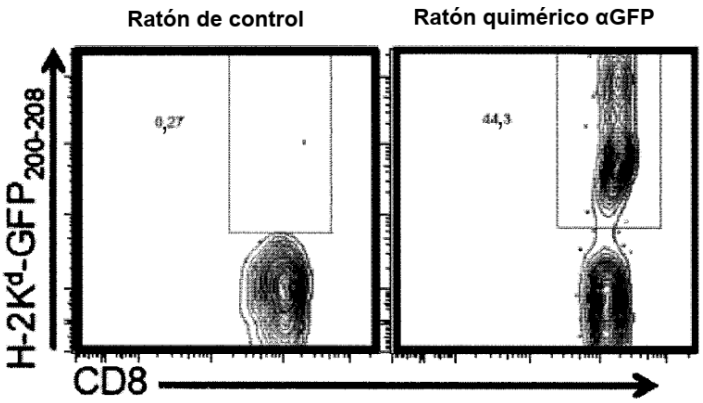
Ratón de control
Ratón quimérico αGFP
0,27
44,3
H-2Kd-GFP200-208
CD8

FIG. 1

```
agatggtgga gagtcactgt tgtgattgct agcaaagctg ctttttatgt ttcctatagg 60
agatgtgaaa acttatgaac acaactatat gagtttagga ttgagaatct aaatccacag 120
tgaagaggga agaggagaga atgaaatcct tgagtgtttc actagtggtc ctgtggctcc 180
aggtaaactg cgtgaggagc cagcagaagg tgcagcagag cccagaatcc ctcagtgtcc 240
cagagggagg catggcctct ttcaactgca cttcaagtga tcgtaatttt cagtacttct 300
ggtggtacag acagcattct ggagaaggcc ccaaggcact gatgtcaatc ttctctgatg 360
gtgacaagaa agaaggcaga ttcacagctc acctcaataa ggccagcctg catgtttccc 420
tgcacatcag agactcccag cccagtgact ccgctctcta cttctgtgca gctagtcatg 480
acacaaatgc ttacaaagtc atctttggaa aagggacaca tcttcatgtt ctccctaaca 540
tccagaaccc agaacctgct gtgtaccagt taaaagatcc tcggtctcag gacagcaccc 600
tctgcctgtt caccgacttt gactcccaaa tcaatgtgcc gaaaaccatg gaatctggaa 660
cgttcatcac tgacaaaact gtgctggaca tgaaagctat ggattccaag agcaatgggg 720
ccattgcctg gagcaaccag acaagcttca cctgccaaga tatcttcaaa gagaccaacg 780
ccacctaccc cagttcagac gttccctgtg atgccacgtt gactgagaaa agctttgaaa 840
cagatatgaa cctaaacttt caaaacctgt cagttatggg actccgaatc ctcctgctga 900
aagtagccgg atttaacctg ctcatgacgc tgaggctgtg gtccagttga ggtctgcaag 960
actgacagag cctgactccc aagctccatc ctcctcaccc ctccgctcct tcttcaagcc 1020
aaaaggagcc ctcccacctc gtcaagacgg ctgtctgggg tctggttggc cctgattcac 1080
aatcccacct ggatctccca gatttgtgag gaaggttgct ggagagctaa gcactgctgc 1140
cgcacccact cagctccctc actgctgctg accattcaca aaaaacggca ggggcggggc 1200
ttctcctgga tctgaagacc cctcccccat ggcagactcc cctgtaaaat ctcttggaga 1260
atgttgtaaa aaaaatatcg gttgtttttt gttttttttt tttttgcggg tttatttttt 1320
taagcatcca tgaagaaatg catattactc tttcatcaag gtgtagaaat tatctcattg 1380
tctagaccct cctgctactg tgtgtattga gccacattgt atattattct gctgtccatg 1440
acatcattaa aggtgattca gaaa                                       1464
```

FIG. 2

```
Met Lys Ser Leu Ser Val Ser Leu Val Val Leu Trp Leu Gln Val Asn
1               5                  10                  15
Cys Val Arg Ser Gln Gln Lys Val Gln Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser
            20                  25                  30
Val Pro Glu Gly Gly Met Ala Ser Phe Asn Cys Thr Ser Ser Asp Arg
        35                  40                  45
Asn Phe Gln Tyr Phe Trp Trp Tyr Arg Gln His Ser Gly Glu Gly Pro
    50                  55                  60
Lys Ala Leu Met Ser Ile Phe Ser Asp Gly Asp Lys Lys Glu Gly Arg
65                  70                  75                  80
Phe Thr Ala His Leu Asn Lys Ala Ser Leu His Val Ser Leu His Ile
                85                  90                  95
Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ala Ser
            100                 105                 110
His Asp Thr Asn Ala Tyr Lys Val Ile Phe Gly Lys Gly Thr His Leu
        115                 120                 125
His Val Leu Pro Asn Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu
    130                 135                 140
Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe
145                 150                 155                 160
Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile
                165                 170                 175
Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn
            180                 185                 190
Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile
        195                 200                 205
Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp
    210                 215                 220
Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe
225                 230                 235                 240
Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
                245                 250                 255
Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
            260                 265
```

FIG. 3

```
atgggctcca ttttcctcag ttgcctggcc gtttgtctcc tggtggcagg tccagtcgac 60
ccgaaaatta tccagaaacc aaaatatctg gtggcagtca cagggagcga aaaaatcctg 120
atatgcgaac agtatctagg ccacaatgct atgtattggt atagacaaag tgctaagaag 180
cctctagagt tcatgttttc ctacagctat caaaaactta tggacaatca gactgcctca 240
agtcgcttcc aacctcaaag ttcaaagaaa aaccatttag accttcagat cacagctcta 300
aagcctgatg actcggccac atacttctgt gccagcagcc aaggggcagg gatctataat 360
tcgcccctct actttgcggc aggcacccgg ctcactgtga cagaggatct gagaaatgtg 420
actccaccca aggtctcctt gtttgagcca tcaaaagcag agattgcaaa caaacaaaag 480
gctaccctcg tgtgcttggc caggggcttc ttccctgacc acgtggagct gagctggtgg 540
gtgaatggca aggaggtcca cagtggggtc agcacggacc ctcaggccta caaggagagc 600
aattatagct actgcctgag cagccgcctg agggtctctg ctaccttctg gcacaatcct 660
cgcaaccact tccgctgcca agtgcagttc catgggcttt cagaggagga caagtggcca 720
gagggctcac ccaaacctgt cacacagaac atcagtgcag aggcctgggg ccgagcagac 780
tgtgggatta cctcagcatc ctatcaacaa ggggtcttgt ctgccaccat cctctatgag 840
atcctgctag ggaaagccac cctgtatgct gtgcttgtca gtacactggt ggtgatggct 900
atggtcaaaa gaaagaattc atga                                        924
```

FIG. 4

```
Met Gly Ser Ile Phe Leu Ser Cys Leu Ala Val Cys Leu Leu Val Ala
1               5                  10                  15
Gly Pro Val Asp Pro Lys Ile Ile Gln Lys Pro Lys Tyr Leu Val Ala
            20                  25                  30
Val Thr Gly Ser Glu Lys Ile Leu Ile Cys Glu Gln Tyr Leu Gly His
        35                  40                  45
Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Phe
    50                  55                  60
Met Phe Ser Tyr Ser Tyr Gln Lys Leu Met Asp Asn Gln Thr Ala Ser
65                  70                  75                  80
Ser Arg Phe Gln Pro Gln Ser Ser Lys Lys Asn His Leu Asp Leu Gln
                85                  90                  95
Ile Thr Ala Leu Lys Pro Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Gln Gly Ala Gly Ile Tyr Asn Ser Pro Leu Tyr Phe Ala Ala Gly
        115                 120                 125
Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys
    130                 135                 140
Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys
145                 150                 155                 160
Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu
                165                 170                 175
Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr
            180                 185                 190
Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser
        195                 200                 205
Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe
    210                 215                 220
Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro
225                 230                 235                 240
Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp
                245                 250                 255
```

FIG. 5A

```
Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val
            260                 265                 270
Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu
        275                 280                 285
Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg
    290                 295                 300
Lys Asn Ser
305
```

FIG. 5B

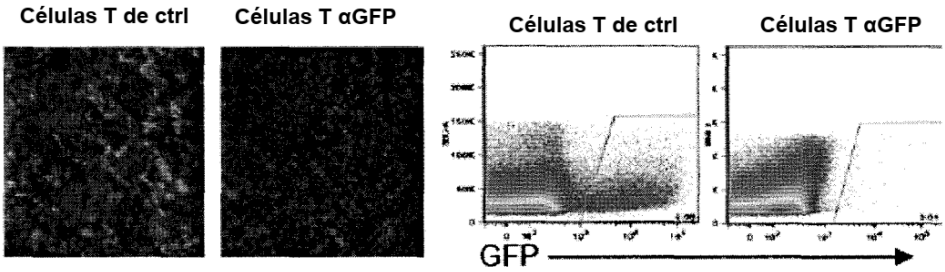

FIG. 6A

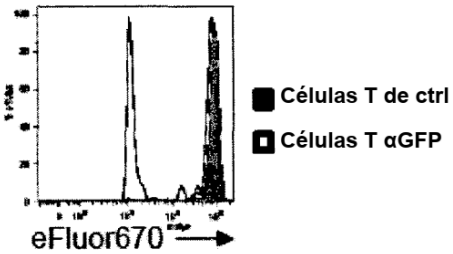

FIG. 6B

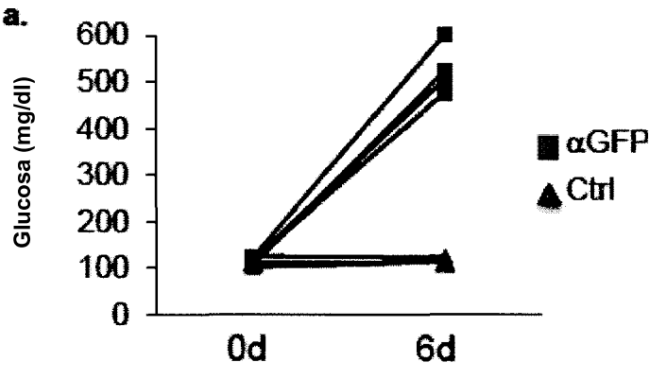
a.
Glucosa (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
0d
6d
αGFP
Ctrl

FIG. 7A

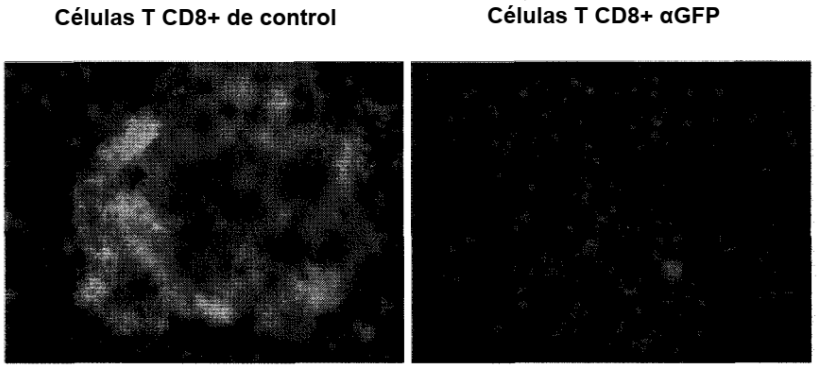
Células T CD8+ de control
Células T CD8+ αGFP

FIG. 7B