

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 688**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09010043 .9**
96 Fecha de presentación: **13.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **2110669**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.2009**

54 Título: **MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALO-ANTÍGENOS Y SU UTILIZACIÓN PARA LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER Y PARA EL TRASPLANTE.**

30 Prioridad:
13.06.2002 EP 02013423

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**Strittmatter, Wolfgang;
Moll, Heidrun y
Scharm, Burkhard**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 370 688 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la identificación de alo-antígenos y su utilización para la terapia contra el cáncer y para el trasplante.

Campo de la invención

5 La presente invención hace referencia a un nuevo concepto con respecto a la amplia definición de alo-antígenos que impulsan el efecto injerto contra tumor (ICT) y/o la enfermedad injerto contra huésped (EICH). El nuevo método para la identificación de alo-antígenos, que hasta ahora ha sido un problema técnico no resuelto, exige nuevas estrategias en inmunoterapia.

10 Dado que el análisis de proteínas de unión a HLA ahora puede realizarse con alo-antígenos para los cuales se conoce la secuencia de aminoácidos correspondiente, la presente invención también permite la separación de linfocitos T reactivos-reactivos que sólo reconocen células tumorales de aquellas que median la EICH. Los antígenos definidos con la nueva tecnología son especialmente útiles para el diagnóstico y vacunación en casos de cáncer y enfermedades relacionadas con trasplantes.

Antecedentes de la invención

15 Se conoce en el arte que una gran parte de tumores expresan niveles elevados de auto-proteína a veces alterada, que pueden verse como dianas potenciales para respuestas inmunes. También se ha mostrado que el brazo celular del sistema inmune (linfocitos T) es capaz de reconocer células cancerígenas en modelos experimentales y en sujetos humanos, sin embargo los tumores crecen de manera progresiva.

20 Una hipótesis para explicar esta paradoja es que los linfocitos T no funcionan de manera adecuada en el huésped que tiene el tumor. La otra alternativa es la capacidad de los tumores de reducir la maquinaria que presenta antígenos, volviéndose, de este modo, invisibles para los linfocitos T. Por lo tanto, sigue sin conocerse si la proteína sobreexpresada o alterada puede estimular linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) reactivos a tumores y contribuir a la inmunovigilancia del crecimiento de tumores. Además, la mayoría de las proteínas tumorales son proteínas de expresión ubicua y son propensas a mediar en la delección de CTL específicos del repertorio de linfocitos T autólogos. Los linfocitos T autorreactivos normalmente sufren delección en una etapa inmadura de su desarrollo mediante apoptosis inducida por antígenos o selección negativa. Además de antígenos, la selección negativa puede modularse mediante diferentes conjuntos de señales co-estimuladoras derivadas de (APC) (MacKinnon et al., Br. J. Haematol. 2000, 110: 12-17), lo cual conduce a la formulación de un sistema inmune que es tolerante hacia los antígenos propios. A pesar de aquellos hallazgos desfavorables, hay un enorme interés y expectativas en que la vacunación contra tumores podría ser efectiva y permitir que los tratamientos superen las deficiencias de los enfoques terapéuticos actuales.

35 La quimioterapia en combinación con radioterapia y el trasplante de médula ósea (o TMO) se ha explorado durante los últimos 20-30 años para algunos trastornos metabólicos y hematopoyéticos, y se resultó evidente que el efecto terapéutico es causado sólo parcialmente por la erradicación de las células de leucemia utilizando quimioterapia de alta dosis e irradiación. Numerosas observaciones clínicas proporcionan evidencia convincente de que, además, las respuestas inmunes (linfocitos T del donante) contribuyen sustancialmente a la eliminación de células cancerígenas residuales, y especialmente al posterior éxito a largo plazo de las terapias basadas en TMO. En retrospectiva, la estrategia terapéutica estándar en TMO sobrestimó el potencial anti-cancerígeno de incluso dosis muy altas de quimioterapia y radioterapia, y subestimó la eficacia de la inmunoterapia mediada por linfocitos de donante alogénicos derivados de TMO.

40 Los éxitos clínicos observados después del tratamiento de trastornos hematopoyéticos (leucemia) con trasplantes alogénicos de médula ósea (TMO alogénico) han conseguido satisfacer en gran medida los aspectos fundamentales de una inmunoterapia curativa.

45 El término alogénico se utiliza para describir una situación en la cual el donante y el receptor son individuos diferentes, comparado con el término singénico en el cual el donante y el receptor son gemelos idénticos y tienen un tipo de tejido idéntico dado que su carga genética es la misma. Los trasplantes autólogos se derivan de un individuo que más tarde en el proceso recibe sus propias células. Sin embargo, estrictamente, esto no es trasplante ya que no existen barreras inmunológicas en el trasplante.

50 Existen dos tipos de donantes alogénicos: familiares, habitualmente donantes hermanos, y no emparentados, que habitualmente se encuentran entre un acervo genético muy grande de voluntarios y que coinciden con un tipo de tejido que es igual al del paciente.

El trasplante alogénico, ya sea de un donante emparentado o no emparentado, difiere del trasplante singénico o autólogo en cuanto a que existe potencial para el rechazo inmune de las células madre donadas por parte del receptor (efecto huésped contra injerto) y la reacción inmune por parte de las células inmunes del donante contra los tejidos del receptor (enfermedad injerto contra huésped).

El rechazo inmune habitualmente se previene mediante el tratamiento intensivo del receptor antes del trasplante (condicionamiento) para suprimir el sistema inmune. Los esquemas de condicionamiento varían según el centro de trasplante y la malignidad implicada. Por ejemplo, en el tratamiento de leucemia, el paciente se somete a condicionamiento mieloablativo que comprende una combinación de ciclofosfamida en altas dosis e irradiación corporal total antes del TMO. Después del trasplante la reacción inmune se combate mediante fármacos inmunosupresores, incluyendo metotrexato, hormonas glucocorticoides (esteroides), ciclosporina o una microemulsión de la misma (Neoral®), tacrolimus (Prograf®) y micofenolato mofetil (Cellcept®), por un período de tiempo limitado para prevenir ataques agudos y lesiones de los tejidos del paciente. Las mejoras de los cuidados paliativos además de la inmunosupresión controlada han reducido la toxicidad del condicionamiento y la reacción inmune pos-TMO de manera sustancial. Sin embargo, siguen produciéndose complicaciones graves en la orofaringe, tracto intestinal, hígado, pulmón, piel, riñón, tracto urinario y sistema nervioso y, por lo tanto, el TMO alogénico se limita a pacientes más jóvenes y en óptimo estado de salud.

En el arte, generalmente se acepta que los cánceres hematológicos no siempre pueden erradicarse mediante altas dosis de condicionamiento de quimioterapia-radiación solamente, sino que además necesitan TMO alogénico. Por lo tanto, las terapias convencionales basadas en TMO alogénico se han convertido en un procedimiento estándar para el tratamiento de muchas enfermedades malignas hematológicas humanas y proporcionan el punto de referencia para todas las inmunoterapias - la posibilidad de una "cura".

Los donantes para trasplantes TMO alogénicos se seleccionan según su expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés): los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés). Los tipos de HLA están genéticamente determinados. Por lo tanto, cada individuo hereda el tipo de HLA de sus padres. Hay tres genes principales en un grupo que parecen ser particularmente importantes en los trasplantes. HLA-A, HLA-B y HLA-DR. Cada individuo tiene dos copias de cada uno de los genes en el grupo de HLA. Además, muchas versiones alélicas corresponden a cada uno de los genes de HLA.

Para obtener una compatibilidad ideal de 6 de 6, dos personas deben tener los mismos alelos en cada uno de sus dos genes HLA-A, HLAB y HLA-DR y hay una posibilidad de 1 entre 200 de que un padre o madre y su hijo sean HLA compatibles.

Cuando un familiar HLA compatible no se encuentra disponible, y hay tiempo para realizar una búsqueda, habitualmente se considera un donante no emparentado. La posibilidad de que 2 individuos no emparentados sean compatibles para los 6 genes HLA es de 1 entre un millón. Debido al polimorfismo del sistema HLA, el origen étnico y la edad media en el momento del diagnóstico, los trasplantes de donantes emparentados HLA compatibles están disponibles actualmente para un 15-60% de los pacientes diagnosticados recientemente. Los donantes alternativos incluyen familiares con pequeños grados de incompatibilidad y voluntarios no emparentados HLA compatibles. La probabilidad de encontrar donantes no emparentados apropiados, compatibles o parcialmente incompatibles, se ha incrementado con el desarrollo de una red de registros que ahora contiene más de 4,7 millones de donantes en todo el mundo, y con el acceso a otras fuentes tales como sangre del cordón umbilical.

Un trasplante de médula ósea consiste principalmente en células madre hematopoyéticas que pueden obtenerse de la médula ósea, sangre o sangre del cordón umbilical. Las células madre hematopoyéticas habitualmente se aspiran de la médula ósea. Un procedimiento alternativo implica un tratamiento de 3 a 5 días de los donantes con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) para movilizar las células madre y células progenitoras de la médula a la sangre. Las células apropiadas se recogen del donante mediante leucaféresis.

La sangre contenida en la placenta y el cordón umbilical de recién nacidos, está surgiendo como una nueva fuente de células madre. La sangre del cordón contiene cantidades considerables de células madre; tiene ventajas sobre el TMO o el trasplante de células madre de sangre adulta para ciertos pacientes y puede considerarse si no está disponible un donante no emparentado compatible de células madre de médula. Una ventaja de la utilización de sangre del cordón umbilical es que no necesita ser perfectamente compatible con el receptor.

Los pacientes pre-condicionados como se describe con anterioridad reciben la preparación de células madres y de dos a cinco semanas después del trasplante, el injerto de células donadas se hace patente por la aparición de leucocitos normales en la sangre del paciente. Los eritrocitos y las plaquetas son transfundidos de manera periódica hasta que la función de la médula sea restaurada por las células madre trasplantadas. El tiempo para la recuperación hematopoyética es más corto con células madre de la sangre que con células de médula ósea. Algunas de las nuevas células inmunes quiméricas reconocen el huésped como foráneo y van a producir un efecto injerto contra leucemia, que de aquí en adelante se denomina actividad injerto contra tumor (ICT), que habitualmente es acompañada por la enfermedad injerto contra huésped (EICH). La reacción EICH ocurre cuando las células inmunes del donante, en especial los linfocitos T, reconocen que las células huésped son distintas a las propias.

La EICH inducida por TMO alogénico es una función inmune muy relacionada con ICT que puede ocurrir poco después de que las células trasplantadas comienzan a aparecer en el receptor. Ambos tipos de respuestas inmunes son mediadas por linfocitos T que reconocen células que no son genéticamente idénticas, y esto podría explicar el hallazgo histórico de que los trasplantes entre gemelos idénticos son menos exitosos que aquellos entre hermanos compatibles en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) (Gale et al., Ann. Intern. Med. 1994, 120: 646-

652). En el caso del trasplante de células madre, las células del donante inspeccionan con cuidado las células del tejido del receptor para detectar signos de diferencias y las ataca si encuentran variaciones considerables. En la fase inicial después del trasplante, por ejemplo, las células que presentan antígenos residuales derivadas del paciente están presentes, y serán escaneadas por los linfocitos T derivados del donante para detectar diferencias basadas en genes polimórficos. Una respuesta citotóxica se iniciará si los linfocitos T donados reconocen las células huésped que presentan antígenos foráneos, que son básicamente todas las células inmunes. Si la respuesta de los linfocitos T se vuelve una EICH drástica o un ICT beneficioso se determina por el hecho de que se presentan diferencias genéticamente manifiestas, ya sea en el contexto de células que pertenecen a tejidos u órganos cancerígenos o, peor, que son parte de órganos no enfermos esenciales tales como la piel, articulaciones, pulmones, hígado o riñón. Según la importancia del órgano afectado, la EICH varía en gravedad de un pequeño salpullido a enfermedades potencialmente letales. El TMO alogénico en general sigue siendo un enfoque un tanto crudo, con una morbilidad y mortalidad asociadas al trasplante considerables. Una compilación reciente de informes indican que el riesgo de muerte es del 20 al 41% y, a pesar de la disponibilidad de fármacos inmunosupresores potentes, hasta un 70% de los pacientes tratados padecen EICH. La amplia identificación de alo-antígenos que son responsables de un proceso que promueve enfermedades y la definición de alo-antígenos que son útiles para la opción de luchar contra las enfermedades es, por lo tanto, el aspecto central de la presente invención.

Sin embargo, la inmunoterapia en base al TMO ofrece a hasta un 70% de los pacientes supervivencia libre de leucemia después del trasplante (Clift et al. Haematol. 1997, 10: 319-336).

Sin embargo, más del 60% de los pacientes que padecen LMC no reciben TMO alogénico debido al estado de la enfermedad, edad avanzada o falta de un donante apropiado.

El TMO y/o trasplante de células madre son opciones de tratamiento aceptables para la leucemia mieloide aguda (LMA) en remisión completa inicial o posterior, recidiva inicial de LMA o fallo en la inducción, leucemia linfoblástica aguda (LLA) en remisión completa inicial o posterior, recidiva inicial de LLA o fallo en la inducción, LMC, mielodisplasia, anemia aplásica, recidiva sensible y recidiva resistente de la enfermedad de Hodgkin, recidiva sensible y recidiva resistente del linfoma agresivo, y linfoma de bajo grado.

La reacción de injerto contra huésped se produce cuando las células inmunes del donante, en especial los linfocitos T, detectan que las células huésped son diferentes a las propias. Las diferencias pueden incluir un amplio espectro de proteínas que no son detectadas por la tipificación de HLA, o puede haber pequeñas diferencias en el tipo de HLA que permiten el trasplante pero no sin que se produzca la reacción. Las diferencias reflejan un polimorfismo más limitado en codones individuales de las correspondientes moléculas HLA fuera de los codones utilizados para la tipificación de HLA y la compatibilidad. Se conoce que, a excepción de los gemelos idénticos, existirá cierta incompatibilidad aunque la prueba de HLA indique suficiente similitud para permitir un trasplante exitoso. Los métodos de tipificación de HLA sólo cubren polimorfismos que se han detectado como importantes de manera empírica. Con la creciente información proveniente de la secuenciación de HLA, continuamente se descubren nuevas variantes alélicas que en parte pueden ser reconocidas como foráneas. Las variaciones también son evidentes cuando el donante y el receptor son de distinto sexo. En resumen, la gravedad de las reacciones inmunes tales como EICH depende del tipo y grado de diferencias de proteínas definidas de manera molecular entre el paciente y el donante que se presentan en las células del paciente.

La actividad de ICT se ha estudiado mejor en pacientes que padecen LMC, donde el reconocimiento y erradicación de células tumorales residuales realizado por las células inmunes del donante (CTL) parece ser esencial para la inducción de una remisión molecular de larga duración. Otros conocimientos sobre el mecanismo de la regulación inmune en LMC se han obtenido mediante la observación de que hay un elevado riesgo de recidiva después de la depleción de linfocitos T de los injertos. El riesgo de recidiva también se ve incrementado en la ausencia de EICH (Goldman et al., Ann. Intern. Med. 1988, 108: 806-814; Horowitz et al., Blood 1990, 75: 555-562). Además, el TMO singénico de un gemelo idéntico es mucho menos efectivo que el TMO de hermanos compatibles. Juntos, estos hallazgos indican que el reconocimiento de linfocitos T de células tumorales es un pre-requisito esencial del efecto terapéutico.

Cuando reaparece la enfermedad después de un trasplante aparentemente exitoso, la remisión completa puede lograrse mediante la eliminación de fármacos inmunosupresores o, de modo más impresionante, mediante la infusión de linfocitos T adicionales del donante. Por lo tanto, el efecto ICT asociado con TMO alogénico representa la evidencia más concluyente de que el sistema inmune puede curar el cáncer en humanos y debe enfatizarse que el potente efecto anti-leucemia es generado por linfocitos T citotóxicos transferidos al receptor.

Los linfocitos T del donante destruyen las células de leucemia recurrentes mediante el efecto ICT, y, probablemente, los linfocitos T de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ en el alo-injerto contribuyen a este fenómeno. Los linfocitos T CD4⁺ a menudo tienen una función coadyuvante para las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos o células y están restringidos por MHC Clase II. Los linfocitos T CD8⁺ a menudo tienen una función citotóxica y habitualmente están restringidos por MHC Clase I. Los antígenos relevantes (antígenos expresados por tumores, la antígenos de histocompatibilidad del receptor, o ambos) aún no han sido identificados y la presente invención tiene como objeto identificar y definir los antígenos implicados.

Es relevante que los injertos con depleción de linfocitos T están asociados con un mayor riesgo de recidiva en la LMC (Goldman et al., Ann. Intern. Med. 1988, 108: 806-814; Horowitz et al., Blood 1990, 75: 555-562). Como se describe con anterioridad, los efectos anti-leucemia pueden generarse por TMO alogénico, cuando se realiza infusión de linfocitos del donante (DLI, por sus siglas en inglés). En este marco, la DLI puede restablecer la remisión molecular durable en hasta el 70% de los casos. Sin embargo, la DLI también puede asociarse con toxicidad considerable causada por las respuestas injerto contra huésped, que con frecuencia acompañan un efecto injerto contra leucemia, con una mortalidad importante por aplasia medular y/o EICH sistémica que se producen en entre 50 y 90% de los casos (S. MacKinnon, Br. J. Haematol. 2000, 110: 12-17).

Para superar las desventajas asociadas con la toxicidad del protocolo TMO alogénico "tradicional", se ha sugerido un modelo de condicionamiento que comprende la inmunosupresión con micofenolato mofetil (Cellcept®) y ciclosporina en combinación con irradiación en todo el cuerpo en dosis bajas en un nivel tóxico mínimo. Sin embargo, debido al condicionamiento menos riguroso, se ha observado una respuesta injerto contra huésped pronunciada. La depleción de linfocitos T del trasplante antes de la infusión puede prevenir la EICH en esta situación. Un tipo modificado del procedimiento de trasplante, a veces llamado "minitrasplante", está desarrollado actualmente en base a estas observaciones. Los peligros del rechazo al injerto y una tasa de recidiva más alta pueden evitarse manteniendo sólo una parte de los linfocitos T en el injerto. La selección positiva de células CD34⁺ de preparaciones de sangre periférica proporciona una reducción de aproximadamente 1000 veces de linfocitos T. Estas células CD34⁺ purificadas que contienen células madre pluripotentes y comprometidas son apropiadas para el trasplante alogénico. En la LMC, la administración de dosis gradualmente mayores de linfocitos T se ha utilizado para sortear de manera parcial el problema de la EICH (MacKinnon et al., Blood 1995, 86: 1261-1268) y para incrementar el efecto ICT al mismo tiempo.

En resumen, el futuro de los enfoques de alo-injerto comprenderá minitrasplantes con depleción de linfocitos T en combinación con una inmunosupresión moderada pos-injerto para controlar el rechazo al injerto y la EICH. Se espera que esto reduzca de manera drástica las toxicidades agudas de los procedimientos de alo-injertos y, por lo tanto, pueda realizarse un TMO alogénico en pacientes antes no elegibles, en gran medida en un marco de pacientes externos. Se espera que este futuro desarrollo produzca estrategias en base a inmunoterapia alogénica para el tratamiento de una variedad de enfermedades malignas humanas.

La mayoría de las actividades de investigación relacionadas con la discriminación inmunológica entre elementos propios y ajenos se han enfocado en las moléculas MHC altamente polimórficas, en particular moléculas HLA en humanos y antígenos H-2 en ratones. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en la mayoría de los casos de TMO, el donante se ha seleccionado por el criterio de que su tipo de HLA es muy o perfectamente compatible con el HLA del receptor. En los donantes HLA compatibles, se ha supuesto que el origen de la EICH y el ICT está relacionado con moléculas polimórficas diferentes al HLA. Investigaciones recientes que tratan de descifrar el origen molecular de las respuestas inmunes EICH y ICT en el TMO han aprovechado las reacciones específicas producidas por linfocitos T, donde los CTL reconocen los péptidos derivados de antígenos presentados por el HLA Clase I del receptor. Estos linfocitos T se han aislado y utilizado para identificar alo-antígenos. Resulta que las disparidades en antígenos polimórficos que no sean HLA entre el donante y el receptor parecen ser relevantes para el desarrollo de ICT y EICH impulsados por linfocitos T. Por lo tanto, la clave para comprender la respuesta inmune de EICH y el ICT es comprender qué antígenos están implicados. La investigación en el campo de las respuestas inmunes ha considerado los aspectos mencionados con anterioridad y apunta a la identificación de otras moléculas importantes: los antígenos de histocompatibilidad "menor" (mHAg). La gran cantidad de estas proteínas altamente diversas en combinación con la función biológica complicada y diversa de los antígenos ha frustrado intentos de una caracterización completa hasta ahora.

Por definición, los mHAg son capaces de provocar una respuesta inmune (Lewalle et al, Br. J. Haematol. 1996, 92: 587-594) y se presentan al sistema inmune de linfocitos T como péptidos unidos a moléculas HLA específicas. Por lo tanto, sólo los linfocitos T pueden reconocerlos, y se sospecha que los mHAg cumplen un rol importante en la inducción de reactividad de CTL, contra leucemia y auto-antígenos después del TMO alogénico. Desafortunadamente, la mayoría de los pocos mHAg que han sido identificados hasta ahora no son específicos a la leucemia y también son expresados por tejidos normales. La expresión de tejido relativo de los mHAg conocidos no ha sido determinada, debido a la falta de reactivos disponibles. Sin embargo, los análisis funcionales que utilizan CTL sugieren que muchos mHAg tienen una distribución restringida a tejido y, por lo tanto, sólo ciertos tejidos pueden estar en riesgo de rechazo. También es de interés la observación de que, en TMO, la imagen clínica de EICH inducida por mHAg se asemeja a varias enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico y esclerodermia, lo cual sugiere que los síntomas de la EICH crónica son similares a los autoinmunes.

Por definición, los mHAg se codifican fuera de la región HLA del cromosoma humano 6, pero, sin embargo, son capaces de provocar una respuesta inmune importante. A pesar del hecho de que el mecanismo de EICH no ha sido completamente explicado todavía, se reconoce que los CTL derivados de donante específicos para los mHAg de pacientes cumplen un rol importante en la reacción citotóxica impulsada por linfocitos T contra órganos diana importantes (incluyendo la piel, intestinos, hígado, pulmones y articulaciones) y la manifestación resultante de la EICH que en casos graves puede ser fatal. Mientras que el mecanismo de la EICH parece estar razonablemente bien investigado, el rol de los mHAg en la inducción de ICT está menos definido. Esto puede deberse al hecho de que sólo muy pocos antígenos del espectro de mHAg completo se han identificado y analizado y que las tecnologías

disponibles hoy carecen de un método efectivo para reconocer los antígenos de manera integral. Por otra parte los antígenos son un pre-requisito para aislar y caracterizar los clones de CTL responsables de mediar en un efecto curativo o adverso. Por lo tanto, el enfoque TMO curativo sigue siendo una disciplina empírica con respecto a la especificidad de la respuesta inmune implicada. El paciente y quienes realizan el trasplante a menudo sólo se enfocan en el resultado de la terapia, que funciona razonablemente bien para la mayoría de los pacientes, como se indicó con anterioridad.

En humanos, aunque complejos en su identidad, los mHAg asociados con la inducción de la EICH han sido sugeridos, pero su cantidad total y complejidad siguen siendo desconocidas. Los experimentos genéticos realizados en ratones indicaban muchos mHAg, pero sólo se han identificado pocos genes. En humanos, los clones de linfocitos T reactivos con mHAg específicos, combinados con análisis de ligamiento genético, se han aplicado para la identificación de dos loci diferentes en un solo paciente, en donde cada locus codifica un antígeno presentado a un clon de linfocito T por HLA-B7. La técnica ha sido sugerida para una enumeración aproximada de la cantidad de mHAg en humanos que son capaces de suscitar una respuesta de linfocitos T in vivo. Aún no queda claro si estas respuestas de linfocitos T se correlacionan con la EICH clínica. (Gubarev et al., Exp. Hematol. 1998, 10: 976-81).

Para obtener un panorama completo de qué características califican una proteína para ser nominada como un mHAg humano, es útil complementar la información disponible del sistema humano con datos recogidos del sistema de ratón donde se han identificado mHAg adicionales en el pasado. Los homólogos humanos de estas proteínas resultaron ser reconocidos por las CTL alo-reativas humanas y esto también es así en ratones. Por lo tanto, cada vez más mHAg (Tabla 1A y B) se han identificado como dianas de una respuesta, por ejemplo, mediante la utilización de clones de CTL aislados que se han derivado de pacientes que padecen EICH. Con la ayuda de los clones ha sido posible analizar los componentes péptidos (péptidos de unión a HLA) derivados de los mHAg correspondientes y los clones de linfocitos T específicos implicados en su reconocimiento.

El modelo de explante de piel humana es un enfoque que ha sido sugerido como un indicador preciso de EICH aguda y puede ser útil para detectar disparidades de mHAg adicionales. El modelo ha sido utilizado para predecir el resultado de EICH en el 77% de los casos. Otros análisis, tales como análisis de frecuencia de precursores de CTL y linfocitos T coadyuvantes reactivos al huésped, ayudaron a predecir la ocurrencia de la EICH aguda después del TMO entre hermanos con HLA idénticos (Dickinson, Transplantation 1998, 66: 857-63).

El análisis de repertorios de la región variable de cadena alfa de receptor de linfocitos T y la región variable de cadena beta de receptor de linfocitos T reveló que la utilización de receptores de linfocitos T fue sesgada en un período temprano (6-7 semanas) después del TMO, lo cual sugiere que los linfocitos T se han expandido en respuesta a antígenos alogénicos, tales como mHAg, y que repertorios alterados se normalizan finalmente mediante la regeneración de linfocitos T por medio de una vía timo-dependiente en los niños (Matsutani et al., Br. J. Haematol. 2000, 109: 759-769).

Uno de los mHAg identificados de manera más temprana fue el antígeno H-Y codificado por el gen SMCY (Meadows et al., Immunity 1997, 6: 273-281; Wang et al., Science 1995, 269: 1588-1590) que cumple un rol en la espermatogénesis. Los antígenos H-Y pueden llevar al rechazo de injertos de órganos y médula ósea de hombre HLA compatible en receptores mujeres, y a una incidencia más alta de EICH en injertos de mujer a hombre, en particular si la donante mujer ha estado embarazada previamente. Mientras tanto, los genes DFFRY (Vogt et al., Blood 2000, 95: 1100-1105) y UTY han sido identificados como fuentes de antígenos H-Y (WO 97/05168, WO0077046).

Los antígenos que inducen EICH, a saber la familia de proteínas HA-1, HA-2, H-4, H-5 y H-8 han sido identificados a través de un estudio retrospectivo en receptores con EICH aguda (Mutis et al., Nat. Med. 1999, 5: 839-842).

El antígeno HA-1 fue identificado con la ayuda de CTL restringidos a HLA-A*0201 y caracterizado químicamente como un nonapéptido derivado de un alelo del gen KIAA0223. En el nivel de ADNc, el locus HA-1 tiene dos alelos, HA-1H y HA-1R, que se diferencian en dos nucleótidos, lo cual produce una sustitución de un aminoácido (den Haan et al., Science 1998, 279: 1054-1057; Arostequi et al., Tissue Antigens 2000, 56: 69-76). El aislamiento y secuenciación de ADN cósmido que codifica la secuencia de péptidos HA-1 reveló que los alelos HA-1 son codificados por dos exones y que ambos conjuntos contienen secuencias intrónicas. La tipificación de ADN genómico con dos conjuntos cebadores diferentes, que consisten en cebadores alelo-específicos y un cebador común, reveló tres familias que consisten en 24 individuos HLA-A*0201-positivos que se correlacionaban en todos los casos con la clasificación de mHAg por los CTL y por RT-PCR. En el futuro, el eventual genotipado de los alelos HAA-1 podría ayudar a mejorar la selección de donantes e identificar receptores HLA-A*0201-positivos con un mayor riesgo de EICH inducida por HA-1 (Wilke et al., Tissue-Antigens 1998, 52: 312-317; WO9905313). El antígeno HA-2 humano es un péptido nonámero que se une a HLA derivado de una miosina clase I (Goulmy et al., US 5770201).

Se ha detectado que la expresión de mHAg HA-1 y HA-2 se restringe principalmente a tejidos hematopoyéticos, incluyendo células de leucemia y precursores de células de leucemia (Mutis et al., Blood 1999, 93, 2336-2341). No se expresan en fibroblastos, queratinocitos ni células del hígado. Esto puede explicar por qué CTL específicos para

mHAGs HA-1 y HA-2 median en la destrucción restringida a HLAA* 0201 de células hematopoyéticas derivadas de donantes.

El HB-1 se describió como otro mHAg que inducía la reactividad de CTL derivados del donante en un paciente con LLA de células B (LLA-B) tratado mediante TMO HLA-compatible. El péptido EEKRGSLHVW codificado por el gen HB-1 fue reconocido por el CTL en asociación con HLA-B44 (Dolstra et al., J. Exp. Med. 1999, 189: 301-308). Un análisis más detallado reveló que un polimorfismo en el gen HB-1 genera un intercambio de un aminoácido de His a Tyr en la posición 8 dentro del péptido. Esta sustitución de aminoácido fue fundamental para el reconocimiento por parte de CTL específicas de HB-1. Se ha propuesto que la expresión restringida del antígeno HB-1 polimórfico mediante células LLA-B y la habilidad de generar CTL específicos para HB-1 in vitro utilizando células dendríticas cargadas con péptidos puede proporcionar la oportunidad de dirigirse específicamente al sistema inmunológico a las células LLA-B sin el riesgo de evocar la EICH.

Otro antígeno que se ha correlacionado con la EICH es el CD31. La secuenciación directa de diversos ADNc de CD31 reveló la presencia de un cambio de un aminoácido en la posición 125 de la proteína. No se ha mostrado otro polimorfismo aparte de estos dos alelos (Behar et al., N. Engl. J. Med. 1996, 334: 286-291). Los epítomos presentados por HLA correspondientes se correlacionan bien con los cambios de un aminoácido reconocidos por los CTL.

Los descubrimientos descritos con anterioridad con HA-1, HA-2 y los otros mHAGs sugieren que linfocitos T específicos podrían atacar de manera selectiva células tumorales in vivo y discriminar entre mHAGs expresados por células madres hematopoyéticas y fibroblastos, destruyendo sólo a las primeras. Es interesante señalar que la remisión completa se podría inducir en un paciente tratado con linfocitos T de donante transformados en 'reactivos a la leucemia' in vitro (Falkenburg et al., Blood 1999, 94: 1201-1208). Sin embargo, la base molecular para la discriminación entre los antígenos que inducen EICH y ICT siguen siendo desconocida y no existe en la actualidad un enfoque directo que permita la identificación de péptidos de unión al HLA derivados de mHAg y su correlación con proteínas cuya estructura bioquímica sea conocida. Además, poco se conoce acerca de la función de las proteínas o el número de proteínas que deberían ser consideradas como mHAg. Mediante el estudio de la frecuencia de las mutaciones del gen mHAg y el número de las diferencias de mHAg entre cepas de ratones se ha estimado que el número total de mHAg podría encontrarse entre 430 y 720 genes. Sin embargo, hay que reconocer que algunos de estos estudios se han realizados con modelos de rechazo de injertos de piel que son extremadamente sensibles debido a la presentación de péptidos mHAg en células dendríticas de piel. Las células dendríticas derivadas a partir de otros órganos tales como el sistema hematopoyético podrían presentar antígenos de forma diferente, por lo tanto esto resultaría en un número mucho menor de mHAg. Las estimaciones en base a este tipo de enfoques han dado números que se encuentran en el rango de 80 proteínas diferentes.

En un estudio dirigido a la identificación de antígenos diana para la respuesta ICT a las células de leucemia, Clave et al. (J. Immunother. 1999, 22: 1-6) detectó el polimorfismo de la proteinasa 3, una proteína granular primaria sobreexpresada en la leucemia mieloide. El estudio se llevó a cabo en 10 pacientes con enfermedades hematológicas y sus donantes de médula con HLA idéntico. La enzima se expresa en células de linaje mieloide pero se sobreexpresa en la leucemia mieloide, incluyendo la LMC (Molldrem et al., Blood 1997, 90: 2529-2534; Dengler et al., Brit. J. Haematol. 1995, 89: 250-257), y CTL específicos para PR1, un péptido derivado de la proteinasa 3, células de LMC eficientemente lisadas (Molldrem et al., Blood 1997 90: 2529-2534). Se han detectado CTL específicos de PR1 circulantes en una serie de pacientes de LMC, incluyendo aquellos que han sido tratados mediante TMO alogénico, y su presencia se correlaciona con un buen pronóstico (Molldrem et al., Nat. Med. 2000, 6: 1018-1023). Mediante el ensayo del polimorfismo de conformación de hebra única con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de la secuenciación directa de los productos de la PCR, se han descubierto siete polimorfismos de nucleótido simple. Uno de ellos codifica para una isoleucina o bien una valina en la posición 119 de la secuencia de aminoácidos. Se demostró que los péptidos que abarcan el sitio polimórfico, en los aminoácidos 115-124, se unen in vitro a la molécula de HLA-A2. Se analizaron 23 pacientes con HLA-A2 con leucemia mieloide y sus donantes con HLA idéntico para detectar polimorfismo. No se encontró recidiva en el grupo de 4 pacientes evaluables que poseían al menos un alelo que estaba ausente en su donante, mientras que 7 de los 15 pacientes evaluables restantes sufrieron recidiva. Estos datos apoyan la posibilidad de que las respuestas de linfocitos T a las diferencias alélicas de la proteinasa 3 pudieran ser utilizadas como una base para el diseño de una terapia adoptiva de linfocitos T específicos para la leucemia en la leucemia mieloide crónica y aguda.

En resumen, los enfoques actuales para la identificación de nuevas proteínas candidatas mHAg se basan principalmente en la identificación de péptidos con elución de HLA y/o CTL aislados asociados principalmente a la EICH y sólo ocasionalmente se han definido estos antígenos a través de las proteínas correspondientes.

En la Tabla 1A se proporciona una lista de mHAg recogidos de la literatura para ratones y humanos. No se ha planteado una estrategia clara hasta el momento para hacer más predecible y rápida la identificación de mHAg, por lo tanto los genes candidatos de nuevos mHAg humanos caracterizados mediante los enfoques disponibles aparecen sólo lentamente. No existe una técnica en el arte conocido que permita un acceso más fácil a nuevos mHAg o proteínas candidatas adicionales. Probablemente son un grupo diverso y esquivo de fragmentos de moléculas que se derivan de proteínas que participan en diversas funciones celulares constitutivas y, en general, se desconocen las ubicaciones de los loci codificantes. Algunos de los mHAg parecen estar expresados ampliamente

en diversos tejidos por todo el cuerpo, mientras que otros muestran una distribución limitada en los tejidos. Su análisis no se relaciona hasta el momento con la reactividad anti-leucémica sino que casi exclusivamente se asocia con la potencialmente letal EICH. Esto se debe a que las tecnologías disponibles actualmente muestran una marcada tendencia hacia la identificación de mHAg relacionados con la EICH, y sólo de forma esporádica se sugiere un mHAg para la prevención de una enfermedad, por ejemplo, la inducción de respuestas ICT.

Resulta interesante que todos los estudios para la caracterización de las respuestas inmunes de EICH y ICT den como resultado la sorprendente observación de que los antígenos implicados son mHAg con un polimorfismo limitado que se derivan de las mutaciones de ADN raras que llevan a cambios de un aminoácido en la secuencia de proteínas correspondiente. Es evidente asimismo que estos cambios de aminoácido se deben presentar mediante HLA clase I para generar respuestas ICT o EICH. Se han aislado varios clones de linfocitos T alogénicos que están implicados en la EICH y se ha demostrado que reconocen específicamente los intercambios de un aminoácido de los péptidos presentados por HLA.

La leucemia, el linfoma y el mieloma son cánceres que se originan en la médula ósea y en los tejidos linfáticos. Las enfermedades resultan de una lesión genética adquirida (no heredada) al ADN de una célula derivada del sistema hematopoyético, que se convierte en el clon leucémico y después se multiplica de manera continua. Esta proliferación ilimitada interfiere con la producción de células sanguíneas sanas del cuerpo y vuelve al cuerpo incapaz de realizar las funciones fisiológicas esenciales y protegerse a sí mismo contra las infecciones.

En los Estados Unidos, se estima que se ha diagnosticado leucemia, linfoma y mieloma a unas 107.900 personas en 1999 y esto representa el 11 por ciento de los casos de cáncer diagnosticados en los Estados Unidos cada año. Se estima que un total de 632.000 estadounidenses viven en la actualidad con leucemia, linfoma y mieloma. Los números disponibles correspondientes a Europa son muy parecidos a los que se observan en los Estados Unidos, en donde se estima que la leucemia, el linfoma y el mieloma producirán la muerte de 60.500 personas al año. La leucemia y el linfoma son los principales cánceres mortales en mujeres y hombres jóvenes de menos de 35 años.

En la fase crónica temprana, la LMC se caracteriza por una translocación cromosómica t(9;22) (Cromosoma Filadelfia, Ph) que crea el oncogén *bcr-abl*. El producto del gen quimérico es una tirosina quinasa constitutivamente activa que es la diana para los inhibidores sintéticos tales como el ST1571. Comparados con los pacientes afectados por otros tipos de tumores, los pacientes con LMC aún poseen un sistema inmune relativamente intacto en la fase crónica, y ahora es cada vez más evidente que los péptidos *bcr-abl*, junto con otros antígenos desconocidos asociados a la enfermedad, se pueden presentar mediante las moléculas de HLA y se reconocidos por los linfocitos T. La inmunización directa de los pacientes con las proteínas de fusión se ha utilizado para explorar el potencial del TMO alogénico para el aumento de la inmunidad natural o inducida por trasplante en la clínica. Una prueba inicial ha demostrado que tal vacunación es segura; algunos pacientes exhibieron respuestas de linfocitos T específicos al antígeno de inmunización (Pinilla-Ibarz et al., Blood 2000, 95: 1781-1787).

La leucemia aguda sigue siendo un desafío formidable para el cual se adaptan los tratamientos (quimioterapia, TMO y radiación) de acuerdo con los perfiles de riesgo que se deducen a partir del perfil citogenético de los pacientes. El TMO se reserva para los pacientes que no responden favorablemente a la quimioterapia sola. A fin de realizar progresos en materia de cura de estas enfermedades devastadoras, la comprensión de la biología de la leucemia a nivel clínico, celular y molecular, y especialmente la definición molecular de los antígenos relacionados a la enfermedad para el diseño de estrategias inmunoterapéuticas, es un objetivo principal para permitir la erradicación del clon leucémico implicado.

El carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés) representa aproximadamente el 5% de todas las muertes por cáncer. Al momento de la presentación, más del 50% de los pacientes ya han desarrollado la enfermedad metastásica avanzada localizada con tasas de supervivencia de 5 años menores al 20%. Numerosos estudios con muchas modalidades de tratamiento diferentes han dado como resultado sólo avances menores. Ningún agente singular o terapia combinada ha demostrado consistentemente una proporción de respuesta de 20% o más. Las terapias en base a interleucina-2 e interferón alfa se utilizan más comúnmente para tratar enfermedades avanzadas, demostrando proporciones de respuestas bajas pero reproducibles de entre el 10% y el 20%, con respuestas duraderas del 5% o menos (Nanus, Curr. Oncol. Rep. 2000, 2: 417-22).

Dado que el RCC es susceptible a la inmunoterapia a base de citocina o interferón, hay buenas razones para creer que los linfocitos T específicos están implicados en la eliminación de células tumorales autólogas (Schendel et al., J. Mol. Med. 1997, 75: 400-413). Recientemente, los linfocitos T específicos de tumor han sido aislados a partir de linfocitos que infiltran el RCC humano mediante el ensayo para detectar IFN-gama (Becker et al., Nat. Med. 2001, 7: 1159-1162). Sin embargo, debido al conocimiento incompleto de los antígenos de RCC y sus correspondientes péptidos presentados en la clase I, poco se comprende de la función de los linfocitos T en las inmunoterapias de RCC con interferón alfa.

La identificación de nuevos antígenos que podrían ser útiles para la inmunoterapia de RCC sigue teniendo alta prioridad. Los métodos para la identificación de antígenos que son relevantes en el RCC se han descrito a nivel de transcripción así como a nivel de expresión de proteína. La comparación de las proteasas de riñón sin cáncer y RCC mediante la electroforesis bidimensional en gel (2-DE) y la tinción con plata reveló patrones de proteínas

notablemente diferentes (aproximadamente 800 manchas en RCC contra aproximadamente 1400 en un riñón normal). La inmunotransferencia 2-DE reveló cinco manchas específicas de RCC, reactivas de manera reproducible con sueros de pacientes con RCC pero no con aquellos de donantes sanos. Se aislaron dos de estos antígenos mediante 2-DE preparatoria y se identificaron como proteína de músculo liso 22-alfa (SM22-alfa), una proteína de unión de actinas con función desconocida predominantemente expresada en células de músculo liso. La hibridación in situ reveló que la SM22-alfa no se expresa en las células malignas pero sí en las células mesenquimales del estroma tumoral. El segundo antígeno representa anhidrasa carbónica I, una isoforma no expresada usualmente en el riñón. Resulta interesante que una isoforma diferente (CAXII) se ha identificado previamente mediante clonación de expresión serológica como un antígeno sobreexpresado en algunos RCC. Se detectaron anticuerpos para el CAI recombinante o SM22-alfa en sueros de 3 de 11 ó 5 de 11 pacientes con RCC, respectivamente, mientras que no se detectó reacción de los sueros de 13 individuos sanos. En conclusión, los métodos serológicos pueden ser una herramienta útil en el análisis del proteoma y pueden contribuir a la identificación de antígenos asociados al tumor renal. Sin embargo, existe todavía la necesidad de identificar los antígenos relevantes de RCC y se debe demostrar especialmente la relevancia de estos antígenos para la vacunación contra el cáncer.

Esta situación en RCC es muy parecida al estado de otras diversas enfermedades de tumores sólidos, donde mientras tanto se ha definido un número total de 60 antígenos de proteínas diferentes correspondientes a 178 epítomos. Una gran parte de estos antígenos y los epítomos de linfocitos T correspondientes se han utilizado en diversos protocolos de vacunación, formulaciones adyuvantes y sistemas de presentación en base a células para mejorar la respuesta inmune. Sin embargo, independientemente del protocolo y el antígeno implicado, los resultados obtenidos han sido en gran medida comparables: activación de linfocitos T sin respuesta clínica. De este modo las vacunas podrán algún día desempeñar un papel importante en la terapia, aunque hasta el momento las respuestas inmunes observadas en ensayos clínicos no se han traducido en beneficios de supervivencia significativos.

El potencial inmunoterapéutico del TMO alogénico, como se ha descrito con anterioridad para la leucemia, se ha explorado sin embargo con otras enfermedades, tales como trastornos por deficiencia enzimática, anemia de Fanconi, y talasemia mayor. Esto ha sido posible principalmente mediante la creciente experiencia clínica y se volvió evidente que el enfoque del TMO alogénico también se podría utilizar para la inmunoterapia de tumores sólidos metastásicos tales como el RCC. En un estudio publicado recientemente (Childs et al., N. Engl. J. Med. 2000, 343: 750-758), el trasplante alogénico no mieloablativo de células madre se ha aplicado para inducir una regresión sostenida de RCC metastásico en pacientes que no han respondido favorablemente a la terapia convencional de citocina. Diez de los 19 pacientes (53 por ciento) que participaron en el estudio tuvieron una respuesta mensurable, y 3 pacientes tuvieron respuestas sostenidas completas. Aunque estos resultados son prometedores y deberían fomentar estrategias de tratamiento similares para la utilización contra otros tumores metastásicos, el procedimiento utilizado por Childs et al. no es completamente satisfactorio porque la regresión del tumor en algunos pacientes estuvo acompañada por EICH grave. Dos pacientes murieron después de recibir este tratamiento. Aunque el procedimiento necesita mayor perfeccionamiento para minimizar complicaciones y mejorar su eficacia, la validez del principio ya está disponible: los linfocitos T alogénicos pueden erradicar las células de cáncer renal, y los linfocitos del donante pueden sobrevivir en el huésped después del acondicionamiento no mieloablativo. El mensaje más general de este estudio es, sin embargo, que el TMO alogénico es extensible al tratamiento de tumores sólidos. El progreso futuro en la terapia de tumores sólidos, tales como el RCC, dependerá del establecimiento de inmunoterapia anti-tumoral mejor controlada y más segura libre de respuestas EICH.

El trasplante de médula ósea comparte muchos aspectos con el trasplante de órganos sólidos, tales como el riñón, el corazón, el hígado y el pulmón, en donde la transferencia de órganos también continúa siendo el tratamiento de elección para varios estados de la enfermedad. Aunque el progreso reciente en relación con el desarrollo de mejores fármacos inmunosupresores ha mejorado la supervivencia de alo-injertos a corto plazo, el rechazo inmunológico todavía es un obstáculo para la supervivencia a largo plazo. Se ha acumulado evidencia substancial que indica que las incompatibilidades en el órgano del donante y el paciente, a saber la incompatibilidad del mHAg, afectan a la supervivencia del órgano sólido y promueve la EICH. En este sentido, los pacientes que experimentan la supervivencia de injertos a largo plazo aún tienen un mal pronóstico y sólo un 40% de los riñones sobreviven más de diez años. Se desconoce y es objeto de debate el papel de las incompatibilidades de mHAg en la pérdida eventual de estos injertos. De este modo, el trasplante de órganos y especialmente el trasplante renal es otra aplicación que podría beneficiarse del TMO alogénico y la identificación de los alo-antígenos específicos de alelos.

Cosimi et al., en el Massachusetts General Hospital ha analizado que los riñones trasplantados podrían ser implantados después de darle a los receptores médula ósea del donante, creando de ese modo un estado de quimerismo de linfocitos T en los pacientes (N. Engl. J. Med. 2002, 346:2089-92). En teoría, los linfocitos del donante migrarán al timo, junto con el antígeno del órgano del donante, e inducirán la tolerancia al nuevo riñón. En un escenario aún más orientado al futuro, el proceso de inducción de tolerancia se puede apoyar con vacunación con los alo-antígenos renales apropiados que se hayan identificado, preparado y suministrado de acuerdo con la presente invención. Una forma intermedia del tratamiento futuro puede comprender el trasplante TMO alogénico además del trasplante renal, en donde ambos injertos se derivan del mismo donante.

El polimorfismo de nucleótido simple (SNP) se definió como una falta de coincidencia entre dos secuencias de ADN (Stoneking, Nature 2001, 409: 821-822) y hace referencia a una variación en la secuencia de un gen en el genoma de una población que surge como resultado de un cambio de una base, tales como una inserción, eliminación o,

preferentemente, como se utiliza en este documento, un cambio en una base que lleva a un cambio de aminoácido. Los SNP se manifiestan como diferentes alelos mendelianos para un gen. Un locus es el sitio en el cual se produce la divergencia.

5 El cambio de base nucleótida, tal como se entiende en la presente invención, hace referencia a la porción codificante del genoma y da como resultado la incorporación de un aminoácido alternativo dentro de la proteína correspondiente. El intercambio de aminoácidos puede afectar las modificaciones postraslacionales de dicho aminoácido, por ejemplo, glicosilación. De este modo, el SNP hace referencia a la existencia de dos o más secuencias o alelos alternativos genéticamente determinados en una población y se puede manifestar o detectar como diferencias en las secuencias de ácido nucleico, expresión genética (incluyendo, por ejemplo, transcripción, procesamiento, traslación, transporte, procesamiento de proteínas, tráfico), síntesis de ADN, proteínas expresadas, otros productos genéticos o productos de vías bioquímicas o modificaciones postraslacionales manifestadas entre miembros de una población.

15 Los SNP como se presentan en el arte se han analizado principalmente en relación con la función de la proteína alterada. Sin embargo, encontrar SNP funcionalmente relevantes entre 3 mil millones de bases de ADN y distinguirlos de los pocos millones de SNP sin función útil conocida es una gran tarea y uno de los mayores desafíos de la investigación pos-genoma. Aunque la generación de información de SNP funcionalmente relevante progresa continuamente pero en forma lenta, la información general en relación con el número total de SNP humano y la asignación a genes individuales está disponible a partir de diferentes bases de datos tales como dbSNP, CGAP, HGBASE, JST y Go!Poly etc. que recolectan y explotan los datos de los SNP establecidos en los Estados Unidos, los países europeos, Japón y China. Compañías como Celera están creando y vendiendo herramientas para identificar SNP y habrán creado un mapa de ligamientos en base al SNP del genoma humano para finales del año 2002. La base de datos de SNP de Celera se basa en las secuencias de ADN a partir de 40 ó 50 individuos y utiliza esa información para localizar los SNP. El acceso a estos datos permitirá la asignación a un gen específico y permitirá la predicción de los SNP relevantes para enfermedades en el futuro.

25 La presentación de antígenos se basa en dos vías distintivas, una vía exógena HLA clase II y una endógena HLA clase I. Las moléculas clase I se codifican mediante los loci HLA-A, B y C y se considera que activan principalmente linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Las moléculas HLA clase II se codifican mediante los loci DR, DP y DQ y principalmente activan los linfocitos T CD4⁺, tanto las células coadyuvantes como las células citotóxicas.

30 Un individuo "normal" tiene seis moléculas HLA clase I, usualmente dos de cada uno de los tres grupos A, B y C. En consecuencia, todos los individuos tienen su propia selección de moléculas HLA clase II, nuevamente dos de cada uno de los tres grupos DP, DQ y DR. Cada uno de los grupos A, B, C y DP, DQ y DR está dividido nuevamente en varios subgrupos. Todos los productos génicos son altamente polimorfos. De este modo diferentes individuos expresan moléculas HLA distintivas que difieren de aquellas de otros individuos. Esta es la razón de las dificultades para encontrar donantes de órganos HLA compatibles en los trasplantes. El significado de la variación genética de las moléculas HLA en inmunobiología se refleja mediante su papel como genes de la respuesta inmune. Mediante su capacidad de unión de péptidos, la presencia o ausencia de ciertas moléculas HLA gobierna la capacidad de un individuo para responder a los epítomos de péptidos. Como consecuencia, las moléculas HLA determinan la resistencia o la susceptibilidad a las enfermedades.

40 La expresión HLA clase II se restringe a las APC. Esto es consistente con las funciones de los linfocitos T coadyuvantes, que se activan de forma local donde quiera que encuentren APC (macrófagos, células dendríticas, o células B) que han internalizado y procesado antígenos producidos por organismos patógenos.

45 Las moléculas MHC (HLA) clase I se expresan sobre cada célula nucleada del cuerpo y son parte del mecanismo de defensa inmunológica contra los virus y otros patógenos intracelulares. Se ensamblan como heterodímeros de una cadena clase I (HLA-A, -B, -C) y β_2 -microglobulina soluble que unen péptidos generados por antígenos que procesan dentro de la célula y transportan estos péptidos a la superficie de la célula donde pueden ser reconocidos por CTL mediante el receptor de linfocitos T.

50 Las vías clase I y clase II no son completamente distintivas. Por ejemplo, se sabe que las células dendríticas, y hasta cierto punto macrófagos, son capaces de endocitar (someter a pinocitosis) a las proteínas extracelulares y posteriormente presentarlas en el contexto de MHC clase I. Se ha demostrado que los antígenos exógenos también son capaces de ingresar en la vía clase I (Rock, et al., Immunol. Today, 1996, 17:131-137). Esto se puede lograr mediante la utilización de vías de administración especializadas, por ejemplo mediante el acoplamiento de los antígenos a perlas de óxido de hierro, y parece ser un mecanismo central, debido a la importancia de una expresión concomitante de ambos el MHC clase I y clase II sobre la misma APC para producir un grupo del tipo de tres células. Este grupo de interacción del tipo de tres células ha sido propuesto por Mitchison et al. (Eur. J. Immunol., 1987, 17: 1579-83.) y más tarde lo hicieron otros autores. Demostraron la importancia de la presentación concomitante de los epítomos clase I y clase II sobre la misma APC. De acuerdo con el mecanismo recientemente descrito para la activación de CTL (Lanzavecchia, Nature 1998, 393: 413-414, Matzinger, Nat. Med. 1999: 616-617), las APC profesionales que presentan antígenos mediante MHC clase II son reconocidas por linfocitos T coadyuvantes. Esto da como resultado una activación de la APC (mediada por la interacción de ligandos CD40 sobre el linfocito T

coadyuvante y CD40 sobre la APC) y le permite a la APC estimular directamente a las CTL que se activan de ese modo.

Se ha demostrado anteriormente que la inserción de un epítipo foráneo de linfocito T coadyuvante restringido a MHC clase II dentro de un auto-antígeno da como resultado la generación de un antígeno capaz de inducir fuertes respuestas de reacción cruzada de anticuerpos dirigidas contra el auto-antígeno no modificado (cf. WO 95/05849 del solicitante). Se demostró que la inducción de auto-anticuerpos se produce por la ayuda de linfocitos T específicos inducidos por el epítipo foráneo insertado y se espera que los auto-antígenos modificados – con la ayuda de adyuvantes apropiados – sean capaces de inducir una fuerte respuesta CTL contra los auto-epítopos restringidos de MHC clase I. Por lo tanto, la tecnología descrita en la memoria WO 95/05849 se puede adaptar para proporcionar también estrategias de vacunación contra antígenos intracelulares, y contra otros asociados con las células que tienen epítopos presentados en el contexto del MHC.

Se han reportado los motivos de unión de HLA para los alelos clase I encontrados con más frecuencia (HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A24, -B7) como así también aquellos para varias moléculas clase II principales (Rammensee et al., Immunogenet. 1995; 41: 178-228; Ruppert et al., Cell 1993; 74: 929-937; Kubo et al., J. Immunol. 1994; 152: 3913-3924, Kondo et al., Immunogenet. 1997; 45: 249-258; Southwood et al., J. Immunol. 1998, 160: 3363-3373; Geluk et al., J. Immunol. 1994; 152: 5742-5748). Un motivo de unión se caracteriza por el requerimiento de aminoácidos de un cierto tipo, por ejemplo aquellos que llevan grandes grupos laterales hidrofóbicos o de carga positiva, en posiciones definidas del péptido, de modo que se logra un ajuste preciso con los bolsillos del bolsillo de unión de HLA. El resultado de esto, tomado junto con la restricción del largo del péptido de 8 a 10 aminoácidos dentro del bolsillo de unión, es que es poco probable que un péptido que se une a un tipo de moléculas HLA clase I se una también a otro tipo. De este modo, por ejemplo, es perfectamente posible que el motivo de unión de péptido para los subgrupos HLA-A1 y HLA-A2, que pertenecen ambos al género clase I, sean tan diferentes como los motivos para las moléculas HLA-A1 y HLA-B1.

Por las mismas razones, es poco probable que exactamente la misma secuencia de aminoácidos se ubique en el bolsillo de unión de las diferentes moléculas clase II. En el caso de las moléculas HLA clase II, las secuencias de unión de péptidos pueden ser más largas, y se ha descubierto que ellas habitualmente contienen de 10 a 16 aminoácidos, algunos de los cuales, en uno o ambos terminales, no son una parte del motivo de unión para el bolsillo HLA.

Puede producirse una superposición de los diferentes motivos de unión de péptidos de varias moléculas HLA clase I y clase II. Se dice que los péptidos que tienen una superposición en las secuencias de unión de al menos dos moléculas HLA diferentes contienen "epítopos de linfocitos T anidados". Los diferentes epítopos contenidos en un "péptido con epítopos anidados" se pueden formar mediante el procesamiento del péptido por parte de las APC y, después, se pueden presentar a los linfocitos T mediante diferentes moléculas HLA. La variedad individual de las moléculas HLA en humanos hace que los péptidos que contienen epítopos anidados sean más útiles como vacunas generales que los péptidos que sólo son capaces de unirse a un tipo de molécula HLA.

La vacunación efectiva de un individuo sólo se puede lograr si al menos un tipo de molécula HLA clase I y/o clase II en el paciente puede unirse a un péptido de la vacuna en su largo total o bien después del procesamiento por la APC del propio paciente.

La utilidad de un péptido como una vacuna general para la mayoría de la población aumenta con el número de moléculas HLA diferentes a las que se puede fijar, en su largo total o bien después del procesamiento mediante las APC. Mediante la identificación de conjuntos de péptidos asociados con antígenos que abarcan estos motivos y que se fijan a las diferentes moléculas HLA, se podría ofrecer cobertura a la mayoría de la población humana (>80%) para el desarrollo de una inmunoterapia de tumores en base a epítopos de linfocitos T.

A fin de utilizar péptidos derivados a partir de una proteína codificada por las versiones alélicas de un gen como vacunas o agentes anticancerígenos para generar linfocitos T antitumorales CD4⁺ y/o CD8⁺, es necesario investigar a la proteína mutante en cuestión e identificar a los péptidos que son capaces, posiblemente después del procesamiento para convertirse en péptidos más cortos mediante la APC, de estimular linfocitos T.

En general, los tumores son muy heterogéneos con respecto a las alteraciones genéticas encontradas en las células tumorales. Esto implica que tanto el efecto terapéutico potencial como la fuerza profiláctica de una vacuna contra el cáncer aumentarán con el número de dianas contra las cuales la vacuna sea capaz de elicitar inmunidad de linfocitos T. Una vacuna con múltiples dianas también reducirá el riesgo de la formación de nuevos tumores por variantes que escapan al tratamiento a partir del tumor primario.

Está claro que la presentación de epítopos de linfocitos T (fragmentos de péptidos) sobre moléculas HLA clase I no sólo es una característica para el reconocimiento de células sino también un prerrequisito para sondear y destruir células tumorales y otras células que portan alo-antígenos mediante linfocitos T específicos.

En más detalle, para la generación de epítopos las proteínas correspondientes se deben dividir por proteasomas en péptidos con aminoácidos de terminal C específicos. Los fragmentos divididos se deben transportar mediante las llamadas moléculas TAP (transportadoras asociadas con el procesamiento de antígenos) dentro del retículo

endoplasmático donde se produce la fijación de HLA cuando los fragmentos contienen motivos de unión de HLA adecuados. De este modo, es un prerrequisito que los péptidos diana candidatos para la inmunoterapia, que contienen los motivos adecuados para la unión de HLA, sean divididos por la proteasoma en el aminoácido de C terminal correcto. Para determinar la división apropiada por proteasoma de proteínas candidatas de forma experimental, los ensayos de división in vitro (4-24 horas) utilizando proteasomas celulares purificadas 20S se han desarrollado y combinado con el análisis de péptidos mediante espectrometría de masas. Los resultados de tales experimentos indican que la combinación de la digestión de proteasomas con los estudios de unión es útil para definir péptidos diana candidatos para la inmunoterapia y que el experto se beneficiará de la PAProC (<http://www.paproc.de>), un algoritmo de predicción desarrollado para la evaluación de la posibilidad de división general de las proteínas vinculadas a la enfermedad.

Se han identificados a la fecha numerosos epítomos de la CTL y, como se expresó con anterioridad, ellos tienen motivos en común con un largo y una composición de aminoácidos preferentes en ciertas posiciones. Se han utilizado los motivos predecibles para diseñar programas informáticos que traducen la secuencia de aminoácidos de una determinada proteína en epítomos de CTL. Es particularmente útil para los inmunólogos que trabajan sobre la predicción de ligandos MHC clase I y epítomos de CTL utilizar SYFPEITHI en <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com>) o de manera alternativa BIMAS en <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla/bind/>.

Las investigaciones in-vivo de las respuestas de linfocitos T se pueden limitar por la dificultad de identificar linfocitos T específicos de antígeno entre una plétora de células no específicas. Esta dificultad se debe en gran medida a la baja afinidad de interacciones entre el receptor de linfocitos T (TCR) y su ligando natural, el complejo péptido HLA. La multimerización de complejos péptidos HLA conocida como tecnología de tetrámeros puede superar estos problemas técnicos mediante el aumento de la afinidad general de la interacción TCR-HLA hasta el punto de que tales complejos se puedan utilizar como reactivos para la detección específica de epítomos de linfocitos T.

La generación de complejos de péptidos HLA clase II solubles no está muy bien establecida, quizás debido a la estructura más compleja del bolsillo de unión de péptidos clase II. La expresión in vivo y el re-plegamiento en células de insectos así como la utilización de epítomos de péptidos enlazados de forma covalente son enfoques prometedores para superar estos problemas técnicos.

La tinción de tetrámeros es altamente específica a epítomos, e incluso muy pocas poblaciones se pueden identificar directamente ex vivo con esta técnica. Además del análisis de frecuencia de precisión, estos reactivos permiten la caracterización fenotípica y funcional detallada de las poblaciones de linfocitos T específicos a epítomos a nivel de una célula, por ejemplo la expresión de marcadores de superficie, la determinación de perfiles de citocina, y los análisis del repertorio de TCR. La cinética de unión de los complejos tetraméricos de péptidos de HLA parecen ser herramientas útiles para medir las afinidades relativas de los linfocitos T específicos a epítomos para su ligando. Además de los conocimientos y cuantificaciones básicas de las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T que se han hecho posibles con tetrámeros, la tecnología se puede utilizar en el TMO alógeno para la eliminación de linfocitos T autoreactivos implicados en la EICH.

La predicción teórica de un epítomo de CTL con la ayuda de los programas de predicción conocidos se puede realizar, sin embargo, sólo para antígenos conocidos. De este modo, la identificación de proteínas que llevan los epítomos reconocidos por los linfocitos T protectores es un tema central en el desarrollo de vacunas. Si los péptidos reconocidos por linfocitos T se han generado mediante elución a partir de moléculas clase I el posterior desarrollo hacia una vacuna en base a péptidos puede ser un proyecto que requiera mucho tiempo. Esta invención tiene por objeto cerrar dicha brecha con respecto a la predicción de antígenos de proteínas vinculados con el cáncer y la EICH.

La patente WO 00/42181 revela antígenos de histocompatibilidad menor y su utilización en el diagnóstico y tratamiento de tumores incluyendo un kit para la detección de una variante alélica con un aminoácido no coincidente relacionada con un SNP que comprende cebadores que no se superponen.

El propósito especial de esta solicitud de patente es identificar y caracterizar alo-antígenos, tales como los mHAg, y determinar su papel en la ICT, la EICH y el rechazo de injertos de órganos sólidos.

A estos efectos, desarrollamos enfoques novedosos para identificar y caracterizar alo-antígenos y la respuesta inmune a ellos. Otros tópicos relevantes incluyen, pero no se limitan a, la identificación de los loci genéticos y los alelos que codifican alo-antígenos y mHAg y el mejoramiento de las técnicas para determinar el número total de antígenos mHAg/loci mHAg y alelos implicados. La identificación de antígenos mHAg inmunodominantes/mHAg incluye la evaluación de péptidos antigénicos y su papel en la terapia y enfermedad así como su relevancia con respecto a la abundancia y afinidad relativa de los péptidos para HLA y la inducción de la acción de linfocitos T citotóxicos. También, se podrían estudiar correlaciones in vivo de la función inmune de los péptidos in vitro para determinar si los péptidos inmunodominantes identificaron la función in vitro de forma similar a in vivo. También se puede estudiar la expresión relativa de tejidos de diferentes alo-antígenos o mHAg y el impacto de su distribución de tejido diferencial sobre el rechazo de un trasplante.

Esta información exhaustiva se utilizará para identificar enfoques para mejorar las respuestas ICT como se observan a continuación del TMO, para mejorar la supervivencia de injertos. El alcance de investigación para apoyar esta solicitud de patente incluye, pero no se limita a, las siguientes amplias áreas de interés y los ejemplos específicos de investigaciones. Los ejemplos no pretenden ser directivos, sino ilustrativos de áreas que necesitan seguir siendo exploradas.

Resumen de la invención

La invención hace referencia al sorprendente descubrimiento de diferentes genes que codifican polimorfismos de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés), algunos previamente conocidos y el resto desconocidos con anterioridad, que se expresan en individuos que tienen cáncer. Un aspecto general de la presente invención describe por primera vez un método generalizado de definir un grupo de antígenos de proteínas funcionalmente heterogéneos relacionados con la inducción de respuestas inmunes EICH e ICT, que hasta ahora se han resumido como mHAg. Dichos mHAg pertenecen al grupo de alo-antígenos que hasta ahora no han sido accesibles para un esquema generalizado de identificación: Conforme a la presente revelación, se ha establecido un método universal que ayuda a distinguir dentro el grupo de alo-antígenos en aquellos que son responsables de la generación de EICH y aquellos que confieren ICT. También se divulga que las variantes alélicas con un solo aminoácido no coincidente que surgen de la codificación de SNP en genes están presentes en células cancerígenas y que dichos antígenos son reconocidos por linfocitos T alo-reactivos (del donante) en el contexto de moléculas HLA que llevan a la destrucción de dicha célula.

El SNP codificante en un gen representa intercambio de un solo aminoácido en una proteína y son hereditarios y únicos para un individuo. Los pacientes trasplantados o aquellos que tienen un trasplante de médula ósea programado o transferencia de células madre de un donante no singénico por razones terapéuticas representan un estatus quimérico con respecto a los productos génicos que presentan intercambio de un solo aminoácido codificado por un SNP y los linfocitos T alo-reactivos específicos para dicho epítipo de linfocitos T. En consecuencia, los productos génicos son reconocidos por el sistema inmune (del huésped) derivado del donante y, por lo tanto, forman una base para el diagnóstico, control y terapia.

En resumen, la presente invención proporciona un nuevo concepto con respecto a la amplia definición de alo-antígenos que producen ICT y/o EICH y un objeto principal de la invención es obtener péptidos correspondientes a fragmentos de péptidos de proteínas con intercambio de un solo aminoácido producido y presentado por células cancerígenas que puedan utilizarse para estimular linfocitos T. Cabe destacar que la base molecular de la sustitución de un solo aminoácido en esta invención se basa en una diferencia alélica, que implica la sustitución de un solo aminoácido conservador, y es parte de la invención determinar si un individuo que necesita un TMO o que ya fue sometido a un TMO lleva el intercambio de dicho aminoácido en una proteína dada o no. También es un aspecto de la presente invención determinar si dicha proteína es expresada de manera principal y/o selectiva en células que representan tejidos cancerígenos o tejidos normales.

Otro propósito de la revelación es determinar y, de ser necesario, aislar linfocitos T derivados de donante que reconocen dichas diferencias de dicho aminoácido presentadas en células diana. Dichos linfocitos T pueden ser específicos a células cancerígenas y utilizarse de manera terapéutica, o pueden ser específicos a antígenos proteínas omnipresentes y por lo tanto pueden identificarse como estimulares de la EICH.

Se descubre que algunos de los péptidos definidos en esta revelación tienen una distribución de tejido amplia e inducen EICH y por lo tanto pueden ser utilizados para inducir tolerancia inmunológica, mientras que aquellos definidos como exclusivamente expresados estimularán respuestas de ICT y son útiles para la inmunoterapia específica de la enfermedad.

Otro objeto principal de la revelación es desarrollar una terapia para cánceres en base a la inmunidad de linfocitos T, que puede inducirse en pacientes mediante TMO alogénico y/o mediante la estimulación de sus propios linfocitos T o los linfocitos T de donantes in vivo o in vitro con los péptidos conforme a la revelación para inducir una respuesta a linfocitos T citotóxicos y superar la tolerancia inmunológica.

Otro objeto principal de la revelación es desarrollar una vacuna para prevenir la aparición de o para erradicar cánceres en base sólo o parcialmente a péptidos correspondientes a péptidos de la presente revelación que puede realizarse mediante la generación y activación de la actividad citotóxica de linfocitos T contra células que albergan genes con un solo nucleótido alterado y péptidos que tienen un solo aminoácido sustituido.

Otro aspecto de la vacunación hace referencia a la utilización de péptidos que corresponden a péptidos que inducen EICH de la presente invención para la inducción de tolerancia con respecto a los linfocitos T que reconocen células que albergan genes con un solo nucleótido alterado y péptidos con un solo aminoácido sustituido.

Otro objeto principal de la revelación es diseñar un tratamiento contra el cáncer o profilaxis específicamente adaptado a un ser humano que necesite tal tratamiento o profilaxis, que comprende la administración de al menos uno o más péptidos según la revelación.

5 Conforme a la revelación, la expresión de tejido normal de proteínas con un solo aminoácido sustituido se asocia a la prevención y el tratamiento de EICH, mientras que la expresión asociada a una enfermedad u órgano seleccionado y/o células cancerígenas específicas se asocia a una respuesta terapéutica de linfocitos T. Conforme a este aspecto de la revelación, es particularmente útil determinar diferencias acerca de la proteína con un aminoácido sustituido en un espécimen derivado del donante comparado con un espécimen derivado del receptor. Las diferencias entre donante y receptor analizadas conforme a esta invención y correlacionadas con expresión de tejido normal proporcionan un indicador importante de EICH después del TMO. Por otro lado, las diferencias entre donante y receptor, analizadas conforme a esta revelación y correlacionadas con expresión asociada a enfermedades en tejidos, órganos y células cancerígenas, proporcionan un indicador importante de reactividad ICT beneficiosa después del alo-TMO.

15 El grupo de péptidos correspondiente a fragmentos de proteínas con un solo aminoácido sustituido que surge de genes que codifican SNP en células cancerígenas, identificado según la presente revelación, puede utilizarse para generar los linfocitos T aislados. Además, dichos péptidos pueden utilizarse para la inducción de reactividad de linfocitos T en las células cancerígenas que matan al paciente que albergan un gen con un SNP como se describe con anterioridad.

20 Los péptidos con aminoácidos no coincidentes definidos conforme a esta revelación tienen al menos 8 aminoácidos y corresponden, ya sea en toda su longitud o después del procesamiento por las células que presentan antígenos (APC, por sus siglas en inglés), a los productos génicos correlacionados con SNP, o fragmentos de los mismos, producidos por una célula asociada a un enfermedad en un paciente humano que padece de cáncer. Un péptido conforme a esta revelación se caracteriza porque a) tiene al menos 8 aminoácidos y es un fragmento de una proteína con un solo aminoácido sustituido que resulta de dicho SNP codificante en un gen de una célula cancerígena; b) comprende la sustitución de un solo aminoácido como parte de la secuencia de proteínas codificada en dicho gen; y c) incluye, ya sea en toda su longitud o después del procesamiento por parte de las APC, respuestas de linfocitos T.

25 Los péptidos de esta invención contienen preferentemente de 8 a 25, 9 a 20, 9 a 16, 8 a 12 ó 20 a 25 aminoácidos. Pueden contener, por ejemplo, 9, 12, 13, 16 ó 21 aminoácidos.

30 Lo que resulta más preferible es que los péptidos de la presente revelación tengan al menos 9 aminoácidos, por ejemplo, de 9 a 18 aminoácidos, pero, debido a la posibilidad de procesamiento intrínseca de las APC, también son adecuados los péptidos más largos para crear péptidos del complejo HLA. Por lo tanto, puede utilizarse la secuencia de aminoácidos completa de una proteína que tiene una o más sustituciones de aminoácidos, como péptido o proteína según la presente revelación, si comprende 8 aminoácidos o más. Es importante mencionar que una molécula de ADN que codifica tal polipéptido también podría utilizarse para expresar y presentar el péptido.

Para determinar si los péptidos identificados según la presente revelación se pueden utilizar en las composiciones y métodos según la presente revelación se deberían realizar los siguientes pasos:

35 1) Identificar genes específicos para células cancerígenas que se expresan o sobreexpresan de manera selectiva en dicha célula. Analizar si dichos genes son polimórficos con respecto a la codificación de un solo nucleótido alelo-específico para un intercambio de aminoácidos en el producto génico.

Determinar según el perfil de expresión amplia o selectiva de un gen si los péptidos identificados de este modo son útiles en el tratamiento o profilaxis del cáncer o la prevención de EICH.

40 2) Determinar si la parte polimorfa del péptido que representa el único aminoácido no coincidente, ya sea en toda su longitud o como fragmentos más cortos se ajusta a la definición de epítomos de linfocitos T HLA clase I, requeridos para estimular los linfocitos T.

De manera opcional, puede agregarse el siguiente paso:

45 3) Determinar péptidos que contienen epítomos anidados para diferentes moléculas principales HLA clase I y/o clase II y utilizar estos péptidos para la estimulación o inhibición de linfocitos T.

50 En resumen, es un aspecto esencial de la revelación identificar péptidos codificados por SNP que son fragmentos de proteínas y que son epítomos de linfocitos T, o derivados de éstos, que tienen propiedades funcionales o inmunológicas asociadas de manera intrínseca con alo-reactividad, en donde la diferencia inmunológica es determinada por cambios de uno solo o más aminoácidos codificados por un SNP, dentro de dicho epítomo de linfocitos T. Otro aspecto de la presente revelación es que con métodos estándares establecidos conocidos por los expertos ahora es posible identificar nuevos alo-antígenos relevantes responsables de la inducción de una respuesta alo-inmune asociada con mHAg, antígenos implicados en EICH, antígenos implicados en ICT y antígenos implicados en la reacción huésped contra injerto. En base a los métodos y péptidos descritos en este documento, pueden producirse sondas genéticas y cebadores que pueden utilizarse para detectar los alo-antígenos, en especial SNP, en el gen que codifica la versión alélica de un solo aminoácidos de la proteína. Además, la revelación proporciona un método para determinar el estado alélico de un sujeto con respecto a un gen polimórfico a través de (a) obtener una muestra apropiada del ácido nucleico del sujeto y (b) determinar si la muestra de ácido nucleico del paso (a) es, o se

deriva de, un ácido nucleico que codifica un alo-antígeno definido por SNP de modo tal que se pueda determinar si un sujeto tiene una u otra versión alélica del gen del alo-antígeno definido por SNP.

5 Esta revelación también proporciona oligonucleótidos de al menos 15 nucleótidos capaces de producir híbridos específicamente con una secuencia de nucleótidos presente dentro de un ácido nucleico que codifica una versión alélica del SNP que lleva al intercambio de un solo aminoácido, y oligonucleótidos de al menos 15 nucleótidos capaces de producir híbridos específicamente con una secuencia de nucleótidos presente dentro de un ácido nucleico que (la otra versión alélica) codifica el intercambio del otro aminoácido sin producir híbridos con un ácido nucleico que codifica el otro alelo.

10 La revelación proporciona además un método para determinar si un sujeto puede beneficiarse del TMO alogénico para la terapia contra el cáncer que comprende (a) obtener una muestra de ácido nucleico apropiada; y (b) determinar si la muestra de ácido nucleico del paso (a) es, o se deriva de, un ácido nucleico que codifica una y/o otra versión de proteína alélica de modo tal que se pueda determinar si un sujeto tiene una predisposición para una EICH o respuesta ICT.

15 Un aspecto específico de la revelación hace referencia a una expresión de tejido selectivo y distribución de dicha variante de proteína alélica codificada por SNP y los péptidos descritos en el presente documento pueden utilizarse para producir agentes terapéuticos selectivos según se requiera para combatir enfermedades como el cáncer y/o EICH. Mejorar la respuesta inmune de un paciente, o donante, con alo-antígeno identificado según esta invención podría contribuir de manera considerable a inmunoterapias mejoradas. Para proporcionar inmunidad a un paciente, puede ser necesario administrar una cantidad efectiva de uno o más polipéptidos descritos en la invención junto con un adyuvante. El experto en el campo seleccionará este amplificador de la respuesta inmune según el protocolo de vacunación elegido.

20 Además, la presente revelación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los polipéptidos inventivos, o una molécula de ADN que codifica tal polipéptido, y un portador fisiológicamente aceptable. La revelación también proporciona vacunas que comprenden al menos uno de los polipéptidos de la invención y un amplificador de la respuesta inmune no específico, junto con vacunas que comprenden al menos una secuencia de ADN que codifica polipéptidos y un amplificador de la respuesta inmune no específico.

25 La revelación proporciona también un método para el tratamiento de un sujeto que tiene una predisposición a respuestas EICH O ICT ya sea introduciendo el ácido nucleico aislado que codifica una y/o la otra versión de proteína alélica o una cantidad efectiva de una y/o la otra versión de proteína alélica y un portador farmacéuticamente aceptable, de modo tal que pueda tratarse al sujeto que es susceptible de tener EICH y/o cáncer.

30 Esta revelación también proporciona un método para determinar si un sujeto tiene cáncer residual después de una transferencia de médula ósea o célula madre alogénica anterior, que comprende (a) obtener una muestra de ácido nucleico apropiada de células sanguíneas del sujeto enfermo, y (b) determinar si la muestra de ácido nucleico del paso (a) es, o se deriva de, un ácido nucleico que codifica la versión de proteína alélica propia heredada del paciente o la variante alélica del donante de modo tal que pueda determinarse si un sujeto tiene cáncer residual.

35 Esta revelación también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer ya sea introduciendo el ácido nucleico aislado que codifica una y/o la otra versión génica alélica, o la propia proteína, en una cantidad efectiva.

40 Esta revelación también proporciona un método para identificar un compuesto químico que es capaz de suprimir células incapaces de regularse a sí mismas en un sujeto, que comprende (a) producir el contacto de una y/o la otra variante alélica de la versión de proteína con el compuesto químico permitiendo la unión entre una y/o la otra variante alélica de la proteína y el compuesto químico, (b) detectar la unión específica del compuesto químico a una y/o la otra variante alélica de la proteína, y (c) determinar si el compuesto químico inhibe una y/o la otra variante alélica de la proteína para identificar un compuesto químico que sea capaz de suprimir células incapaces de regularse a sí mismas.

45 Esta revelación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto químico capaz de inhibir el cáncer, una molécula antisentido capaz de inhibir un ácido nucleico aislado que codifica una y/o la otra variante alélica de la proteína, o una variante alélica purificada de la proteína en una cantidad efectiva para tratar el cáncer y de ser necesario junto con un portador farmacéutico efectivo.

50 Esta revelación proporciona también un método de tratar a un paciente que tiene cáncer, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica identificada con anterioridad.

Esta revelación también proporciona mamíferos transgénicos, no humanos, que comprenden ácido nucleico aislado que codifica una y/o la otra versión alélica humana de la proteína.

55 En otros aspectos de la revelación, se proporcionan métodos y kits de diagnóstico para la detección de una o la otra versión alélica del gen del alo-antígeno definido por SNP en un paciente o en un donante. En una primera realización, el método comprende contactar células dérmicas o linfocitos de un paciente o donante con uno o más de

los polipéptidos antes indicados y detectar una respuesta inmune en la piel del paciente o donante. Métodos indirectos utilizados para evaluar la activación de linfocitos tales como el análisis de proliferación o respuestas citotóxicas también puede utilizarse. En una segunda realización, el método comprende producir el contacto de una muestra biológica con al menos uno de los polipéptidos antes indicados y detectar en la muestra la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido(s), detectando de este modo alo-reactividad en la muestra biológica. Muestras biológicas adecuadas incluyen sangre, esputo, suero, plasma, saliva, fluido cerebroespinal y orina.

Se proporcionan kits de diagnóstico que comprenden uno o más de los polipéptidos antes indicados en combinación con un aparato suficiente para contactar el polipéptido con las células seleccionadas de un paciente o donante. La presente revelación también proporciona kits de diagnóstico que comprenden uno o más de los polipéptidos inventivos en combinación con un reactivo de detección.

En otro aspecto, la presente revelación proporciona anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, que se unen a las versiones alélicas individuales de los polipéptidos definidos por SNP, y métodos para su utilización en la detección de alo-antígenos en individuos enfermos o donantes sanos.

Estos y otros aspectos de la presente revelación serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada.

En resumen la revelación hace referencia a los siguientes puntos:

(i) Un método para proporcionar epítomos de variantes alélicas de péptidos o proteínas antigénicos de una especie específica en base a intercambios de uno o más aminoácidos asociados a la codificación de un polimorfismo de nucleótido simple, en donde dicho método comprende los pasos de:

(i) definir una proteína o péptido de interés o un subconjunto de los mismos;

(ii) evaluar una base de datos que representa al menos dos o más librerías de ADN de dicha especie para dicho péptido o proteína definido o subconjunto de los mismos,

(iii) identificar y seleccionar intercambios de aminoácidos de variantes alélicas de proteínas/péptidos, un producto de expresión o un fragmento del mismo que es codificado por una secuencia de ADN que contiene al menos un polimorfismo de nucleótido simple en la región codificante,

(iv) crear epítomos de 8 mer a 25 mer que comprenden el residuo de aminoácidos que contiene dicho polimorfismo, y

(v) seleccionar tales epítomos que se unen a la proteína MHC.

(ii) Un método del punto (i), en donde un estatus quimérico con respecto a las variantes alélicas fue producido o causado por células alo-trasplantadas, y las células receptoras expresan y presentan variantes alélicas diferentes de las del donante.

(iii) Un método del punto (i), (ii), en donde el péptido o proteína antigénico está asociado a una enfermedad o trastorno y dicha enfermedad o trastorno requiere alo-trasplante.

(iv) Un método del punto (iii), en donde dicho péptido o proteína antigénico se expresa en un tejido u órgano enfermo comparado con células de tejido u órgano normal.

(v) Un método del punto (iv), en donde dicha enfermedad o trastorno es cáncer y dicho tejido u órgano enfermo son cancerígenos.

(vi) Un método del punto (v), en donde las células cancerígenas del receptor expresaban la versión alélica que era diferente de la de las células alo-trasplantadas del donante.

(vii) Un método del punto (i) en donde la proteína MHC es una molécula HLA.

(viii) Un método de cualquiera de los puntos (i) - (vi), en donde los epítomos creados por el paso (iv) de la reivindicación 1 son péptidos de 9 mer a 16 mer.

(ix) Un método según cualquiera de los puntos (i) - (viii), en donde los epítomos inducen una respuesta inmune de enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

(x) Un método según cualquiera de los puntos (i) - (viii), en donde los epítomos inducen una respuesta inmune de injerto contra tumor (ICT).

(xi) Un método según cualquiera de los puntos (i) - (x), en donde dicha proteína o polipéptido de interés se selecciona de los antígenos indicados en las Tablas 1-6.

(xii) Un péptido o polipéptido sintético que comprende una secuencia que (i) deriva de una variante alélica de un péptido o proteína antigénico de un individuo de una especie específica, (ii) es codificada por una secuencia

ADN que contiene al menos un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la región codificante, (iii) se une al complejo de proteína MHC para inducir una respuesta inmunogénica, y (iv) no es idéntica a una secuencia que incluye una EICH.

- 5 (xiii) Un péptido o polipéptido sintético del punto (xii), en donde dicha secuencia GVDH es una secuencia o una parte de la misma, como se indica en la Tabla 1-6.
- (xiv) Un péptido o polipéptido sintético del punto (xii) o (xiii), en donde dicho péptido o polipéptido induce actividad de ICT.
- (xv) Un péptido o polipéptido sintético del punto (xiv), en donde dicha actividad de ICT es inducida por una variante alélica asociada al cáncer.
- 10 (xvi) Un péptido o polipéptido sintético de cualquiera de los puntos (xii) - (xv), en donde dicho antígeno codificado por SNP estaba presente en células cancerígenas.
- (xvii) Un péptido o polipéptido sintético de cualquiera de los puntos (xii) - (xvi) como medicamento.
- (xviii) Un péptido o polipéptido sintético de cualquiera de los puntos (xii) - (xvii), obtenido utilizando el método del punto (i) o (ii).
- 15 (xix) Un célula que expresa un péptido, polipéptido o proteína, o mezclas de diferentes tales moléculas, que comprende la secuencia de cualquiera de los péptidos sintéticos como se define en los puntos (xii) - (xviii).
- (xx) Una célula del punto (xix) en donde dicha célula expresa una molécula MHC que se une a dichos péptidos que llevan intercambio de aminoácidos.
- 20 (xxi) Una composición farmacéutica que comprende un péptido o polipéptido antigénico o una mezcla de diferentes péptidos o polipéptidos, como se define en cualquiera de los puntos (xii) - (xviii), o de manera alternativa, una célula como se define en los puntos (xix) o (xx), de manera opcional junto con un portador, disolvente o excipiente farmacéuticamente efectivo.
- (xxii) Una composición farmacéutica del punto (xxi) que además comprende un adyuvante.
- 25 (xxiii) Utilización de péptido/polipéptido, una célula o composición farmacéutica según los puntos (xxi) o (xxii) para la fabricación de una vacuna.
- (xxiv) Utilización según el punto (xxiii), en donde dicha vacuna está dirigida al antígeno del péptido codificado por SNP que se presenta en las células asociadas con la enfermedad, preferentemente células cancerígenas.
- 30 (xxv) Método de tratamiento de un trastorno o enfermedad relacionado con SNP en un individuo, que comprende la administración a dicho individuo de un péptido o polipéptido antigénico de cualquiera de los puntos (xii) - (xviii) y/o una molécula de ácido nucleico que codifica para dichos péptidos o polipéptidos, en donde dicho péptido o polipéptido o ácido nucleico enriquece de manera selectiva la presentación con una molécula HLA.
- 35 (xxvi) Un método ex-vivo para la determinación y selección de diferentes variantes alélicas de una proteína específica de un primer individuo en comparación con las de un segundo individuo de la misma especie, en donde dicha diferencia se deduce a una condición patogénica específica o enfermedad de uno de dichos individuos, el método comprende los siguientes pasos:
- (i) tomar una muestra de tejido u órgano seleccionado del primer individuo y del segundo individuo,
- (ii) analizar cada muestra de al menos un aminoácido no coincidente de variantes alélicas de dicha proteína, que se une a la proteína HLA y es codificado por un solo SNP o producto de expresión del mismo,
- 40 o un fragmento de este producto de expresión, y
- (iii) seleccionar tales no coincidencias que ocurren sólo en uno de los individuos.
- (xxvii) Método según el punto (xxvi), en donde la muestra deriva del tejido enfermo y la falta de coincidencia de aminoácido ocurre en el individuo que está un estado patogénico.
- 45 (xxviii) Método según el punto (xxvii), en donde el péptido o polipéptido que representa dicha no coincidencia de un solo aminoácido se une sólo o preferentemente a la célula que presenta el antígeno o proteína HLA del individuo enfermo.
- (xxix) Método del punto (xxviii), en donde dicho péptido o polipéptido es reconocido por linfocitos T citotóxicos (CTL).

(xxx) Método de trasplantar células madres hematopoyéticas de un donante a un receptor que comprende el método de los puntos (xxvi) - (xxix).

(xxx) Método de tratamiento contra el cáncer por medio del trasplante de células madres hematopoyéticas que comprende el método del punto (xxx).

5 (xxxii) Método del punto (xxx), en donde dicho cáncer es leucemia.

(xxxiii) Un método ex-vivo para la determinación de la progresión, regresión o comienzo de una enfermedad tratada utilizando un método de tratamiento de cualquiera de los puntos (xxx) - (xxxii), que comprende (i) tomar una muestra del individuo enfermo antes y/o después del alo-trasplante, y (ii) controlar la muestra en cuanto a diferentes parámetros seleccionados del grupo que consiste en (a) una proteína, polipéptido o péptido que representa la no coincidencia de un aminoácido obtenido por el método del punto (xxvi), (b) un anticuerpo que se une de manera selectiva a dicha proteína, polipéptido o péptido, y (c) linfocitos T citolíticos que reconocen específicamente dicho péptido, polipéptido o proteína unido al complejo de molécula HLA.

10
15 (xxxiv) Un kit apropiado para detectar la presencia de la expresión de una variante alélica con un solo aminoácido no coincidente asociado a SNP que comprende un primer y un segundo paquete, cada uno de los cuales comprende una secuencia de ácido nucleico sintético o aislado de 12-32 nucleótidos que es un segmento de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha variante de aminoácido no coincidente, y complementos de co-nucleótidos, en donde el segmento del primer paquete no se superpone al del segundo paquete.

El punto (XXXIII) hace referencia al método de la invención, que se define en la reivindicación 1.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención introduce un nuevo concepto para la utilización de alo-antígenos en la terapia contra el cáncer y el trasplante en general. La definición de alo-antígenos y su reconocimiento por los linfocitos T está dada a través de epítomos de linfocitos T derivados de auto-proteínas comunes como péptidos que llevan un intercambio de un solo aminoácido y dicho intercambio se define por un SNP codificante, siempre que la variante alélica específica del epítomo de linfocitos T definida por SNP no esté expresada en el donante pero sí se exprese y presente en el receptor a través de una molécula de clase I HLA en una célula asociada a la enfermedad.

La inmunidad de los linfocitos T contra tumores, como se indicó con anterioridad ocurre de manera natural y es habitual encontrar CTL asociados a tumores que reconocen auto-antígenos en células cancerígenas. Sin embargo, mientras que cada vez más antígenos y epítomos de células T se declaran como dianas en todas las categorías de tumores, la respuesta terapéutica de linfocitos T normalmente no alcanza a ser la respuesta máxima posible y requerida y esto se debe a que el repertorio de linfocitos T funcionales que está disponible para responder a la infección, inmunización y antígenos tumorales está dado por mecanismos que establecen y mantienen tolerancia inmunológica hacia auto-antígenos y una forma de superar este estado es mediante la utilización del repertorio de linfocitos T de un individuo HLA-compatible como se propone en esta aplicación.

35 Se conoce que la prevención del ataque autoinmune contra tejidos normales requiere la eliminación de linfocitos T que expresan receptores de linfocitos T de alta afinidad por auto-antígenos durante el proceso de selección tímica del repertorio de linfocitos T. Además, otros mecanismos para establecer falta de respuesta a auto-antígenos encontrados exclusivamente fuera del timo han sido descritos y se considera que ambos sistemas juntos inducen la tolerancia a auto-antígenos. Numerosos experimentos demuestran que el encuentro de antígenos tumorales por parte de linfocitos T maduros a menudo puede dar como resultado la inducción de tolerancia debido a ignorancia inmunológica, anergia o delección física (Pardoll, 1998, Nature Med., 4: 525-531, (Staveley et al., 1998). La inducción de tolerancia incluso puede ser responsable de la evasión inmune de los tumores y finalmente ser la razón por la cual las metodologías empleadas en la actualidad para generar una respuesta de linfocitos T que sea específica al tumor in vitro e in vivo parecen ser poco fiables. Por lo tanto, no es sorprendente que la mayoría de los más de sesenta antígenos tumorales que corresponden a varios cientos de epítomos de linfocitos T conocidos en el arte no han sido útiles para inducir una respuesta inmune anti-tumor curativa y duradera en hombres.

Para superar la limitación general innata a auto-antígenos se requiere alterar el estado de tolerancia de un paciente, lo cual actualmente no es posible debido al conocimiento insuficiente del mecanismo que impulsa la tolerancia.

50 En la misma invención esta debilidad general de las estrategias actuales de vacunación contra el cáncer es superada mediante la utilización de poblaciones de linfocitos T citotóxicos que no se han eliminado y a los que no se ha inducido tolerancia mediante exposición previa a los auto-antígenos del paciente. Tales linfocitos T están disponibles a través de donantes HLA-compatibles y ya están presentes en un receptor que ha experimentado previamente un TMO alogénico o un tratamiento similar en base a sangre del cordón umbilical o células madre de sangre movilizada.

55 Mientras que el TMO alogénico es un método establecido que permite invalidar la tolerancia inmunológica, otro hallazgo indica que el trasplante TMO alogénico y/o de células madre alogénicas es la base para una terapia de

5 inmunoterapia basada en linfocitos T curativos, que ayudan a eliminar la enfermedad residual. El contexto molecular de la respuesta alogénica es parcialmente desconocido, y uno de los hallazgos importantes es, que pacientes que son sometidos al TMO alogénico están mejor que aquellos sin acceso a esta terapia. Los resultados y tasas de curación alcanzados con este método impulsado por linfocitos T están entre los resultados más impactantes vistos en inmunoterapia de cáncer y la aplicación actual se basa en este mecanismo poderoso.

Cabe destacar que bajo ciertas condiciones asociadas al trasplante de órganos el donante presenta los epítomos de linfocitos T con aminoácidos no coincidentes, polimorfos a sus propios inmunocitos y esto se produce sin un intercambio previo del sistema de células madre de sangre.

10 Un método general para la identificación de alo-antígenos como variantes alélicas de péptidos o proteínas antigénicas de una especie según esta revelación requiere la detección de intercambios de un aminoácido, y comprende los pasos de:

(i) definir una proteína o péptido que se expresa o sobreexpresa exclusivamente en un tejido, órgano o un subconjunto del mismo que se asocia a una enfermedad;

15 (ii) evaluar una base de datos que contiene una o dos librerías de ADN de dicha especie para dicho péptido o proteína definido o subconjunto del mismo, y

(iii) identificar y seleccionar intercambios de aminoácidos de variantes de proteínas/péptidos alélicos, un producto de expresión o un fragmento del mismo que es codificado por una secuencia de ADN que contiene al menos un polimorfismo de nucleótido simple en la región codificante,

20 (iv) crear epítomos de linfocitos T (de 9 mer a 16 mer) que comprenden el residuo de aminoácidos que contiene dicho polimorfismo, y

(v) identificar tales epítomos que se unen al complejo de proteínas MHC.

25 Los péptidos polimorfos con aminoácidos no coincidentes que se expresan o sobreexpresan exclusivamente en un tejido, órgano o célula que representa el tejido enfermo se caracterizan por la expresión de una o una pluralidad de no coincidencias de aminoácidos que representan las variantes alélicas de proteínas, cada una de las cuales es específica para una proteína diferente asociada a una enfermedad, y en donde dicha pluralidad es de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 4, al menos 6, al menos 7, o al menos 8, al menos 9 o al menos 10 tales agentes.

Los alo-antígenos con aminoácidos no coincidentes según esta revelación son específicos para una pluralidad de enfermedades humanas tales como LMA, ALL, LMC, enfermedad de Hodgkin, linfoma, mielodisplasia, anemia aplásica, carcinoma de células renales. Enfermedad de EICH y huésped contra injerto.

30 Las no coincidencias de un solo aminoácido de variantes alélicas de proteínas expresadas en tejidos no asociados a enfermedades y en el complejo con proteína HLA son consideradas antígenos que inducen EICH.

35 Introducir los péptidos en pacientes como UNA vacuna lleva a un estado en donde la molécula HLA de receptores al igual que las APC derivadas del donante presentan el antígeno a los linfocitos T derivados del donante (que se originan de un TMO alogénico previo). Los linfocitos T de donantes pueden expandirse y diferenciarse de células madre de sangre del donante o pueden tomarse directamente del donante y transferirse al receptor; un procedimiento que generalmente se conoce como infusión de linfocitos del donante (DLI, por sus siglas en inglés): Estos linfocitos T son activados en el paciente cuando se encuentran con los antígenos presentes en el contexto de HLA. De manera alternativa, la estimulación ex vivo de linfocitos T y su transferencia al paciente puede ser una forma alternativa de generar linfocitos T citotóxicos activados. Por otro lado, las condiciones de enfermedades asociadas por ejemplo con la inducción de tolerancia requieren la activación apropiada de los linfocitos T autólogos de los pacientes.

45 La revelación proporciona la base molecular de protocolos terapéuticos en base al TMO alogénico y define péptidos antigénicos y protocolos de inmunoterapia que inducirán una respuesta inmune curativa similar o mejor a la que se observa con los protocolos aplicados actualmente, sin embargo, realizada de manera más predecible y menos tóxica que en la actualidad. Es un elemento esencial de esta revelación que la tolerancia inmunológica es sorteada mediante la explotación del repertorio de linfocitos T de donantes HLA-compatibles. Como ya se ha mostrado con el TMO alogénico, las respuestas de linfocitos T se dirigen contra antígenos que no sean no coincidencias del tipo HLA mayor que forman parte de la respuesta EICH y ICT.

50 El análisis del intercambio de un aminoácido conservador, en una proteína asociada a enfermedad, se base en el principio general de polimorfismos heredados genéticamente que requiere la evaluación de pacientes y donantes con respecto al estado de las proteínas polimórficas. La definición de alo-antígeno de SNP codificante según esta invención implica que cada individuo lleva según las reglas mendelianas ya sea una o la otra o ambas variantes de SNP codificante de un gen y pueden expresar una o la otra o ambas variantes de proteínas con aminoácido no coincidente polimórficas caracterizadas por uno o el otro aminoácido en una posición dada de la proteína.

Las versiones alélicas de diagnóstico de alo-antígenos con aminoácidos no coincidentes pueden hacerse mediante: análisis de un producto de expresión con un aminoácido alterado, o un fragmento de un producto de expresión en el complejo con un HLA y que lleva la sustitución de un aminoácido, o mediante el contacto de muestras biológicas aisladas de un sujeto con un agente que se une de manera específica con la parte de ácido nucleico modificada por SNP, en donde la molécula de ácido nucleico que lleva SNP se expresa de manera preferente o exclusiva en células del tejido u órgano enfermo. Para realizar el análisis, el experto manipula agentes que consisten en una molécula de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico única codificante, un ácido nucleico complementario, o un fragmento del mismo y realiza estudios de hibridación con el gen diana. De manera alternativa, un anticuerpo que se une a una variante alélica con sustitución de un aminoácido en el producto de expresión puede servir a este propósito. Los agentes de anticuerpos que se unen a un complejo de una molécula HLA y un fragmento de la variante alélica con un aminoácido no coincidente también pueden utilizarse. Según el método elegido es especialmente útil realizar el análisis de la molécula de ácido nucleico modificada por SNP con muestras derivadas de tejido, u órganos o células asociadas a la enfermedad. El diagnóstico y selección de las no coincidencias de un aminoácido en proteínas asociadas a la terapia apropiada se realiza de manera preferente en simultáneo para un donante y un receptor y puede combinarse con facilidad con otro diagnóstico molecular realizado tal como tipificación de HLA. Una herramienta poderosa para evaluar no coincidencias puede generarse disponiendo el ensayo en el formato de una matriz de ADN.

Además, según esta revelación, los inmunocitos derivados de donante específicos, a saber, CTL específicos de donantes con no coincidencia en dicho aminoácido pueden reconocer en el receptor la variante de aminoácido en una posición de péptido dada y son capaces de inducir una respuesta citotóxica hacia dicha diana celular que presenta dicho péptido.

Según la presente revelación, una serie de nuevos antígenos están siendo investigados y se describen y pueden utilizarse no sólo para perfeccionar el alo-TMO e ICT sino también para el tratamiento de pacientes. Dado que el repertorio de linfocitos T de los receptores es tolerante y respectivamente borrado con respecto a la versión alélica expresada homóloga que representa el aminoácido codificado por SNP, el repertorio del donante HLA-compatible contiene de manera inusual CTL que reconocen específicamente el epítipo de linfocitos T en el contexto de moléculas HLA clase I y destruye las células que presentan. Estos llamados CTL alo-restringidos destruyen de manera selectiva células tumorales que expresan la versión alélica no coincidente de un SNP específico. Siempre que el epítipo de linfocitos T definido por SNP represente proteínas con un patrón de expresión específico de tejido, órgano o tumor restringido, puede aplicarse la revelación para la terapia anti-tumoral y el tratamiento de otras condiciones en general. Dado que numerosos antígenos tumorales expresados de manera selectiva se han descrito en la literatura, es obvio que aquellos expertos para aplicar la información de esta revelación a cualquier proteína o secuencia de ADN descrita como específica de un tumor, tejido, órgano o células.

El origen hematopoyético de la leucemia, linfoma y mieloma, el origen clonal de las células enfermas implicadas y el patrón de expresión restringida de las proteínas de grupos CD son especialmente ventajosos para demostrar el nuevo concepto. Tanto las células sanguíneas leucémicas como las proteínas conocidas como proteínas de grupos CD se origina del sistema de formación de sangre, por ejemplo, células madre de sangre. Esto hace que la leucemia, linfoma y mieloma sean enfermedades particularmente adecuadas para ser evaluadas y curadas con la ayuda de la presente revelación. Otro aspecto que hace que el tratamiento de la leucemia, linfoma y mieloma sea particularmente prometedor es el hecho de que mediante el TMO alogénico el sistema hematopoyético completo del paciente a partir de células madre de médula ósea será reemplazado por las células madre derivadas de sangre o células madre de médula ósea de donantes que después conformarán las células sanguíneas incluyendo los linfocitos implicados.

Entre las enfermedades que tienen origen cancerígeno, la leucemia es un grupo preferente de enfermedades que pueden ser tratadas conforme a esta revelación, y dentro de este grupo se espera que los pacientes con LMC se vean más beneficiados por el tratamiento, mientras que la terapia de AML y ALL son la segunda opción, aunque preferente por encima del linfoma. Entre las enfermedades hematológicas, RCC es la diana principal de la terapia y el melanoma es otra enfermedad que puede tratarse conforme a la revelación.

Según esta revelación, hasta ahora utilizamos una variabilidad molecular intrínseca inexplorada de antígenos para proporcionar conocimientos para un nuevo esquema de caracterización generalizado para alo-antígenos, definir nuevos alo-antígenos y estudiar la respuesta inmune asociada a alo-antígenos con respecto a la elusión de la EICH y al mismo tiempo el refuerzo de la respuesta ICT. Esta revelación satisface la necesidad y es un prerrequisito para desarrollar vacunas efectivas contra el cáncer y proporciona ventajas asociadas tales como supervivencia del injerto de médula ósea a largo plazo y trasplante de órgano sólido en receptores y diagnóstico del cáncer.

Realizaciones específicas de la presente revelación hacen referencia a la identificación de variantes alélicas de genes que codifican intercambios de un solo aminoácido y alo-antígenos más generales, donde dicho método comprende:

1. Realizar análisis para encontrar genes relevantes y las proteínas correspondientes, que se expresan o sobreexpresan de manera selectiva en un tejido, órgano o enfermedad dado que producen el tipo de célula y

habitualmente se expresan en menor medida o que no se expresan en tejidos u órganos normales no asociados a enfermedad.

2. Los genes preseleccionados según a) se exploran para detectar SNP ya conocidos, en donde los cambios de nucleótido simple codificante de genes individuales pueden obtenerse mediante una o más bases de datos de SNP que actualmente son accesibles ya que son de dominio público o están disponibles en el mercado.

3. Los genes preseleccionados según a) sin correlación de SNP conocida previamente en las bases de datos de ADN se exploran mediante la comparación de secuencias de ADN homólogas y detección de posiciones variables representativas del polimorfismo de proteínas y genes con un programa de alineamiento tal como BLAST.

4. Identificación de genes polimórficos que llevan SNP desconocidos mediante la realización de métodos indirectos tales como alineamiento de secuencias EST/secuencias de proteínas que abarcan los genes deseados, en donde diversas base de datos EST producen redundancia de información de secuencia con respecto a una porción de secuencia idéntica, superpuesta o porciones parcialmente idénticas de secuencias de ADN lo cual permite la identificación de SNP mediante técnicas de alineamiento de secuencia y la anotación del gen correspondiente.

5. Validación de los genes que llevan SNP relevantes a enfermedades y/o proteínas pre-analizadas según los métodos 1-4 mediante la medición de su distribución en tejidos y/u órganos.

6. Determinar si los péptidos identificados, ya sea en su longitud total o como fragmentos más cortos de los péptidos, pueden estimular linfocitos T, encontrar péptidos que contienen epítomos de linfocitos T o epítomos anidados para diferentes moléculas HLA clase I y/o HLA clase II mayor y utilizar los péptidos correspondientes para la estimulación o inhibición de linfocitos T.

Las aplicaciones diagnósticas divisadas en esta revelación incluyen, pero no se limitan al cáncer o TMO, trasplante de órganos y células madres.

Pueden utilizarse diferentes técnicas para permitir la detección de donantes o receptores adecuados, en base a la amplificación de las secuencias específicas de ácidos nucleicos o en la proteína o péptidos según se establece con posterioridad.

Según una realización, la presente invención hace referencia a un método para la tipificación de alelos de antígenos del grupo CD en una muestra que comprende la detección de nucleótidos polimórficos en el ADNc o los ácidos nucleicos genómicos de dichos alelos, más particularmente los alelos del gen individual.

En una realización preferente dicho método de tipificación será un método de tipificación de ADN genómico. De manera alternativa, dicho método también puede ser un método de tipificación de ADNc.

(a) Producir el contacto de los ácidos polinucleicos genómicos en la muestra con al menos un par de cebadores, de este modo dicho par de cebadores generan híbridos específicamente con regiones flanqueadoras que comprenden el nucleótido polimórfico en dichos alelos, y realizar una reacción de amplificación;

(b) Detectar para cada uno de dicho al menos un par de cebadores si se formó un producto de amplificación en el paso a);

(c) Inferir del resultado del paso b) qué alelo de SNP está presente en dicha muestra.

Según una realización preferente, la presente revelación hace referencia a un método como se describe con anterioridad, caracterizado porque dichos alelos de los alo-antígenos definidos por SNP son diferentes en el alelo del donante y el alelo del receptor.

Según la variabilidad de SNP del genoma humano un individuo dado lleva dos copias de un gen dado heredadas de sus padres. Las copias pueden representar un par diferentes o similar de alelos como se heredaron, por lo tanto, un experto comprende que puede utilizarse RT-PCR utilizando ARNm como plantilla o PCR estándar utilizando ADN genómico como plantilla a modo de rutina para diagnosticar variantes alélicas de aminoácidos codificadas por SNP de la presente revelación.

Las células sanguíneas con un programa genético normal o con un patrón de expresión aberrante tal como se muestra para células cancerígenas sanguíneas todas llevan las variedades habituales de moléculas expresadas en leucocitos normales en sus superficies celulares. Los marcadores de linaje y marcador de diferenciación adicional en la superficie celular de leucocitos se detectan habitualmente con anticuerpos monoclonales anti-leucocitarios y los antígenos se designan sistemáticamente mediante la asignación de un grupo de antígenos de diferenciación (CD). Diversas fuentes de información sobre este sistema están disponibles en Internet y un sitio web preferente para aquellos interesados es: <http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/Search.asp>.

La norma ampliamente aceptada para la designación formal de moléculas de superficie de leucocitos y el hecho de que las células madre de sangre forman un origen común para todas las células sanguíneas incluyendo las células cancerígenas sanguíneas hace que los antígenos CD sean los antígenos candidatos ideales según esta invención. Además, en pacientes que necesitan un trasplante de células madre alogénico todas las células que representan el sistema de células sanguíneas patológicas finalmente serán reemplazadas por un sistema de células madre derivadas de donante durante el curso de la reconstitución de un nuevo sistema hematopoyético con la consecuencia, de que todo el sistema de células sanguíneas y el sistema inmune original completos del receptor necesita ser eliminado. En este sentido, los antígenos CD representan un solo "órgano" y son sumamente útiles para reducir el concepto inventivo en esta invención en la práctica.

La presente revelación revela cómo seleccionar entre varios cientos de proteínas de leucocitos conocidas disponibles bajo el sistema CD actual, que son más representativas para ciertos tipos de cánceres hemáticos. Los antígenos CD específicos y su correlación con enfermedades se proporcionan en los ejemplos y son reconocidos y utilizados por los expertos en la materia. El análisis de proteínas CD predefinidas forma la base actual para el diagnóstico y la determinación de etapas de leucemia y linfomas. Sin embargo, es importante comprender que la invención no se limita a la pre-selección de antígenos de leucocitos dados en esta aplicación, además puede preverse cualquier tejido o proteína o grupos de proteínas expresados de manera selectiva.

En este sentido, la revelación proporciona proteínas CD que comprenden un intercambio de aminoácido inmunogénico que caracteriza la porción polimorfa de un alo-antígeno soluble y que se define a un nivel molecular mediante un SNP codificante. Dichas proteínas CD representativas de enfermedades y calificadas como alo-antígenos que llevan un intercambio de un aminoácido se resumen en la Tabla 2. Los conocimientos generales que se proporcionan en esta solicitud permiten que los expertos en el arte definan un alo-antígeno ya conocido en el arte o nuevos alo-antígenos adicionales no divulgados en el arte ni mencionados en el presente documento, por lo tanto, la invención no se limita a la selección de los alo-antígenos y los epítomos de linfocitos T que se muestran en las Tablas 2-5.

En una realización, el alo-antígeno soluble definido en la invención induce una respuesta inmune en pacientes previamente alo-trasplantados. En una segunda realización, los antígenos inducen una actividad citolítica ante su presentación en el contexto de una molécula HLA. Las secuencias de aminoácidos especialmente útiles para la inmunización y la inducción de citólisis pueden seleccionarse del grupo que consiste en las secuencias incluidas en las Tablas 3-5 y variantes de las mismas. Sin embargo, como se indicó con anterioridad el procesamiento de alo-antígenos puede ser bastante variable in vivo y la extensión N-terminal y/o C terminal del aminoácido que representa el intercambio puede variar considerablemente de las secuencias en las Tablas. El experto en el campo conoce cómo analizar la variabilidad de HLA y correlacionar la variabilidad a un nivel de péptido de unión a HLA y a un nivel de predicción de péptido de unión a HLA.

En otra realización, el alo-antígeno soluble definido por la presente revelación induce una respuesta inmune en pacientes que es fundamental para la inducción de tolerancia inmunológica. La inducción de tolerancia inmunológica es particularmente útil para el antígeno asociado con EICH, que ha sido definido como polimorfo y expresado ampliamente en diversos tejidos y órganos tales como pulmón, hígado, intestinos, articulaciones, etc. Las secuencias de aminoácidos especialmente útiles para la inmunización y para la inducción de tolerancia pueden seleccionarse del grupo que consiste en secuencias de mHAg indicadas en la Tabla 1 A, B y secuencias HLA enumeradas en la Tabla 6 y variantes de las mismas. Los antígenos HLA son conocidos en el arte y se definen como antígeno mayor que impulsa una reacción alo-inmune. Además, las porciones antigénicas dentro de las moléculas están bien documentadas y están disponibles diversos tipos de agentes de detección. Sin embargo, las moléculas HLA se han incluido en esta invención ya que los epítomos enumerados en la Tabla 6 han sido detectados de regiones de proteínas fuera de las regiones antigénicas hipervariables, que habitualmente se utilizan para el apareamiento de la molécula HLA. Por lo tanto, estos antígenos deben considerarse como intercambios de aminoácidos codificados por SNP como se define en esta invención. Los epítomos de linfocitos T normalmente se utilizarían para prevenir la EICH asociada al trasplante de órganos y células madres.

En otra realización, el alo-antígeno que comprende un intercambio de aminoácidos inmunogénico se caracteriza por las secuencias de ADN que codifican polipéptidos inventivos, entre otros, moléculas de ácidos nucleicos aislados, vectores de expresión que contienen aquellas moléculas y células huéspedes transformadas o transfectadas con aquellas moléculas.

La presente revelación también proporciona proteínas aisladas, péptidos y anticuerpos de aquellas proteínas y péptidos y CTL, que reconocen las proteínas y péptidos. Los fragmentos que incluyen fragmentos funcionales y variantes de lo siguiente también se proporcionan. Además, se proporcionan kits que contienen las siguientes moléculas. Lo siguiente puede utilizarse en el diagnóstico, control, investigación o tratamiento de condiciones caracterizadas por la expresión de uno o más alo-antígenos asociados al cáncer. Antes de la presente invención, sólo pocos genes que codifican alo-antígenos tales como los genes asociados a mHAg habían sido identificados.

En otro aspecto, la presente revelación proporciona proteínas de fusión que comprenden un primer y un segundo epítomo de linfocitos T divulgado o, de manera alternativa, un polipéptido divulgado y un antígeno tumoral conocido, de un epítomo foráneo que hace que el epítomo divulgado sea inmunogénico.

La presente revelación incluye la utilización de un solo material, una pluralidad de materiales diferentes e incluso grandes paneles y combinaciones de materiales. Por ejemplo, un solo gen que lleva el SNP, una sola proteína codificada por dicho gen, un solo fragmento funcional del mismo, un solo anticuerpo para el mismo, etc. puede utilizarse en métodos y productos de la revelación. Del mismo modo, pares, grupos e incluso paneles de estos materiales y de manera opcional otros genes que codifican alo-antígenos asociados al cáncer y/o productos génicos o antígenos tumorales convencionales pueden utilizarse para el diagnóstico, control y terapia. Los pares, grupos o paneles pueden incluir 2, 3, 4, 5 o más genes, productos génicos, fragmentos de los mismos o agentes que reconocen tales materiales. Una pluralidad de tales materiales no sólo son útiles en el control, tipificación, caracterización y diagnóstico de células que expresan productos génicos modificados codificados por SNP, sino también una pluralidad de tales materiales pueden utilizarse de manera terapéutica.

Un ejemplo de esto es la utilización de una pluralidad de tales materiales de manera profiláctica o intensa para la prevención, retardo del comienzo, mejoramiento, etc. de cáncer en células, que expresen o expresarán tales genes. Todas las combinaciones de genes, productos génicos y materiales, que reconocen los genes y productos génicos pueden ser evaluadas e identificadas para la utilización según la revelación. Sería demasiado extenso indicar todas las combinaciones; los expertos en el arte, en particular en vista de los conocimientos obtenidos en la presente, podrán determinar qué combinaciones son más apropiadas para qué circunstancias.

Como quedará claro a partir de la siguiente discusión, la presente revelación tiene utilidades in vivo e in vitro, incluyendo para fines terapéuticos, diagnósticos, de control e investigación. Un aspecto de la revelación es la capacidad de identificar una célula que expresa una serie de genes identificados según la invención mediante, por ejemplo, la cuantificación de la expresión de tales productos génicos. Tales identificaciones serán características por ejemplo de la predicción del efecto de ICT y EICH en modelos animales para un terapia contra el cáncer. Las células pueden ser analizadas para determinar si tales células expresan genes modificados por SNP identificados según la invención.

La presente revelación, en un aspecto, es un método para el diagnóstico de un antígeno alogénico terapéuticamente relevante y asociado al cáncer codificado por una molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante. El método incluye los pasos de contactar una muestra biológica aislada de un sujeto enfermo con un agente que se une específicamente a la molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante, un producto de expresión del mismo o un fragmento de un producto de expresión del mismo en complejo con una molécula MHC, preferentemente una molécula HLA, en donde la molécula definida por un SNP codificante puede seleccionarse de un alo-antígeno que se indica en la Tabla 1-6 en forma de la molécula de ácido nucleico, y utilizado para determinar la interacción entre el agente y la molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante, el producto de expresión o fragmento del producto de expresión del mismo.

Otro aspecto es un método para el diagnóstico de un antígeno alogénico terapéuticamente relevante y asociado al cáncer codificado por una molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante. El método incluye los pasos de contactar una muestra biológica aislada de un sujeto que se considera un donante apropiado para un TMO, con un agente que se une específicamente a la molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante, un producto de expresión del mismo o un fragmento de un producto de expresión del mismo en complejo con una molécula MHC, preferentemente una molécula HLA, en donde la molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante se selecciona de un alo-antígeno que se indica en la Tabla 1-6 en forma de la molécula de ácido nucleico, y determinar la interacción entre el agente y la molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante, el producto de expresión o fragmento del producto de expresión. En otra realización la molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante o un fragmento de péptido del mismo, puede seleccionarse con un anticuerpo. Un fragmento del producto de expresión con un aminoácido modificado en el complejo con una molécula MHC, preferentemente HLA, puede ser detectado con un anticuerpo o de manera alternativa el péptido del complejo HLA puede utilizarse directamente para el diagnóstico y activación o inhibición de células.

Los trastornos pueden caracterizarse mediante la expresión de una pluralidad de precursores de antígenos asociados al cáncer que llevan genes modificados por SNP codificante. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico pueden incluir la utilización de una pluralidad de agentes, cada uno de los cuales es específico para un SNP asociado a un cáncer humano diferente que lleva un precursor de antígeno (incluyendo al menos uno de los precursores de antígeno asociados al cáncer divulgados en el presente documento), y en donde dicha pluralidad de agentes es de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 tales agentes. En cada una de las realizaciones anteriores, el agente puede ser específico para un precursor de antígeno asociado a una enfermedad humana preferentemente cáncer, incluyendo precursores de antígenos asociados al cáncer hemático o renal divulgados en el presente documento.

La presente invención hace referencia a un método para determinar la regresión, progresión o comienzo de una condición caracterizada por la expresión de una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que lleva un SNP que se selecciona de un alo-antígeno según la Tabla 1-6. El método incluye los pasos de controlar la muestra, de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la condición, para detectar un parámetro seleccionado del grupo que consiste en (i) la proteína, (ii) un péptido derivado de la proteína, (iii) un anticuerpo que se une de manera selectiva a la proteína o al péptido, y (iv) linfocitos T específicos para un complejo del péptido derivado de la proteína y una molécula MHC/HLA, tal como una determinación de regresión, progresión o comienzo de dicha condición. En una

realización la muestra es un fluido corporal, una efusión corporal o un tejido. En otra realización, el paso de control comprende contactar la muestra con un agente detectable seleccionado del grupo que consiste en (a) un anticuerpo que se une de manera selectiva a la proteína de (i), o al péptido de (ii), (b) una proteína o un péptido que se une al anticuerpo de (iii), y (c) una célula que presenta el complejo del péptido y la molécula MHC de (iv). En una realización preferente, el anticuerpo, la proteína, el péptido o la célula se etiqueta con una molécula detectable, tal como una etiqueta radioactiva o una enzima. La muestra en una realización preferente se analiza en cuanto al péptido.

En otra realización la proteína es una pluralidad de proteínas, el parámetro es una pluralidad de parámetros, cada uno de la pluralidad de parámetros es específico para una proteína diferente de la pluralidad de proteínas.

La presente revelación en otro aspecto es una preparación farmacéutica para un sujeto humano. La preparación farmacéutica incluye un agente que cuando se administra al sujeto enriquece de manera selectiva la presencia de complejos de una molécula HLA y un alo-antígeno asociado al cáncer humano modificado por SNP codificante, y un portador farmacéuticamente aceptables, en donde el alo-antígeno asociado al cáncer humano es un fragmento de un precursor de alo-antígeno asociado al cáncer humano codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende moléculas de ácido nucleico que llevan un SNP codificante seleccionado de una lista de alo-antígenos según la Tabla 1-6.

En una realización la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que lleva un alo-antígeno inventivo de la lista según la Tabla 1-6. El agente en una realización comprende una pluralidad de agentes, cada uno de los cuales enriquece de manera selectiva en los complejos de una molécula HLA del sujeto y un alo-antígeno asociado al cáncer humano codificado por SNP diferente. De manera preferente, la pluralidad es de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco de tales antígenos diferentes. En otra realización, el agente se selecciona del grupo que consiste en (1) un polipéptido aislado que comprende el alo-antígeno asociado al cáncer humano, o una variante funcional del mismo, (2) un ácido nucleico aislado operable unido a un promotor para la expresión del polipéptido aislado, o variante funcional del mismo, (3) una célula huésped que expresa el polipéptido aislado, o variante funcional del mismo, y (4) complejos aislados del polipéptido, o variantes funcionales del mismo, y una molécula HLA. El agente puede ser una célula que expresa un polipéptido aislado.

En una realización, el agente es una célula que expresa un polipéptido aislado que comprende el alo-antígeno asociado al cáncer humano o una variante funcional del mismo. En otra realización, el agente es una célula que expresa un polipéptido aislado que comprende el alo-antígeno asociado al cáncer humano o una variante funcional del mismo, en donde la célula expresa una molécula HLA que se une al polipéptido. La célula puede expresar uno o ambos polipéptidos y moléculas HLA como variantes recombinantes. En realizaciones preferentes, la célula no es proliferativa.

En otra realización, el agente es al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco polipéptidos diferentes, cada uno de los cuales representa un alo-antígeno asociado al cáncer humano diferente o una variante funcional del mismo.

En otra realización, el agente es una pluralidad de agentes diferentes que se unen de manera selectiva a al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco tales polipéptidos diferentes que representan el cambio de aminoácido. En cada una de las realizaciones antes descritas el agente puede ser un anticuerpo. En otro aspecto, la invención es una composición de materia compuesta por un conjugado de un agente de las composiciones antes descritas de la invención y un agente terapéutico o diagnóstico. Preferentemente, el conjugado es del agente y un agente terapéutico o diagnóstico que es un anti-neoplásico.

En otro aspecto, la revelación hace referencia a una composición farmacéutica, que incluye una molécula de ácido nucleico aislado seleccionada de la Tabla 2 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislado representa una molécula seleccionada de la Tabla 3 y/o 4. En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende al menos dos moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican dos polipéptidos diferentes, cada polipéptido comprende un alo-antígeno asociado al cáncer diferente. Preferentemente, la composición farmacéutica también incluye un vector de expresión con un promotor enlazado a la molécula de ácido nucleico aislado. En otra realización, la composición farmacéutica también incluye una célula huésped que expresa la molécula de ácido nucleico aislada recombinante. Según otro aspecto de la revelación, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un polipéptido aislado seleccionado de la Tabla 2 a 6 que representa un alo-antígeno único, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, los polipéptidos aislados representan un alo-antígeno. En otra realización, los polipéptidos aislados representan al menos dos proteínas diferentes, cada una de las cuales comprende un alo-antígeno asociado al cáncer diferente codificado por genes modificados por SNP como se divulga en la presente invención. En una realización, cada una de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención también incluyen un coadyuvante.

En otra realización, el fragmento seleccionado de la Tabla 2 a la 6 es de al menos: 8 nucleótidos, 10 nucleótidos, 12 nucleótidos, 14 nucleótidos, 16 nucleótidos, 18 nucleótidos, 20, nucleótidos, 22 nucleótidos, 24 nucleótidos, 26 nucleótidos, 28 nucleótidos, nucleótidos, 50 nucleótidos, 75 nucleótidos, 100 nucleótidos, 200 nucleótidos, 1000 nucleótidos y toda longitud de enteros entre ellos. En otra realización la molécula codifica un polipéptido o un

fragmento el mismo, se une a un receptor HLA humano o un anticuerpo humano. Otro aspecto de la revelación es un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislado de la revelación antes descrita enlazada a un promotor. Según un aspecto, la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico enlazado operablemente a un promotor, en donde el ácido nucleico es una molécula modificada por SNP.

5 En otro aspecto, la revelación es un vector de expresión que comprende una molécula modificada por SNP y un ácido nucleico que codifica un MHC, preferentemente una molécula HLA. En otro aspecto, la revelación es una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión de la revelación antes descrita. En otro aspecto, la revelación es una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de la invención antes descrita enlazada operablemente con un

10 promotor, o un vector de expresión que comprende un ácido nucleico enlazado operablemente con un promotor, en donde el ácido nucleico es una molécula SNP modificada y además comprende un ácido nucleico que codifica HLA.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para hacer los ácidos nucleicos descritos en la presente invención y polipéptidos codificados de este modo. En algunas realizaciones, los métodos incluyen el cultivo de células huésped y el aislamiento del ácido nucleico o polipéptido de las células huésped o medio de cultivo. En otras realizaciones,

15 los métodos incluyen proporcionar un sistema libre de células para la transcripción y/o traslación de un ácido nucleico, tal como una transcripción y/o traslación libre de células en un lisado de reticulocitos de conejo o extracto de germen de trigo. El sistema más avanzado disponible para la producción de proteínas según esta invención, sin embargo, aprovecharía el sistema de fábrica de células "cell factory" suministrado por Roche Diagnostics. En otro aspecto de la revelación, los métodos también incluyen la introducción del ácido nucleico o vector de expresión en el

20 sistema libre de células, la incubación del sistema bajo condiciones suficientes para la transcripción o traslación del ácido nucleico y el aislamiento del ácido nucleico transcrito o polipéptido traducido del sistema libre de células. Según otro aspecto de la revelación, se proporcionan los polipéptidos aislados codificados por las moléculas de ácido nucleico aisladas de la revelación, antes descritas. La revelación también incluye un fragmento de los polipéptidos seleccionados de las moléculas que se indican en la Tabla 1-6 que es inmunogénico. En una realización, el

25 fragmento o una porción del fragmento, se une a HLA o un anticuerpo humano. La revelación incluye en otro aspecto un fragmento aislado de un precursor de antígeno asociado al cáncer humano que, o una parte del mismo, se une a HLA o a un anticuerpo humano, en donde el precursor es codificado por una molécula de ácido nucleico que lleva un SNP codificante, que se selecciona de una molécula que aparece en la Tabla 1-6. En una realización, el fragmento es parte de un complejo con HLA. En otra realización, el fragmento tiene entre 8 y 12 aminoácidos de

30 largo. En otra realización, la revelación incluye un polipéptido aislado que comprende un fragmento del polipéptido de la suficiente longitud para representar una secuencia única dentro del genoma humano e identificar un polipéptido que es un precursor de un antígeno asociado al cáncer humano. Según otro aspecto de la revelación, se proporciona un kit para detectar la presencia de la expresión de un precursor de un alo-antígeno asociado al cáncer. El kit incluye un par de moléculas de ácido nucleico aisladas representativas de ambas versiones alélicas del gen.

35 En otro enfoque de la revelación, pueden generarse inmunocitos in vitro mediante el cultivo de linfocitos con péptidos seleccionados de las moléculas que figuran en las Tablas 2 a 5 que representan el intercambio de aminoácidos inmunogénico del alo-antígeno y en donde la versión alélica corresponde a la versión expresada por las células tumorales del paciente. Mediante la utilización de los alo-antígenos según tal procedimiento los linfocitos T coadyuvantes y citotóxicos del donante que reconocen un antígeno único con cambios de un aminoácido pueden

40 generarse in vitro mediante un método que previene la reactividad de los linfocitos T ante los posibles antígenos de histocompatibilidad del huésped, dejando una población de linfocitos T específicos a tumores alo-reactivos. Otro enfoque, que podría utilizarse en pacientes con o sin un hermano histocompatible, comprende regímenes de condicionamiento bien tolerados que producen la inmunosupresión con respecto a los alo-antígenos que inducen EICH definidos según esta invención sin ablación de la médula ósea.

45 Estos procedimientos podrían mejorar de manera considerable los estudios clínicos recientemente informados que han utilizados el trasplante de células madre no mieloablativo para otras indicaciones, incluyendo tumores sólidos y trasplante de órganos sólidos. Cuando el enfoque se utiliza por ejemplo para el tratamiento del cáncer, el receptor recibe células madre hematopoyéticas con depleción de linfocitos T, que el receptor no rechazará, seguido de la administración de números gradualmente mayores de linfocitos T del donante (o linfocitos T específicos a tumores),

50 que han sido cuidadosamente estimulados en cuanto al reconocimiento de alo-antígenos. Mediante este enfoque es particularmente útil expandir los linfocitos T del donante con la ayuda de péptidos de unión a HLA que representan el intercambio de aminoácidos inmunogénicos del alo-antígeno con péptidos tomados de la Tabla 2 a 5 ya sea ex vivo o in situ para promover la reactividad anti-tumores de los linfocitos T. Pueden obtenerse suficiente cantidad de CTL para fines de inmunoterapia adoptiva y en conclusión esto permite una terapia novedosa para el tratamiento de la leucemia recurrente después del TMO, con un mínimo riesgo de inducir EICH.

55

También es posible manipular los linfocitos de donante específicos a alo-antígeno (que reconoce una modificación de un aminoácido) in vitro mediante la inserción de un gen suicida conocido en el arte, tal como el gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex. Esto proporciona al médico la posibilidad de destruir linfocitos infundidos en

60

Otro enfoque comprende la inmunización previa al trasplante de donantes de TMO alogénico con una vacuna de alo-antígeno contra el cáncer con un solo aminoácido modificada definida por el receptor que incrementa la actividad de ICT sin exacerbar EICH debido al condicionamiento de los linfocitos T del donante contra los posibles antígenos

modificados en un solo aminoácido sólo en las células tumorales. En resumen, la invención ayuda a evitar la toxicidad y mortalidad asociada al TMO y/u otros procedimientos asociados al trasplante.

Las situaciones que requieren la vacunación con estos alo-antígenos se caracterizan preferentemente sólo por la carga tumoral baja y transferencia adoptiva con linfocitos T específicos de tumor en casos de una carga tumoral más alta. Sin embargo, el resultado de la inmunización con vacunas que contienen epítomos de CTL tumorales depende en gran medida del modo de administración del epítomo. De manera sorprendente, la vacunación con epítomos de unión de MHC clase I puede provocar tolerancia de CTL asociada a un crecimiento tumoral mayor en lugar de inmunidad. Estos resultados indican la posibilidad de utilizar la vacunación para inducir tolerancia con respecto a los alo-antígenos que inducen EICH. Por otro lado, para evitar la inducción de tolerancia la modulación de APC es una estrategia prometedora para mejorar la respuesta a la inmunización (Sotomayor, 1999). Una descripción detallada de protocolos de inmunización útiles con alo-antígenos se divulga en la parte experimental de esta invención.

Con respecto a los receptores de trasplantes con genotipo HLA idéntico, las disparidades en alo-antígenos se definen según esta invención por llevar el intercambio de aminoácidos codificado por SNP. La identificación genómica del locus de alo-antígenos definidos por SNP, puede realizarse mediante métodos de PCR alelo-específicos. Las diferencias entre el donante y el receptor generalmente se analizan mediante dos conjuntos de cebadores diferentes. Cada conjunto de cebadores consiste en cebadores alelo-específicos y cebadores comunes, y ambos conjuntos de cebadores pueden contener secuencias intrónicas.

Los productos alelo-específicos previstos pueden correlacionarse en todos los casos con el intercambio de aminoácido codificado por SNP detectado mediante métodos bioquímicos, por anticuerpos mediante CTL o por RT-PCR. Como se ha demostrado a lo largo de esta invención, la identificación de nuevos alo-antígenos adicionales codificados por SNP puede ser utilizada para el futuro genotipado para los alelos de alo-antígenos codificados por SNP y mejorará la selección de donantes e identificará receptores de TMO con respecto a un riesgo alto o bajo de EICH y ICT mejorada. Los SNP según este objeto pueden detectarse en una forma secuencia-específica, mediante hibridación, extensión de cebador o enfoque de ligamiento de ADN. Los expertos en el arte seleccionarán un enfoque adecuado como se enumera a continuación y realizarán un análisis de antígenos según procedimientos de operación estándares específicos para el enfoque individual.

1. El enfoque de hibridación se basa en dos sondas alelo-específicas que se hibridizan a la secuencia diana sólo cuando coinciden perfectamente. Bajo condiciones de ensayo optimizadas, la diferencia de una base es suficiente para desestabilizar la hibridación para prevenir el alineamiento de la sonda alélica con la secuencia diana. Cuando las sondas alelo-específicas son inmovilizadas en un soporte sólido, las muestras de ADN diana etiquetadas son capturadas y el evento de hibridación se visualiza mediante la detección de la etiqueta después de eliminar las dianas no enlazadas.

2. La extensión del cebador es otro mecanismo sólido de discriminación de alelos. Es sumamente flexible y requiere el menor número de cebadores/sondas. El diseño de la sonda y optimización del ensayo habitualmente son muy sencillos. Existen numerosas variaciones en el enfoque de extensión del cebador que se basan en la habilidad de la polimerasa de ADN de incorporar deoxiribonucleosidos específicos complementarios a la secuencia del ADN plantilla, sin embargo, pueden agruparse en dos categorías.

En más detalle la identidad de la base polimórfica en el ADN diana se determina mediante la incorporación del nucleótido alelo-específico seguida de secuenciación. Al utilizar un enfoque PCR alelo-específico, la ADN polimerasa se utiliza para amplificar el ADN diana sólo si los cebadores PCR son perfectamente complementarios con la secuencia de ADN diana. Se han diseñado una serie de formas ingeniosas para analizar el producto de extensión del cebador en ensayos homogéneos. La mayoría de estos enfoques combina análogos ácidos nucleicos novedosos y el control de diferencias interesantes en propiedades físicas entre reactivos de partida y productos de extensión del cebador. En el enfoque PCR alelo-específico, uno se basa en que la ADN polimerasa extiende un cebador sólo cuando su extremo 3' es perfectamente complementario a la plantilla. Cuando se cumple esta condición, se produce un producto de PCR. Al determinar si se produce un producto de PCR o no, uno puede inferir el alelo encontrado en el ADN diana. Se han utilizado varios enfoques innovadores para detectar la formación de productos de PCR en ensayos homogéneos. Algunos se basan en el análisis de curvas de fusión, y algunos se basan en hibridación de sondas específicas para dianas. Una variación de este enfoque es la extensión de cebador alelo-específica. Aquí, el producto de PCR que contiene el sitio polimórfico sirve como plantilla, y el extremo 3' de la sonda de extensión del cebador consiste en la base alélica. El cebador se extiende sólo si la base 3' es complementaria al alelo presente en el ADN diana. El control del evento de extensión del cebador, por lo tanto, permite inferir el alelo o alelos encontrados en la muestra de ADN.

La ADN ligasa es sumamente específica en la reparación de mellas en la molécula de ADN. Cuando dos oligonucleótidos adyacentes son alineados a una plantilla de ADN, se ligan juntos sólo si los oligonucleótidos coinciden perfectamente con la plantilla en la unión. Los oligonucleótidos alelo-específicos pueden, por lo tanto, interrogar la naturaleza de la base en el sitio polimórfico. Es posible inferir el alelo o alelos presentes en el ADN diana determinando de si ha ocurrido el ligamiento. Aunque el ligamiento tiene el nivel más alto de especificidad y es más fácil de optimizar entre todos los mecanismos de discriminación alélica, es la reacción más lenta y requiere el

mayor número de sondas modificadas. Sin embargo, el ligamiento como mecanismo tiene el potencial de la genotipificación sin amplificación previa de diana mediante PCR.

La detección de un producto de reacción alélica positivo se realiza mediante el control de luz emitida, o la medición de la masa de productos, o detección de un cambio en la propiedad eléctrica cuando se forman los productos.

5 Glosario

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos utilizados con frecuencia con anterioridad en el presente documento.

El alo-reactivo es el término utilizado para describir los epítomos de linfocitos T polimorfos diferentes entre los individuos que son reconocidos específicamente por los linfocitos T.

- 10 Los "anticuerpos" tal como se utilizan en el presente documento incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, de cadena simple y humanizados, así como también fragmentos Fab, incluyendo los productos de un Fab u otra genoteca de expresión de inmunoglobulina.

- 15 Las "proteínas CD" son marcadores de superficies específicos a un ligamiento, que se producen por el programa genético normal de las células o por patrones de expresión aberrante que son patológicos. Las proteínas CD habitualmente son asignadas a células derivadas de origen hematopoyético. Los marcadores celulares se designan según una nomenclatura estándar que define los Grupos de Diferenciación (CD, por sus siglas en inglés) por consenso científico. Las proteínas CD son detectadas por un proceso que combina reactivos inmunológicos mono-específicos con etiquetado fluorescente y un citómetro de flujo para contar y analizar las poblaciones celulares. Las células se clasifican por tamaño, reactividad del marcador, clonalidad y proporción. El procedimiento es
20 ampliamente utilizado en el diagnóstico, pronóstico, evaluación de enfermedades residuales, control terapéutico y manejo de casos de leucemia, linfomas, y enfermedades relacionadas y es conocido por los expertos en el arte. Pueden analizarse una variedad de tejidos y fluidos corporales. Para garantizar la calidad y utilidad clínica de las interpretaciones, todos los datos citométricos se interpretan en el contexto de una revisión microscópica del espécimen.

- 25 La "inmunofenotipificación" de los marcadores de cáncer normalmente incluye un procedimiento de tinción de dos pasos. En el primer paso, los mAAb murinos específicos a antígeno como se enumeran con anterioridad se agregan a las células. La unión de los mAAb se evalúa mediante una técnica de inmunofluorescencia que utiliza antisueros de anti-Ig de ratón conjugados con FITC. La distribución de los antígenos se analiza mediante citometría de flujo o microscopía. Los resultados de la inmunotipificación habitualmente están disponibles dentro de las 24 horas
30 después de la recepción de la muestra; y proporcionan porcentajes de marcadores citométricos. Los niveles de expresión de marcadores y morfológicos (intensidad) también pueden evaluarse y describirse cuando sean relevantes. La intensidad de la expresión del antígeno puede variar entre pasajes y puede verse influenciada por las condiciones del cultivo celular.

- 35 El término "aislado" significa alterado "mediante la mano humana" de su estado natural, es decir, si ocurre en la naturaleza, ha sido cambiado o extraído de su ambiente natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente en un organismo viviente no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según se emplea el término en la presente invención. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo mediante transformación, manipulación genética o cualquier otro método recombinante está "aislado" incluso si sigue estando presente en
40 dicho organismo, organismo que puede o no ser un organismo viviente.

- El término "polinucleótido" hace referencia en general a cualquier poliribonucleótido (ARN) o polideoxiribonucleótido (ADN), que puede ser ARN o ADN modificado o no modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, pero no se limitan a, ADN de cadena simple y doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena simple y doble, ARN de cadena simple y doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena simple y doble, moléculas híbridas que
45 comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena simple o, más habitualmente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena simple y doble. Además, el término "polinucleótido" hace referencia a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o ambos ARN y ADN. El término "polinucleótido" también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con estructuras principales modificadas para proporcionar estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales
50 tales como inosina. Pueden realizarse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, el término "polinucleótido" incluye formas modificadas de manera química, enzimática o metabólica de polinucleótidos como se los encuentra habitualmente en la naturaleza, y también formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. El término "polinucleótido" también abarca los polinucleótidos relativamente cortos, a menudo conocidos como oligonucleótidos.

- 55 El término "polipéptido" hace referencia a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos unidos uno al otro mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos. El término "polipéptido" hace referencia a cadenas cortas, comúnmente conocidas como péptidos, oligopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente conocidas como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos

que no sean los 20 aminoácidos codificados por genes. Los "polipéptidos" incluyen secuencias de aminoácidos modificados mediante procesos naturales, tales como procesamiento pos-traslacional, o mediante técnicas de modificación química que son conocidas en el arte. Tales modificaciones se describen en textos básicos y en más detalle en monografías, y también en una voluminosa literatura de investigación. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier lugar en un polipéptido, incluyendo la estructura principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y terminales de amino o carboxil. Cabe destacar que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o en diferentes grados en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado del proceso de ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales de pos-traslación o pueden realizarse utilizando métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, biotilación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gama-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas como arginilación o ubiquitinación (véase, por ejemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and no protein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, y Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

El "fragmento" de una secuencia de polipéptidos hace referencia a una secuencia de polipéptidos que es más corta que la secuencia de referencia pero retiene esencialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido de referencia. El "fragmento" de una secuencia de polinucleótidos hace referencia a una secuencia de polinucleótidos que es más corta que la secuencia genética de referencia.

El término "variante" hace referencia a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia pero conserva las propiedades esenciales del mismo. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios en el nucleótido pueden producir sustituciones de aminoácidos, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute con posterioridad. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. En general, las alteraciones se limitan de modo tal que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son muy similares en general, y en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en una secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, inserciones y eliminaciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no ser uno codificado por el código genético. Las sustituciones conservadoras habituales incluyen Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe y Tyr. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ocurrir de manera natural tal como un alelo, o puede ser una variante que no ocurre de manera natural hasta donde se conoce. Las variantes de polinucleótidos o polipéptidos que no ocurren de manera natural pueden producirse por técnicas de mutagénesis o síntesis directa. También se incluyen, como variantes, los polipéptidos que tienen una o más modificaciones pos-traslacionales, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación y similares. Las realizaciones incluyen metilación del aminoácido terminal N, fosforilaciones de serinas y treoninas y modificación de glicinas C-terminal.

El término "alelo" hace referencia a una o más formas alternativas de un gen que ocurre en un locus dado en el genoma. Dado que los mamíferos son organismos diploides, el gen se representa dos veces y tenemos pares de cromosomas. Dos genes en un locus particular, en cromosomas hermanos apareados, controlan una característica particular y se denominan alelos. En humanos los cromosomas apareados pueden tener alelos diferentes. Si cada gen se expresa, en una situación heterocigota, se dice que son co-dominantes y se producen dos productos génicos diferentes o alo-antígenos. Si cada gen se expresa, en una situación homocigota, sólo se produce un producto génico.

Dos o más individuos (o cepas) se indican como alogénicos uno al otro cuando los genes en uno o más loci no son idénticos en secuencia en cada organismo. Habitualmente se especifica alogénico con referencia al locus o loci implicado.

Los individuos de una especie considerados alogénicos representan una diferencia alogénica que puede causar una respuesta inmune al alo-injerto. Los antígenos afectados a menudo se conocen como alo-antígenos.

Los "alo-antígenos" son representados por dos grupos de productos de genes de histocompatibilidad. Éstos se observaron como antígenos de mayor y menor histocompatibilidad. Los antígenos de histocompatibilidad mayor estimulan formas intensas, rápidas y agudas de rechazo al injerto y están representados por las proteínas HLA clase

I y II. Los antígenos de histocompatibilidad menor estimulan reacciones menos intensas, lentas y crónicas y representan un grupo de proteínas funcionalmente heterogéneo. Los anticuerpos monoclonales para un solo epítipo pueden producirse y se ha desarrollado un panel de anticuerpos monoclonales diferentes específicos para diferentes antígenos HLA que permite la tipificación serológica de tejido.

- 5 El término "polimorfismo" hace referencia a una variación en la secuencia de nucleótidos (y secuencia polipeptídica codificada, si es relevante) en una posición dada en el genoma dentro de una población.

El "polimorfismo de nucleótido simple" (SNP) hace referencia a la ocurrencia de variabilidad de nucleótido en una sola posición de nucleótido en el genoma, dentro de una población. Un SNP puede ocurrir dentro de un gen o dentro de regiones intergenéticas del genoma. Se han empleado muchos métodos para la detección de SNP introducidos por mutaciones. Por ejemplo, se ha descrito un ensayo de alta sensibilidad para genes mutantes *ras* y su aplicación al estudio de genotipos en casos de presentación y recidiva de leucemia aguda (Oncogene 9, 1994, 553-563). Los dos métodos más utilizados son amplificación alelo-específica (ASA, por sus siglas en inglés) y PCR enriquecida por mutantes (ME-PCR, por sus siglas en inglés). Para el proceso de ASA se requieren al menos 3 cebadores. Un cebador común se utiliza en complemento inverso al polimorfismo analizado. Este cebador común puede estar a entre 50 y 1500 bps de la base polimórfica. Los otros dos (o más) cebadores son idénticos entre sí salvo en que la base 3' final se mueve para combinarse con uno de los dos (o más) alelos que conforman el polimorfismo. Dos (o más) reacciones PCR se conducen después en ADN de muestra, cada una utilizando el cebador común y uno de los cebadores alelo-específicos. Para detectar SNP codificantes heredados asociados especialmente a la leucemia no hay un límite habitual con respecto a un pequeño porcentaje de SNP que llevan células en un gran contexto de células normales como es el caso de las células cancerígenas en general. Por otro lado cuando se analizan células sanguíneas, detectar un alelo SNP en un contexto de 104-106 alelos no coincidentes puede ser útil al analizar pacientes después del trasplante para detectar una enfermedad recurrente. Se han descrito ensayos de alta sensibilidad y específicos para la detección de SNP (Sidransky, Science 278, 1997, 1054-1058, Ahrendt et al., J. Natl. Cancer. Inst. 91, 1999, 332-339).

- 25 Un aspecto importante con respecto a la presente invención puede ser la necesidad de realizar tales ensayos en una forma automatizada y de alto rendimiento para permitir el análisis a gran escala (Dong et al., J. Natl. Cancer Inst. 93, 2001, 858-865, Ahlquist et al., Gastroenterology 119, 2000, 1219-1227, Ahrendt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1999, 7382-7387).

El término "Splice Variant" (variante derivada de un empalme) como se lo utiliza en la presente invención hace referencia a moléculas de ADNc producidas a partir de moléculas de ARN inicialmente transcritas de la misma secuencia de ADN genómico pero que han sido sometidas a empalme de ARN alternativo. El empalme de ARN alternativo ocurre cuando una transcripción primaria de ARN es sometida a empalme, en general para la eliminación de intrones, lo cual da como resultado la producción de más de una molécula de ARNm, cada una de las cuales puede codificar diferentes secuencias de aminoácidos. El término "splice variant" también hace referencia a las proteínas codificadas por las moléculas de ADNc antes indicadas.

Los términos "identidad" y "similitud" reflejan una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinados al comparar las secuencias de longitud muy similar, o incluso longitudes definidas más cortas, (llamado alineamiento local), que es más adecuado para secuencias de longitud diferente.

- 40 Los métodos para la comparación de la identidad y similitud de dos o más secuencias son conocidos en el arte. Por ejemplo, los programas disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395,

Preferentemente, la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S and Henikoff J G, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, 1992) se utiliza en las comparaciones de secuencias de polipéptidos incluyendo donde las secuencias de nucleótidos se traducen primero en secuencias de aminoácidos antes de la comparación.

La secuencia de polinucleótidos que tiene un Índice de Identidad de 0,95 en comparación con una secuencia de polinucleótidos de referencia, un promedio de hasta 5 en cada 100 de los nucleótidos de los que hay en la secuencia de referencia puede eliminarse, sustituirse o insertarse, o cualquier combinación de éstos, como se describe con anterioridad en el presente documento. Lo mismo se aplica *mutatis mutandis* a otros valores del Índice de Identidad, por ejemplo, 0,96; 0,97; 0,98 y 0,99.

El término "proteína de fusión" hace referencia a una proteína codificada por dos genes fusionados no relacionados o fragmentos de los mismos. En el sentido más general según esta invención al menos dos alo-antígenos o fragmentos que tienen las dos versiones de aminoácidos pueden fusionarse en un solo polipéptido. En un ejemplo más específico los fragmentos de dichos alo-antígenos respectivos se fusionarían con una porción Fc de una inmunoglobulina. Se han divulgado ejemplos en las memorias US 5541087 y US 5726044. En el caso de Fc-alo-antígeno, emplear una región Fc de inmunoglobulina como parte de una proteína de fusión es ventajoso para la realización de la expresión funcional de Fc-alo-antígeno o fragmentos de alo-antígeno, para mejorar las propiedades farmacocinéticas y mejorar las propiedades inmunológicas de tal proteína de fusión cuando se utiliza para la terapia.

En algunos casos, la generación de un Fc-alo-antígeno dimerizado puede ser especialmente beneficiosa. El constructo Fc-ADN comprende en la dirección de 5' a 3' un casete de secreción, es decir, una secuencia de señal que impulsa una exportación de una célula de mamífero, ADN que codifica un fragmento de región Fc de inmunoglobulina, como un socio de fusión, y un alo-antígeno o fragmentos del mismo que codifican ADN. En algunas utilidades, sería deseable alterar las propiedades funcionales intrínsecas (unión de complemento, unión de receptor de Fc) mediante la mutación de los lados Fc funcionales mientras el resto de la proteína de fusión permanece intacto o alterar la porción Fc completamente después de la expresión.

Los marcadores de expresión "tejido-específicos" (tales como proteínas CD) se aplican de forma habitual en el diagnóstico de leucemia y linfoma y además han demostrado ser útiles en el diagnóstico de tumores sólidos cuando la citología convencional sola no proporciona un resultado claro. Se conoce en el arte, que células derivadas de origen hematopoyético están entre los tipos de células que expresan el mayor número de genes específicos de tejido, en general conocidos como marcadores de ligamiento (proteínas CD). Las poblaciones celulares de ligamiento incluyen monocitos, células NK, granulocitos (neutrófilo, basófilo, eosinófilo), linfocitos (linfocitos T y células B), células dendríticas y sus precursores. La mayoría de las líneas celulares de referencia de cáncer humanas y en especial aquellas relacionadas con leucemia y linfoma están disponibles en el DSMZ. Por lo tanto, la prueba de rutina para la expresión de marcadores de tejido en todas las líneas celulares cancerígenas humanas con un panel de anticuerpos monoclonales (mAb) bien caracterizados es conocida en el arte. En general, el patrón de expresión de estos antígenos refleja aquel correspondiente al tipo celular que lo origina. Sin embargo, las proteínas de expresión detectadas por mAb individuales, no siempre son estables a lo largo de un período de tiempo prolongado. Por lo tanto, no todos los marcadores informados para una línea celular dada se expresan necesariamente en los clones de referencia del DSMZ. Además, diferentes anticuerpos contra el mismo antígeno no siempre se unen hasta el mismo punto lo cual lleva a intensidades de tinción comparables. Por lo tanto, puede haber diferencias entre resultados encontrados y aun así no cuestionar automáticamente la identidad de la línea celular.

La especificidad de tumor o tejido es una nomenclatura que puede utilizarse de maneras diferentes y puede hacer referencia a un gen o molécula sobreexpresada en un tejido dado en comparación con otros tejidos o a genes o moléculas únicos de un tejido que se expresan en 1 tejido pero no en otros. Según esta invención ambas categorías de genes deben considerarse como antígenos diana si llevan polimorfismos codificados por SNP.

Ejemplo 1

Requerimientos de especímenes para el análisis de marcadores de cáncer

Las proteínas CD y marcadores de cáncer son detectadas normalmente por un proceso de diagnóstico que combina reactivos inmunológicos mono-específicos con etiquetado fluorescente (anticuerpo) y un citómetro de flujo para contar y analizar las poblaciones celulares. Las células se clasifican después por tamaño, reactividad del marcador, clonalidad y proporción. Los anticuerpos anti-CD individuales líneas celulares de referencia de leucemia/linfoma están disponibles a partir de cultivos de células de referencia tales como ATCC o DSMZ. Un panel deseado de anticuerpos anti-CD se selecciona para caracterizar y seleccionar el fenotipo inmunológico de enfermedad de leucemia/linfoma y de ser necesario comparar dicho fenotipo con líneas celulares de referencia de leucemia/linfoma estandarizadas disponibles a través de DSMZ. El procedimiento es muy utilizado en el diagnóstico, pronóstico, evaluación de enfermedades residuales, control terapéutico y manejo de casos de leucemia, linfomas y enfermedades relacionadas y es conocido por los expertos en el arte. Los anticuerpos anti-CD de referencia respectivos a las líneas celulares de leucemia/linfoma de referencia con perfiles de expresión de proteína CD caracterizados están disponibles por ejemplo a través de DSMZ - Deutsche Sammlung von Microorganism und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, ALEMANIA. Pueden analizarse una variedad de tejidos y fluidos corporales. Para garantizar la calidad y utilidad clínica de las interpretaciones, todos los datos citométricos se interpretan en el contexto de una revisión microscópica del espécimen.

Sangre:

5-7ml de sangre en un tubo sodio heparinizado (tapa verde) y 5-7 ml de sangre en un tubo EDTA (tapa violeta). Mezclar bien mediante inversión. Para garantizar resultados óptimos, las muestras deben recibirse dentro de las 24 horas. Si la muestra no puede recibirse dentro de las 24 horas, la muestra debe dejarse reposar a temperatura ambiente, sin embargo, debe hacerse un frotis de sangre de la sangre EDTA y enviarse con el espécimen. De manera alternativa, pueden proporcionarse un tubo ACD de 7 ó 10 ml (tapa amarilla) acompañado con un recuento de leucocitos y un recuento sanguíneo diferencial obtenidos al mismo tiempo que se extrae el tubo ACD (deben proporcionarse recuentos de otro tubo para evitar efectos de dilución de ACD).

Médula ósea:

1-2 ml de médula ósea extraído en una jeringa sodo heparinizada (aproximadamente 500 USP heparina de sodio por ml de espécimen). Mezclar bien. Transferir el espécimen a un tubo sodio heparinizado. Puede requerirse más espécimen si la médula es hipocelular. Las muestras deben recibirse dentro de las 24 horas. Si las muestras no pueden enviarse de modo tal que lleguen dentro de las 24 horas, el espécimen debe colocarse en un medio de transporte (una jeringa heparinizada seguirá siendo necesaria para la extracción inicial).

Tejido:

Colocar la biopsia de tejido en un contenedor estéril con medio de cultivo de tejido. Las muestras deben recibirse dentro de las 24 horas para garantizar viabilidad óptima. Se realiza una verificación de viabilidad realizada antes del análisis de células aisladas de tejido.

5 **Ejemplo 2**

Selección de marcadores de tejido asociado con leucemia

10 La inmunotipificación de leucemia y linfomas es el proceso utilizado para la identificación y cuantificación de células de la sangre, médula ósea y tejidos linfáticos según su linaje biológico y estado de diferenciación. Los marcadores celulares utilizados se designan según una nomenclatura estándar que define proteínas CD. Las proteínas de marcadores CD son una elección excelente, debido a su expresión por parte de células de origen hematopoyético, para iniciar un análisis de SNP según esta invención. Una lista de marcadores de superficie celular relevantes para el diagnóstico de enfermedades hematológicas, tales como leucemia y linfomas, se proporciona en la Tabla 2. El objetivo final es identificar polimorfismos dentro de estas proteínas CD que expliquen los cambios de aminoácidos en las proteínas correspondientes.

15 La clasificación de células de leucemia no diferenciadas de origen linfoide o mieloides, que pueden pertenecer, por ejemplo, al linaje de linfocitos T o células B, es un primer paso en el análisis y subclasificación de las células de leucemia dentro de tipos de linaje que pueden tener. La recolección de información detallada en la expresión de marcadores de superficie celular se conoce en el arte y puede utilizarse para la planificación del montaje experimental. A medida que se identifican más marcadores, especialmente marcadores de cáncer en general, por el perfil de expresión, el número de cánceres aplicables al enfoque actual se incrementa de manera gradual. Los marcadores más prominentes que pueden utilizarse para definir perfiles de leucemia se han probado en esta invención y se proporciona una lista en la Tabla 2. El experto en la materia podrá seleccionar aquellos marcadores CD que son más apropiados para el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad de transmisión hemática específica.

25 Los siguientes párrafos resumen perfiles de proteínas CD relevantes que hacen referencia a enfermedades específicas. Las enfermedades específicas incluyen, pero no se limitan a, leucemia mieloides aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), síndrome mielodisplasia (MDS, por sus siglas en inglés), y otros síndromes mieloproliferativos, leucemia mieloides crónica (LMC), leucemia linfoblástica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), mieloma múltiple, linfoma (Hodgkin o no Hodgkin), incluyendo linfoma folicular, linfoma de grado intermedio, linfoma de grado alto con célula no dividida pequeña o linfoma linfoblástico de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células del manto, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma de Hodgkin con enfermedad extranodal o síntomas B, o tumor voluminoso y anemia aplásica severa.

Una combinación de varios SNP que representan diferentes proteínas de un perfil será especialmente beneficioso al aplicar la presente invención para la terapia y diagnóstico de la enfermedad.

35 Los perfiles de leucemia aguda de poblaciones de células de leucemia conocidas o posibles se basan en el análisis de marcadores de linfocitos T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 y CD8), los marcadores de linfocitos B son preferentemente CD10, CD19, CD20, CD21, CD22 y CD24 y los marcadores mieloides/monocitos (CD13, CD14, CD15 y CD33). De ser útil, pueden incluirse marcadores de linfocitos T adicionales tales como CD23, 37, 38, 39, 40, 72, 73, 74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86. La leucemia megacarioblástica aguda puede probarse utilizando los marcadores CD61, CD42 y CD41. El estado de maduración (no linaje) se evalúa con CD34, HLA-DR y CD10 (CALLA). La transferasa terminal (TdT) también puede solicitarse como una prueba separada o agregada por el patólogo cuando sea necesario.

45 Los perfiles de leucemia crónica y perfiles de linfoma se evalúan analizando la población total de linfocitos T para detectar la presencia de marcadores de linfocitos T pan: CD2, CD3, CD7, CD5; el análisis de subpoblaciones de CD4 (T coadyuvante) y CD8 (T citotóxico/supresor) se incluye a modo de rutina. Los marcadores mieloides/monocitos incluyen CD14 y CD 15. La población total de linfocitos T puede restringirse determinando la expresión de los marcadores de linfocitos T CD19 y CD20. La co-expresión de CD5 y CD20 a menudo se asocia a la proliferación neoplásica. CD41 y CD42 pueden incluirse para la diferenciación de LMC en crisis blástica. CD10 (CALLA), CD22, CD23, CD38, CD45, FMC-1 y HLA-DR se incluyen en el perfil estándar. Pueden agregarse otros marcadores para la evaluación de trastornos de linfocitos T (CD1, CD30), enfermedad de Hodgkin (CD15, CD30), o linfoma (CD30) anaplásico (Ki-1).

55 La tricoleucemia, leucemia prolinfocítica, o linfoma de células del manto y leucemia son enfermedades de células B que se caracterizan por un perfil de leucemia crónica y perfil de linfoma (véase más arriba) además de la expresión de los marcadores de tricoleucocitos CD11c (receptor complementario), CD 25 (receptor IL-2), CD103, y el marcador de tricoleucocitos prolinfocíticos FMC 7. El marcador de leucemia linfoide B CD23 se evalúa con respecto a la expresión de CD5 para los diferentes diagnósticos de leucemia versus linfoma de células del manto. CD23 es parte del perfil fundamental del linfoma.

El linfoma anaplásico (Ki-1) y la enfermedad de Hodgkin se evalúa mediante los marcadores CD1, CD15, y CD30 (Ki-1).

Ejemplo 3

Nuevos SNP identificados mediante análisis de las bases de datos de ADN

5 Los SNP se identifican mediante el análisis de bases de datos de ADN que representan la variación alélica del genoma humano, en donde la secuencia de ADN se deriva de diferentes individuos. La evaluación puede realizarse en diferentes niveles incluyendo EST, SNP o datos de ADN genómico. Sin embargo, esto llevará finalmente al mismo resultado. La base de datos útil para la evaluación de SNP directa puede seleccionarse de un grupo de bases de datos que comprende:

10 <http://www.jbic.or.jp>; <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>; <http://www.celera.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

15 Para ilustrar la identificación de SNP en proteínas de grupo CD, se han aplicado diferentes secuencias de aminoácidos que representan diversas proteínas de CD asociadas al cáncer para realizar una búsqueda *tblastn* utilizando el modo preestablecido (secuencia de proteína contra base de datos de ADN traducido) del programa. Las secuencias de proteínas, a diferencia de las secuencias de nucleótidos, son particularmente útiles para el análisis, dado que es posible excluir a los SNP sin efecto en el intercambio de un aminoácido (mutaciones silenciosas). La búsqueda en el banco de datos se realizó utilizando una o más de las bases de datos de SNP de dominio público antes mencionadas.

20 Las alineaciones resultantes que representan discrepancias en secuencias de ADNc (posibles SNP) entre diferentes clones de una secuencia de proteínas CD particular se procesaron conforme a los siguientes criterios rigidos:

(i) Alineamiento del ADN genómico o EST (etiqueta de secuencia expresada) y secuencia de CD que contiene una X es un error de secuenciación y tiene que ignorarse.

(ii) Alineamiento de clones de ADN genómico y una secuencia de CD con no coincidencias adyacentes al extremo 5' o 3' son indicadores de límites exón/intrón y también deben ignorarse.

25 (iii) Una diferencia de una base en el alineamiento entre secuencias EST o de ADN genómico y secuencia CD rodeada por ADN exactamente coincidente es un indicador riguroso de posible SNP.

30 Los SNP identificados en el nivel de ADN se analizaron comparando su secuencia de proteínas disponible a través del código de acceso. La búsqueda *Tblastn* llevó al alineamiento como se da en el ejemplo CD42 a continuación y produjo como resultado la identificación de los posibles SNP presentes en el correspondiente clon genómico. Una lista de proteínas relevantes que se han aplicado al análisis de SNP se muestra en la Tabla 2.

Ejemplo 4

Análisis de las variantes SNP CD42

35 Para ilustrar el procedimiento descrito en el ejemplo 3 en más detalle, la proteína CD42b ha sido seleccionada como ejemplo. La secuencia de proteína disponible mediante el código de acceso N° P07359 se ha aplicado para el análisis de posibles SNP en la proteína CD42b:

La búsqueda *tblastn* llevó al alineamiento como se muestra a continuación y a la identificación de dos posibles SNP presentes en el clon genómico con N° de acceso AC032038.2.

>gi|121531|sp|P07359|GPBA_PRECURSOR DE CADENA ALFA DE GLICOPROTEÍNA PLAQUETARIA IB HUMANA (GP-IB ALPHA) (GPIBA) (CD42B-ALPHA) (CD42B) [CONTIENE: GLICOCALICINA]

40 Secuencia de aminoácidos de CD42b:

MPLLLLLLLLLLPSPLPHPHICEVSKVASHLEVNCDKRNLTA LPPDLPKD TTILHLSENLLYTFSLATLMP
 YTRLTQLNLDRCELTKLQVDGTL PVLGTLDL SHNQLQSLPLLQGLPALTVLDVSNRLTSLPLGALRG
 LGELQELYLKGNELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPA GLLNGLLENLDTLLLQENSLYTI PKGF
 FGSHELLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV DVKAMTSNVASVQCDNSDKFPVYKYP
 GKGCP TLGDEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVRATRTRTVVKFP TKAHTTPWGLFY SWSTASLDSQMPSSLHPT
 QESTKEQTTFFPRWTPNF TLHMESITFSKTPKSTTEPTPSPTTSEPVPEPAPNM TTLEPTPSPTTPEPT
 SEPAPSPTTPEPTPIPTIATSPTILVSATSLITPKSTFLT TTKPVSLLESTKKTIP ELDQPPKLRGV LQ
 GHLESSRNDPFLHPDFCCLLPLGFYVLGLFWLLFASVVLILL LSWVGHVKPQALDSGQGAALTTATQTT
 HLELQRGRQVTVPRAWLLFLRGS LPTFRSSLFLWVRPNGRVGPLVAGRRPSALSQGRGQDLLSTVSIRY
 SGHSL

Alineamiento del fragmento CD42b:

Las secuencias que representan variantes alélicas y que comprenden intercambios de aminoácidos en la proteína CD42b están etiquetadas en negrita.

5 >ss523802 allelePos=201 total len = 401 SC_JCM|AC032038.2_49155|taxid = 9606|mol =
 Genomic|subsnpcClass = 1

Longitud = 401

Cadena negativa HSPs:

10 Puntos = 736 (264.1 bits), Expectativa = 7.0e-71, P= 7.0e Identidades = 131/133 (98%), Positivos = 132/133
 (99%), Marco = -1

Query: 192 TLLLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV D 251

TLLLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV D

Sbjct: 401 TLLLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV D 222

Query: 252 VKAMTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLGDEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVRATRTRTV 311
 VK+MTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGK CPTLGDEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVRATRTRTV

Sbjct: 221 VKSMTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKWCPTLGDEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVRATRTRTV 42

Query: 312 VKFPTKAHTTPWG 324

VKFPTKAHTTPWG

Sbjct: 41 VKFPTKAHTTPWG 3

Ejemplo 5

Análisis de líneas celulares cancerígenas para la detección de HLA y SNP

15 Líneas celulares de leucemia/linfoma transformadas con el virus de Epstein Barr con perfiles de expresión de
 proteína CD caracterizadas están disponibles por ejemplo a través de DSMZ o pueden aislarse de los pacientes. La
 células se evaluaron en cuanto a la expresión de HLA-A2 (u otra expresión de clase I deseada) mediante
 inmunofluorescencia utilizando el mAb BB7.2 (u otros anticuerpos disponibles a través de la Colección Americana de
 Cultivos Tipo, Manassas, VA). La expresión y estado de SNP de la célula hematopoyética y/o la célula cancerígena
 se evaluó mediante PCR genómica. Se aisló poli (A)+ARN con el kit de purificación de ARNm QickPrep Micro
 20 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscatawa, NJ. Para la expresión específica de células o tejido y detección de
 polimorfismo de por ejemplo el gen CD42 (Nº de acceso J02940), se utilizaron cebadores de PCR (5'-
 CAAGAGAACTCGCTGTATACA-3' y 5'-AAGGGGTGGTTTCGGGTATGT- 3') posición base correspondiente 586 a
 607 y posición base 939 a 960, respectivamente del ADNc de CD42 y produjeron un producto de PCR de 374 bp. La

detección de SNP se realizó mediante la posterior secuenciación del producto PCR utilizando un secuenciador capilar ABI 310.

Ejemplo 6

Identificación de péptidos de unión a HLA codificados por SNP en CD42b

5 Además de la búsqueda de SNP codificantes en secuencias de ADN y proteínas, la selección de un motivo de unión de HLA clase I apropiado es otro paso importante hacia un SNP relevante.

Se han seleccionado varias de las moléculas más representativas HLA clase I. La utilización del algoritmo SYVPEITHI ayudó a generar predicciones de péptidos de unión a HLA y los resultados se muestran en la Tabla 4. Puntos de 8 a 27 indican una alta afinidad del péptido individual para la unión a moléculas HLA clase I.

10 El resultado de este análisis son secuencias humanas que se aparean en 8 de 9 residuos del péptido. Ambos péptidos humanos se sintetizan y evalúan en cuanto a actividad sensibilizante. En raras ocasiones puede observarse más de una no coincidencia de aminoácido dentro de los 9 residuos de epítipo de linfocito T.

Ejemplo 7

Selección de péptidos de unión a HLA para análisis in vitro

15 Para el análisis in vitro del intercambio de aminoácido derivado de SNP, los péptidos noámeros que procesan preferentemente los motivos de unión conocidos para el HLA-A2 (HLA-A*02 o HLA-B51 o HLA-B62) deben identificarse en la secuencia de proteína madura como se describe con anterioridad para el alo-antígeno CD42.

20 En general la selección de los epítopos de linfocitos T de unión a HLA-A2 ofrece ventajas sobre otras debido al hecho de que las líneas celulares existen en el arte, lo cual puede ser útil para el estudio de la presentación de antígenos in vitro. Tal línea celular es entre otras LCL.174 (una línea celular mutante deficiente en TAP) que lleva el HLA-A2 en la superficie.

Ejemplo 8

Aislamiento de péptidos enlazados a HLA-A2

25 Los péptidos enlazados a HLA-A2 se aislaron y secuenciaron según protocolos estándares (Seeger et al., Immunogenetics, 49: 571-576, 1999, Falk et al., Nature, 351: 290-296, 1991 utilizando el anticuerpo específico a HLA-A2 BB7.2, tratamiento con ácido, ultra filtración y fraccionamiento mediante HPLC. Las fracciones HPLC que contienen péptidos se agruparon, y las alícuotas correspondientes a extractos de péptidos de entre 1010 células se analizaron mediante HPLC ESI MS nanocapilar (Schirle et al., Eur. J. Immunol., 30: 2216-2225, 2000)

Ejemplo 9

30 ***Síntesis de péptidos***

Los péptidos se sintetizaron mediante química Fmoc. La química Fmoc se describe en G. A. Grant Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Co. (1992). Las identidades de los péptidos se confirmaron mediante análisis de aminoácidos y espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por matriz. Los péptidos liofilizados se disolvieron en DMSO a 20mM, se dispusieron en alícuotas y almacenaron a -80°C. Los péptidos se diluyeron a 4mM con medio de cultivo libre de suero y se utilizaron en las concentraciones finales deseadas.

Ejemplo 10

Prueba in vitro para péptidos de unión a HLA sintéticos

40 Los péptidos con variaciones de un aminoácido inducidas por SNP que pueden unirse a moléculas HLA-A2 se identificaron por su habilidad de incrementar la expresión de HLA-A2 en la superficie de células mutantes deficientes en TAP de la línea LCL.174. De manera breve, las células LCL.174 se cultivaron en una placa de 96 pozos de fondo redondo en 2×10^6 células/pozo en 200µl de RPMI junto con 50µM de péptido y se incubaron durante la noche a 37°C. Las células se trataron con mAb específico a HLA-A2, BB7.2 (ATCC, Rockville, Md.), seguido de tinción con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC. La intensidad de fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo. El péptido de proteína matriz M1 del virus de la influenza, FluMP58, es un epítipo de CTL restringido a HLA-A2 conocido y se utilizó como control positivo. El antígeno de la envoltura del virus de la hepatitis B, péptido HBenvAg125, no se une a HLA-A2 y se utilizó como control negativo.

Ejemplo 11

Tecnología de tetrámeros para la identificación de células antígeno-reactivas

Los complejos MHC clase I/péptidos multiméricos generalmente son generados por la expresión de β 2-microglobulina y moléculas HLA de cadena pesada en bacteria. La cadena pesada se muta para eliminar la región transmembrana y para agregar una secuencia de biotilación específica en el terminal C. Las proteínas purificadas pueden ser replegadas in vitro en la presencia de altas concentraciones de péptidos/epítomos para formar complejos HLA-péptidos estables y solubles. Después de la biotilación enzimática, estos complejos son multimerizados con estreptavidina que se unirá a cuatro moléculas de biotina. La utilización de estreptavidina conjugada a un fluorocromóforo permite la visualización de células teñidas mediante citometría de flujo.

En el caso de utilizar complejos de MHC clase I/péptidos para activar los linfocitos T, puede ser útil combinar la tecnología de tetrámeros con el análisis de secreción de citocina, para estudiar la respuesta inmune en más detalle.

Ejemplo 12

Estimulación de CTL in vitro

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de 30ml de sangre periférica humana heparinizada de sujetos HLA-A2⁺ mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, Mo.). Se seleccionaron células CD8⁺ de las PBMC aisladas frescas o a veces de PBMC congeladas en nitrógeno líquido utilizando micro perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD8 según las instrucciones del fabricante (Milteny Biotec, Auburn, Calif.).

Se resuspendieron células CD8⁺ en DMEM libre de suero y se cultivaron en alícuotas de 500- μ l en placas de 48 pozos en 3×10^5 células/pozo. Después de dos horas a 37°C, 5% CO₂, células no adherentes se eliminaron mediante lavado repetido y monocitos adherentes se incubaron durante 4 horas con 50 μ M de péptido y 5 μ g/ml de β 2-microglobulina humana (Sigma, St. Louis, Mo.). Después de lavar con DMEM libre de suero, cada pozo se suplementó con $1,5 \times 10^6$ células CD8⁺ (>90% puras por citometría de flujo) en 500 μ l de DMEM que contiene 10% de suero humano suplementado con rhIL-7 (0.5 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, Minn.).

Se proporcionó rhIL-2 en 25 U/ml después de 2 días y dos veces por semana después de ello reemplazando la mitad del medio de cultivo. El día 10, los cultivos de CTL fueron estimulados en una proporción entre células receptoras y células estimuladoras de 5 con LCL autólogas irradiadas (5000 rad). De manera alternativa, las células LCL 174 que se incubaron con 50 μ M de péptido de unión a HLA definida según esta invención se utilizaron para re-estimular cultivos de CTL obtenidos a partir de sujetos HLA-A2⁺. Los ensayos de CTL se realizaron una semana después de la re-estimulación como se describe con posterioridad.

Después de la caracterización, los CTL estimulados por péptidos pudieron ser congelados y almacenados en un medio que consiste en 30% de suero humano, 10% de DMSO y 60% de DNEM y después descongelados y re-estimulados para más análisis. El péptido FIUMP58 (derivado de la proteína matriz M1 del virus de la influenza), fue utilizado como control positivo para la estimulación in vitro de CTL específicos a péptidos.

Ejemplo 13

Generación ex vivo de CTL específicos a alo-antígenos

Los péptidos de unión a HLA que representan versiones alélicas de un alo-antígeno preferente pueden utilizarse y después caracterizarse mediante el aislamiento de CTL específicos. La viabilidad de este enfoque se ha demostrado mediante la generación ex vivo de CTL específicos a alo-antígenos a partir de donantes no vacunados de sangre sana alelo-negativa, con una no coincidencia de un aminoácido. Pueden utilizarse células dendríticas pulsadas de péptidos sintéticas como APC para estimular los linfocitos T CD8⁺ alogénicos o autólogos no cebados. Los CTL específicos generados ex vivo con no coincidencia de un aminoácido pueden utilizarse para lisar de manera eficiente células de leucemia derivadas de pacientes que padecen leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia linfocítica aguda (ALL). No debería detectarse ninguna reactividad lítica contra las células no hematopoyéticas. Pueden obtenerse suficientes cantidades de CTL para fines de inmunoterapia adoptiva. Es importante destacar que esta técnica es aplicable, sin limitación, a todo alo-antígeno definido por SNP descubierto a través de esta invención.

Ejemplo 14

Examen de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr:

La actividad citolítica de estas células efectoras se mide mediante la liberación del isótopo de las células diana etiquetadas. La actividad citolítica a menudo se evalúa en un ensayo de liberación de cromo pero están disponibles otros métodos. En ensayos de liberación de cromo las células diana, etiquetadas con cromo radioactivo (⁵¹Cr), se mezclan con los CTL activados. El cromo radioactivo en la forma de Na₂ ⁵¹CrO₄ es tomado por las células vivas, dentro de las células el cromo se reduce. Cuando el cromo reducido se libera de células lisadas no puede reutilizarse por otras células, de este modo la cantidad de cromo liberado es una buena medida de la actividad citolítica de las células efectoras. En principio cualquier tipo de célula puede utilizarse como diana para medir la actividad de CTL, aunque las células activadas, tales como linfoblastos, células de cultivo de tejido, o células tumorales han demostrado ser las mejores. La actividad destructiva natural se mide mediante la lisis de una línea celular de referencia llamada K562. Aquí, la prueba se utiliza para medir la actividad de células LAK o clones de linfocitos T citotóxicos (efectores) derivados de donante o receptor. Las células LAK o clones de linfocitos T destruirán a las células diana que expresan la combinación adecuada de HLA y péptido alo-antigénico.

Una línea de células diana preferente pulsada con un epítipo de linfocitos T alogénico seleccionado es una línea celular EBV-LCL HLA-A2-positiva. Además, una fuente importante de líneas celulares de leucemia está disponible a través de DSMZ. 1×10^6 células que representan una diana se colocan en un tubo falcón de 5ml. Las células se centrifugan y resuspenden agregando 10 μ l de una mezcla de Na₂⁵²CrO₄ (alta actividad) y se incuban durante 45 minutos a 37°C. Las células etiquetadas se lavan tres veces con PBS/FBS y se resuspenden en 1ml de un medio y se cuentan. Las células etiquetadas se mantienen en hielo hasta que sea necesario. Para la prueba se necesita un volumen total de 5ml cada tipo de célula diana, a una concentración de 5-10⁴ células/ml y se ajusta la concentración.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) pueden generarse a partir de linfocitos T precursores del siguiente modo: 1) estimulación específica mediante antígenos llevados en células "estimuladoras" en la presencia de linfocitos T coadyuvantes y accesorios, o 2) activación policlonal inducida durante cuatro o cinco días mediante incubación de interleucina-2 y conocida como células LAK. Las células efectoras preferentes se mueven a un tubo Falcon de 50ml. Las células se lavan y resuspenden y ajustan a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml. Las células efectoras y dianas deben mezclarse en 4 proporciones de efector: diana diferentes (50:1, 25:1, 12,5:1, 6:1). Cada proporción de efector: diana debe estudiarse por triplicado. Una dilución serial de las células efectoras se prepara en la placa de modo tal que el volumen total de las células efectoras sea de 100ml después de la dilución. Después se agregan 100ml de suspensión de células diana. El número de células diana por pozo debería ser 5000. Se incluyen pozos para la máxima liberación espontánea de medio de 100ml que contiene sólo las células diana. Las placas se incuban a 37°C, 5% CO₂ durante 4 horas. Después de 4 horas, se cosechan y cuentan en un contador gamma de ensayo de citotoxicidad.

Ejemplo 15

Protocolo A de vacunas

Se utilizan alo-antígenos codificados por SNP en forma de toda la proteína polimorfa completa o al menos la porción del péptido polimorfo de la misma. Algunas proteínas y péptidos serán inmunogénicos, mientras que a otros les faltará inmunogenicidad. Esta carencia se supera fácilmente mediante el acoplamiento de la proteína o el péptido a un portador. Entre los portadores útiles se incluyen Hemocianina de la lapa (KLH, por sus siglas en inglés), albúmina de suero bobino (BSA, por sus siglas en inglés), *Mycobacterium bovis* BCG o derivado de proteína purificada de tuberculina o subunidad B de toxina de cólera. El acoplamiento puede lograrse con cualquier reticulante bifuncional. Puede utilizarse un reactivo homobifuncional tal como Bis (sulfosucinimidil)suberato, disucimidil suberato o glutaraldehído. En casos donde se sabe que una de las proteínas o péptidos no muestra grupos accesibles para el entrecruzamiento, puede ser ventajosa la utilización de reactivos heterobifuncionales. Los reactivos heterobifuncionales tales como m-Maleimdobenzoil-N-hidroxisuccinimida o sulfom-Maleimdobenzoil-N-hidroxisuccinimida son algunos entre otros conocidos en el arte y pueden seleccionarse según las propiedades bioquímicas de los compuestos a ser conjugados. El portador conjugado al antígeno de elección en el ejemplo preferente es un conjugado de KLH-antígeno y puede utilizarse de manera preferente con el adyuvante inmune QS-21. Formulaciones de antígenos adicionales comprenden ISCOMs, MDP, *Mycobacterium bovis* BCG, o hidróxido de aluminio. Las saponinas u oligonucleótidos CpG pueden mejorar las respuestas inmunes y pueden ser útiles para secuencias seleccionadas o conjugados de antígenos. Los procedimientos alternativos incluyen la vacunación repetida con el antígeno seleccionado.

Después de una agitación intensa, la administración a un humano se realiza por vía intravenosa, intratumoral, intradérmica, subcutánea u oral. La administración debe realizarse preferentemente los días 0, 7 y 14. De manera opcional, los péptidos de epítipos de células B también pueden incluirse, o pueden reforzar las aplicaciones.

Protocolo B de vacunas

El agente de vacuna propuesto es una cepa atenuada de la bacteria *Salmonella typhimurium*, que lleva un plásmido de replicación en el cual se ha insertado la secuencia de ADN apropiada, que es capaz de expresar los péptidos alo-antigénicos que codifican SNP de interés in vivo. Como vector, proponemos la cepa X 4072 de *Salmonella typhimurium* atenuada (Schödel et al., Infect. Immun. 1994, 62: 1669-1676) que tiene mutaciones Δ crp-1 y Δ cya la vuelven no virulenta y una mutación Δ asdA-1 que la vuelve inviable a menos que un gen asdA normal esté presente en un plásmido en la misma. Sin embargo, otras cepas de bacterias seguras pueden utilizarse en lugar de ésta.

El plásmido pYAN es una forma de pYA292 que se modifica para tener un sitio Nco I. (Schödel et al., supra). La presencia del sitio Nco I permite la inserción dentro del marco de AUG de la proteína o péptido de interés foráneos en el plásmido. Pyan carece de genes con resistencia a antibióticos, lo que permite la utilización de antibióticos en caso de que aparezcan síntomas que sugieran la presencia de patología de *Salmonella*.

pYAN lleva un gen asda normal, que mantiene la viabilidad de sólo aquellas bacterias que retienen el plásmido. Una secuencia de ADN se sintetiza codificando un AUG seguido de la secuencia que codifica el péptido. La dosis sugerida es 5×10^4 unidades de formación de colonias para niños pequeños y 5×10^5 unidades de formación de colonias para adultos.

Para adultos, la bacteria se administrará con bicarbonato de sodio (2g de NaHCO₃ en 150ml de agua destilada). Primero se debe tomar 120ml de la solución para neutralizar el ácido gástrico. Un minuto después, se beben los

restantes 30ml de la solución de bicarbonato, que ahora contiene la bacteria. No se permite ingerir comida ni beber líquido por 90 minutos antes y después de recibir la vacuna.

Protocolo C de vacunas

5 De manera alternativa, el ADN puede administrarse mediante otras técnicas de administración de ADN tales como aquellas análogas al protocolo de vacunación descrito por D. Zhang et al. (J. Infect. Dis. 1997,176: 1035-1040).

Mientras que las realizaciones preferentes se han descrito con anterioridad, los expertos en el arte comprenderán que pueden realizarse otras modificaciones dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, en lugar de expresar el ADN en *E. coli*, uno puede optimizar el ADN para otros huéspedes y expresarlo en aquellos huéspedes.

10 Además, mientras que se han identificado secuencias específicas, se cree que las técnicas de la presente invención puede utilizarse para insertar péptidos más largos que los 8-10mer deseados que tienen características de activación de CTL deseables. Por lo tanto, las reivindicaciones deben entenderse en el sentido más amplio posible para juzgar el alcance total de la invención.

Protocolo D de vacunas

15 Las células dendríticas (DC) son consideradas vectores vivos para la vacunación contra el cáncer y son especialmente útiles para administrar los antígenos de la invención.

La mayoría de los estudios clínicos más recientes se han desarrollado utilizando DC generadas ex vivo a partir de precursores CD14+ (5,6) (llamados DC derivadas de monocitos o Mo-DC) que ahora se consideran un estándar de oro (Thurner B et al. J Exp Med. 190: 1669, 1999; Schuler-Thurner B et al. J Exp Med. 195: 1279, 2002). La Mo-DC puede generarse mediante reproducción en pocos días en grandes cantidades (300-500 millones de DC maduras por aféresis) a partir de precursores en la sangre (Feuerstein B et al. J Immunol Methods. 245: 15-29, 2000). En el caso de la Mo-DC la elección del estímulo de maduración es fundamental para el éxito y específicamente, PGE2 tiene que ser parte del estímulo de maduración para obtener CCR7 que expresa la Mo-DC que migra en respuesta a CCL19 y CCL21 que guían la DC hacia órganos linfoides (Luft T et al. Blood. 100: 1362, 2002; Scandella E et al. Blood. 100: 1354, 2002). Están disponibles métodos para la preparación de DC, que permiten la producción clínica con GMP de una vacuna peptídica a base de DC contra tumores. Los péptidos que llevan alo-antígenos codificados por SNP seleccionados pueden utilizarse para la carga de péptidos de CD. Otro enfoque para cargar CD con antígenos puede realizarse mediante la absorción de ARN desnudo que codifica el antígeno deseado a través del protocolo de transfección o electroporación (Van Tendeloo VF et al. Blood. 98: 49, 2001) y la posterior inducción de linfocitos T específicos a antígenos in vitro e in vivo en pacientes.

Las DC pueden cargarse con hasta 20 epítomos de linfocitos T restringidos a HLA clase I y 10 epítomos de linfocitos T restringidos a HLA clase II y actuar como adyuvante natural para la inducción de respuestas CTL específicas a antígenos.

El análisis ELISPOT (método descrito en el ejemplo 15) realizado ex vivo, además de la tecnología de tetrámeros y la determinación de frecuencia de CTL, puede utilizarse para controlar la respuesta inmune.

Ejemplo 16

Evaluación de la inmunogenicidad y la eficacia de la vacunación

En ensayos clínicos con antígenos de cáncer, el objetivo principal es determinar su inmunogenicidad. Esto usualmente se realiza midiendo los marcadores indirectos para la activación de linfocitos tales como citocinas e interferones o puntos extremos de la reacción inmune tal como la respuesta de anticuerpo.

Un ensayo estándar conocido por el experto en el arte determina si hay inducción de una respuesta de anticuerpo específica a (alo)antígeno. Esto se realiza con ensayos inmunoabsorbentes ligado a enzimas (ELISA) en base a antígenos o células utilizando suero obtenido de los pacientes antes y después de la administración de la vacuna. Las células de leucemia autólogas, u otras células que causan enfermedades, o antígenos aislados, en especial los alo-antígenos de las mismas que llevan el intercambio de aminoácido, son buenas dianas para realizar un ELISA.

Otro método es la evaluación de inmunogenicidad mediante la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en inglés) en la piel. Todos los pacientes recibieron inyecciones intradérmicas de antígenos, alo-antígenos o células cancerígenas autólogas irradiadas, antes y después de la administración de la vacuna. Se midió el grado de induración y eritema presente 48 horas después de la inyección. Además, la prueba DTH puede incluir la recolección de muestras para biopsia que se someten a un análisis inmunohistoquímico para determinar si hay una afluencia de células del sistema inmune.

Otra forma de identificar las células efectoras específicas al cáncer se basa en un ensayo desarrollado recientemente que ha sido útil para determinar linfocitos T activados específicamente generados ante el encuentro con antígenos. Las células activadas responden liberando citocinas y se utilizan anticuerpos anti-citocinas para medirlas, una técnica conocida como ensayo de puntos por inmunoabsorción unido a enzimas (ELISPOT). El ELISPOT permite realizar y medir la re-estimulación in vitro de los linfocitos del donante o paciente con un alto grado de sensibilidad.

Las citocinas secretadas por células efectoras y el análisis por citometría de flujo adicional puede realizarse para medir la frecuencia de linfocitos T. Los péptidos o proteínas de referencia del virus de la influenza (FLU), citomegalovirus (CMV) o toxoide tetánico (TT) pueden utilizarse para estandarizar el sistema. La detección de secreción de IL-4 o secreción de IFN-gamma es un indicador de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ específicos a antígeno con PBMC normales. Las células de memoria expresan CD27 y CD28, pero no CD57. Después del aislamiento y expansión con IL-2, las células recuperadas muestran citotoxicidad específica a antígeno. Las frecuencias de linfocitos T específicos a antígenos es más baja para los antígenos encontrados con menos frecuencia y sólo moderadamente inmunogénicos tales como TT (1 en 10.000 a 1.000.000), pero mucho más alta para el virus persistente CMV (1 en 100 a 10.000 PBMC de donantes seropositivos). Estas técnicas son una herramienta valiosa en el análisis y aislamiento de linfocitos T específicos para el cáncer y alo-antígenos, según esta invención.

Ejemplo 17

Medición de la alo-activación

Un método para enumerar y medir la potencia de los linfocitos T alo-activados en la clínica puede comprender distinguir entre células activadas y no activadas.

El ensayo de reducción XTT con formazán es beneficioso para comparar la actividad de las células alo-activadas con un control no estimulado. El ensayo se basa en la habilidad de las células vivas de reducir la XTT a una tinción rojo-naranja formazán, y también es útil para distinguir entre células activadas y no activadas. Puede utilizarse para prácticamente cualquier célula en prácticamente cualquier medio. El rango de células útiles se encuentra entre 10⁵ y 5x10⁶ por mL. Los reactivos son: placas de 96 pozos, de fondo plano (no placas para ELISA) 1mg/mL MTT (sal de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil-2H- tetrazolio-5-carboxianilida, Sigma) en PBS (fresco) 1.53mg/mL PMS (fluoruro de fenilmetanosulfonil, Sigma) en PBS (congelado, protegido de la luz). El ensayo se realiza colocando 100µl de medio de cultivo con células en una placa de 96 pozos en duplicado o triplicado. Se utilizan 100µL de medio solo para los controles. La primera columna se deja en blanco. Para el revelado, se pre-mezcla PMS con XTT inmediatamente antes de la utilización (5µg por ml XTT) y se añaden 50µl de XTT a cada pozo. Cubrir la placa para mezclar. La placa se cubre e incuba a 37°C durante 4 horas. Se realiza el conteo de la placa a 470nm (referencia 650nm).

Ejemplo 18

Citometría de flujo para el análisis de expresión de CD3/CD69 o CD3/FDA

Este ensayo es para analizar la activación de linfocitos T después de la estimulación de linfocitos mezclados alogénicos. La expresión de CD69 o actividad de esterasa se correlacionan con la secreción de citocina y pueden utilizarse como indicadores indirectos de la activación de linfocitos T. Los linfocitos no estimulados no expresan CD69 en su superficie y sólo tienen niveles bajos de esterasas no específicas. Una vez activados por los alo-antígenos o mitógenos no específicos, la expresión de CD69 aparece dentro de las 48 horas (pico a las 24 horas). La actividad de esterasa aumenta poco después de la estimulación y continúa varios días. No todas las reacciones de linfocitos alo-estimulados se producen con la misma cinética, y es preferente medir la activación el día 1, 2 y 3 del cultivo.

Las muestras de pruebas de células del paciente y donante se mezclan en cultivos pequeños en 0,5x10⁶ células/ml en 2% FCS-RPMI. Estos cultivos se mantienen a 37° C en un incubador con 5% CO₂ hasta la prueba.

Ejemplo 19

Ensayo de proliferación celular

La incorporación de [3H]-timidina en el ADN se mide de la siguiente manera: Los linfocitos receptores se suspenden en 1 millón de células/ml en 10% de suero fetal bovino que contiene RPMI 1640, antibióticos (estreptomocina/penicilina) y 5x10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol. Cien ml de estas células se sembraron en pozos por triplicado de una placa de microtitulación de fondo redondo (Costar). Las células estimuladoras que llevan el alo-antígeno se prepararon, en una forma equivalente a la preparación de células receptoras, pero se irradiaron con 3000 R (fuente 137Cs) antes de su utilización. Cien ml de las células estimuladoras se agregaron a las células receptoras y el cultivo de linfocitos mezclado se incubó a 37°C, 5% CO₂, durante 7 días. Después, se agregaron 10µl de [3H]-timidina (0,5 mCi/ml, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, Calif.) a cada pozo durante 6 horas. La placa de microtitulación se cosechó, utilizando un recolector MASH y la cantidad de timidina incorporada se determina contando los pozos cosechados en un contador de centelleo en medio líquido. El índice de estimulación (SI, por sus siglas en inglés) se determinó calculando la proporción de cpm de [3H]-timidina incorporada al cultivo de linfocitos mezclado dividido por cpm de [3H]-timidina incorporada al cultivo de control (no estimulado). La incorporación de naranja de acridina puede utilizarse en lugar de la incorporación de [3H]-timidina.

Ejemplo 20

Técnica para la identificación de antígenos tumorales

SEREX, un enfoque serológico de clonación (análisis serológico de antígenos tumorales mediante la clonación y expresión de ADN recombinante), puede realizarse como lo describen Salim et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. Methods 1995:92). 11810-11813). Véase también la patente estadounidense N° 5.698.396, incorporada al presente

documento a modo de referencia. Según esta aplicación, los antisueros de pacientes que han experimentado de manera reciente TMO alogénico se utilizan para identificar antígenos proteínas inmunogénicas expresadas en células cancerígenas mediante la evaluación de librerías de expresión construidas a partir de ADNc de células de pacientes con leucemia. Se encontró que los clones que codifican antígenos identificados de este modo han suscitado una respuesta inmune humoral de altos títulos en los pacientes de los cuales se obtuvo los antisueros. Tal respuesta de IgG de altos títulos implica el reconocimiento de linfocitos T coadyuvantes del antígeno detectado y puede ser particularmente útil para evaluar a los pacientes después del TMO alogénico. Los antígenos tumorales expresados pueden evaluarse después para detectar la presencia de motivos de HLA clase I y clase II y la reactividad con CTL. Se ha aplicado SEREX para una variedad de tipos de tumores y se clonó una cantidad de productos genéticos inmunogénicos novedosos asociados al cáncer (Tiireci et al., Mol. Med. Today 1997, 3: 342-349; Sahin et al., Curr. Opin. Immunol. 1997, 9: 709-716; Old et al., J. Exp. Med. 1998, 187: 1163-1167). Conforme a esta patente, los antígenos detectados harán referencia específicamente a alo-antígenos, que normalmente no son accesibles a través de este método, debido a la falta de respuestas de anticuerpo dirigidos a ellos.

Tablas:

15 **Tabla 1 A:** Antígenos de histocompatibilidad menor de humanos y ratones caracterizados por variantes alélicas múltiples

mHAg	Proteína/gen	Alelos definidos	Referencias
Humano			
H-Y	proteína SMCY	1	Wang et al.
H-X	proteína SMCX	1	Goulmy et al
DFFRY	Gen Y específico	2 genes	Vogt et al
HA-1	Gen KIAA0223	2	Den Haan et al.
HA-2	Miosina Clase 1	3	Goulmy et al.
HA-3	desconocido	n.n.	Goulmy et al.
HA-4	desconocido	n.n.	Goulmy et al.
HA-5	desconocido	2	Goulmy et al.
HA-8	KAA0020	2	Brickner et al.
HB-1	Gen HB-1	2	Dolstra et al.
CD31	PECAM-1	3	Behar et al.
PR1	Proteinasa 3	2	Moldrem et al.
Ratón			
AAPDNRETF	desconocido	2	Perreault et al.
COI	Cit. oxidasa	2	Morse et al.
H-Y	proteína SMCY	1	Meadows et al.
H-Y	proteína UTY	1	Scott et al.
NDI	deshidrogenasa	4	Loveland et al.

Tabla 1 B: Colección de antígenos de histocompatibilidad menor de humanos caracterizados por epítopos de linfocitos T

mHAg	Proteína/gen	Epítopos de linfocitos T que representan no coincidencias de aminoácido
Humano		
H-Y	proteína UTY	LPHNHTDL
H-Y	proteína SMCY AF273841	SPSVDKARAEI RESEEEVSL
H-X	proteína SMCX NM0044187	FIDSYICQV
DFFRY	Gen Y específico Y13619	IVDCLTEMY IVDLTEMY
HA-1	KIAA0223/AF092537 , CD49a	VLHDDLLEA VLRDDLLEA
HA-2	Miosina Clase 1	YIGEVLVSV YLGEVLVSV YLGEVIVSV
HA-3	n.n.	n.n.
HA-4	n.n.	n.n.
HA-8	KIAA0020	PTLDKVLEV PTLDKVLEL RTLDKVLEV
HA-5	n.n.	n.n.
HB-1	CD83 XM004500,	EEKRGS�HVW EEKRGSLYVW
CD31		
Renal	Q9Y696	FLDGNELTL
cloruro		FLDGNEMTL
canal		
Proteinasa 3		119 Ile>Val

Tabla 2: Marcadores de superficie celular en enfermedades hematológicas

Marcador	Sinónimos	Especificidad
CD 1		Timocitos, células de Langerhans
CD 2		Linfocitos T y células NK
CD 3		Todos los timocitos, linfocitos T y células NK
CD 4		Linfocitos T coadyuvantes
CD 5		Todos los linfocitos T, algunas Células B
CD 7		Todos los linfocitos T, algunas células mieloides
CD 8		Linfocitos T citotóxicos
CD 10	Antígeno CALLA	Precursor temprano y células pre-B
CD13		Granulocitos, monocitos
CD 14		Monocitos
CD 15	Leu M2	Todos los granulocitos, células de Reed Sternberg
CD 16		Células NK y granulocitos
CD 19		Células pre-B, Células B, pero no plasmocitos
CD 20	L26	Células pre-B, pero no plasmocitos
CD 21	EBV-R	Células B maduras y células dendríticas foliculares
CD 22		B maduro
CD 23		Células B activadas de médula ósea
CD 30	Ki-I	Marcador de activación para Células B, linfocitos T y monocitos
CD 33		Progenitor de mieloide y monocitos
CD 34		Celula progenitora pluripotente temprana
CD 42	Plaqueta GPIb	Progenitor mieloide
CD 45	LCA, leucocito común a todos los antígenos	leucocitos
CD 61	Glicoforina plaqueta	Asociada con M7 AML
S100		Células dendríticas interdigitantes de la zona paracortical del ganglio linfático
CD 103	Alfa(E)beta7-intergrina	Linfocitos T intraepiteliales

Tabla 3: Intercambios de aminoácido en antígenos definidos por SNP codificantes:

5

Proteína/Clon	Pos. AA en la proteína	Intercambio AA	Fuente del clon	Comentarios
CD1b				
SS1509573	219	R>H	cDNA	
CD5				
	461	R>T	Genómica	
CD10				
	26	R>P	Genómica	
	44	R>T	Genómica	

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína/Clon	Pos. AA en la proteína	Intercambio AA	Fuente del clon	Comentarios
	81	R>T	Genómica	
CD11a				
SS2883077	456	I>V	Genómica (inversa)	
	503	L>V	Genómica (inversa)	¿E/lb límite?
SS2077810	186	T>S	Genómica	
	101	F>L	Genómica	
CD11c				
	201	F>L	Genómica	
	1126	V>A	Genómica	
CD15				
SS602631	688	D>G	Genómica	
	699	H>Y	Genómica	
	717	V>F	Genómica	
SS568511	577	S>R	Genómica	
SS601426	623	N>D	Genómica (inversa)	
SS599361	585	S>N	Genómica (inversa)	
CD31				
	125	L>V		
	563	N>S		
	80	V>M		
	670	G>R		
CD32				
SS2972668	57	Q>STOP	Genómica (inversa)	
	83	Q>P	Genómica (inversa)	
SS2707025	149	R>H	Genómica (inversa)	
	174	Q>P	Genómica (inversa)	
	180	Q>H	Genómica (inversa)	
CD42b				
ss523802	254	A>S	Genómica (inversa)	
	279	G>W	Genómica (inversa)	
CD49a/HA-1				
BG220673	924	F>V		
BG199875	937	A>V		
	961	I>V		
	1018	K>R		
BG207145	984	T>S		
	1097	R>G		
BG213953	1045	N>D		
	1048	S>Y		
BG216186	980	N>D		
	1019	N>L		
BG189057	1089	V>G		
BG181165	1072	S>C		
CD64				
	272	R>H	Genómica	
SS2113895	224	Q>STOP	Genómica	
	272	R>H	Genómica	
SS2628592	224	Q>STOP	Genómica	
	272	R>H	Genómica	
SS848192	224	Q>STOP	Genómica	Igual a SS831265
SS831265	115	T>M	Genómica	*
SS2494502	115	T>M	Genómica	*
SS791727	105	L>P	Genómica	*
	115	T>M	Genómica	
	115	T>M	Genómica	
	171	M>K	Genómica	
	175	R>H	Genómica	
SS2771101	324	D>N	Genómica	
	338	T>I	Genómica	

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína/Clon	Pos. AA en la proteína	Intercambio AA	Fuente del clon	Comentarios
SS2763847	324	D>N	Genómica	
	338	T>I	Genómica	
SS2771100	324	D>N	Genómica	
	338	T>I	Genómica	
SS2776265	324	D>N	Genómica	
	338	T>I	Genómica	
	338	T>I	Genómica	
SS2763848	324	D>N	Genómica	
	338	T>I	Genómica	
CD65				
SS2676258	27	W>R	Genómica	
CD83/HB-15				
BI7649019	53	L>M		
	52	L>V		
	51	K>N		
	86	N>S		
BI915668	185	F>S		
BG705577	24	K>Q		
Desmina				
SS2086285	23	G>V	Genómica	*
	25	P>S	Genómica	*
	39	G>P	Genómica	*
	66	S>L	Genómica	
	119	F>S	Genómica	*
	120	A>P	Genómica	*
	121	N>I	Genómica	*
	123	I>M	Genómica	*
SS2857642	134	Inserción A	Genómica	*
Glicoforina A				
SS1551184	13	A>E	ADNc	
Raro				
SS149153	206	E>D	Genómica	
SS2969286	1760	I>V	Genómica	
SS22973	1067	N>K	Genómica	
SS1524550	464	G>E	ADNc	
SS15224552	517	Q>H	ADNc	
SMCY				
SS2882267	748	T>A	Genómica	
	755	I>V	Genómica	
	804	R>Q	Genómica	
	817	V>A	Genómica	
Vimentina				
SS1554759	399	T>A	ADNc	

Tabla 4: Péptidos de unión a HLA clase I que representan intercambios de aminoácido en CD42

5

Fragmento de péptido CD42b	Tipo de HLA	Pos.	Péptido de unión a HLA	Puntos
WKQGVDVKAMTSNVASVQ	HLA-A*0201	9	A M T S N V A S V	27
	HLA-A*0201	6	D V K A M T S N V	14
	HLA-A*0201	1	W K Q G V D V K A	10
	HLA-A*0201	2	K Q G V D V K A M	9
	HLA-A*0201	8	K A M T S N V A S	9
	HLA-A*0201	4	G V D V K A M T S	8
	HLA-A*0201	7	V K A M T S N V A	8
	HLA-A*0203	7	V K A M T S N V A	12
	HLA-A*0203	1	W K Q G V D V K A	9
	HLA A1	4	G V D V K A M T S	10
	HLA A1	10	M T S N V A S V Q	9
	HLA A3	4	G V D V K A M T S	19
	HLA A3	6	D V K A M T S N V	16

(continuación)

Fragmento de péptido CD42b	Tipo de HLA	Pos.	Péptido de unión de HLA	Puntos
	HLA A3	10	MTSNVASVQ	12
	HLA A3	3	QGV DVKAMT	8
	HLA A3	8	KAMTSNVAS	8
	HLA A3	9	AMTSNVASV	8
WKQGV DVKSMTSNVASVQ	HLA-A*0201	9	SMTSNVASV	27
	HLA-A*0201	6	DVKSM TSNV	14
	HLA-A*0201	2	KQGV DVKSM	10
	HLA-A*0201	4	GVDVKSMTS	8
	HLA-A*0203	7	VKSMTSNVA	9
	HLA A1	4	GVDVKSMTS	10
	HLA A1	10	MTSNVASVQ	9
	HLA A3	4	GVDVKSMTS	16
	HLA A3	6	DVKSM TSNV	14
	HLA A3	10	MTSNVASVQ	12
	HLA A3	3	QGV DVKSMT	8
	HLA A3	8	KSM TSNVAS	8
PVYKYPGKGCPTLGDEG	HLA-A*0201	5	YPGKGCPTL	17
	HLA-A*0201	4	KYPGKGCPT	8
	HLA A1	3	YKYPGKGCPT	8
	HLA A3	1	PVYKYPGKGC	16
	HLA A3	3	YKYPGKGCPT	10
	HLA A3	4	KYPGKGCPT	9
PVYKYPGKWCP T LGDEG	HLA-A*0201	5	YPGKWCP T L	15
	HLA-A*0201	4	KYPGKWCP T	8
	HLA A1	3	YKYPGKWCP	8
	HLA A3	1	PVYKYPGKW	16
	HLA A3	3	YKYPGKWCP	9

5 **Tabla 5:** Péptidos de unión a HLA que representan intercambios de aminoácido en proteínas CD selectas:

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
CD11c	FSNKFQTHFTFEEFRRT	HLA-A*0201	9	FTFEEFRRT	12
		HLA A1	9	FTFEEFRRT	10
		HLA A1	6	QTHFTFEEF	9
		HLA A3	3	NKFQTHFTF	8
	FSNKFQTHLTFEEFRRT	HLA-A*0201	1	FSNKFQTHL	13
		HLA-A*0201	9	LTFFEEFRRT	13
		HLA A1	6	QTHLTFEEF	9
		HLA A1	9	LTFFEEFRRT	9
		HLA A3	8	HLTFEEFRR	14
		HLA A3	3	NKFQTHLTF	11
	LLLALITAVLYKVGFFK	HLA-A*0201	1	LLLALITAV	30
		HLA-A*0201	2	LLALITAVL	28
		HLA-A*0201	5	LITAVLYKV	26
		HLA-A*0201	4	ALITAVLYK	19
		HLA-A*0201	8	AVLYKVGFF	12
		HLA-A*0201	9	VLYKVGFFK	12
		HLA-A*0201	3	LALITAVLY	10
		HLA-A*0201	6	ITAVLYKVG	8
		HLA-A*0201	7	TAVLYKVG	8
		HLA A1	3	LALITAVLY	17
		HLA A1	4	ALITAVLYK	9
		HLA A3	4	ALITAVLYK	29
		HLA A3	9	VLYKVGFFK	28
		HLA A3	8	AVLYKVGFF	21
		HLA A3	2	LLALITAVL	19
		HLA A3	1	LLLALITAV	16

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	3	LALITAVLY	16
		HLA A3	5	LITAVLYKV	11
		HLA A3	7	TAVLYKVG F	9
	LLLALITAALYKLGFFK	HLA-A*0201	2	LLALITAAL	29
		HLA-A*0201	5	LITAALYKL	26
		HLA-A*0201	1	LLLALITAA	24
		HLA-A*0201	4	ALITAALYK	15
		HLA-A*0201	9	ALYKLGFFK	14
		HLA-A*0201	8	AALYKLGFF	12
		HLA-A*0201	3	LALITAALY	10
		HLA-A*0201	7	TAALYKLG F	9
		HLA-A*0201	6	ITAALYKLG	8
		HLA-A*0203	1	LLLALITAA	9
		HLA A1	3	LALITAALY	17
		HLA A1	4	ALITAALYK	8
		HLA A1	6	ITAALYKLG	8
		HLA A3	4	ALITAALYK	32
		HLA A3	9	ALYKLGFFK	30
		HLA A3	1	LLLALITAA	16
		HLA A3	2	LLALITAAL	16
		HLA A3	3	LALITAALY	15
		HLA A3	8	AALYKLGFF	11
		HLA A3	5	LITAALYKL	10
		HLA A3	7	TAALYKLG F	9
CD15	VTYLQNGKDRKYFHNN	HLA-A*0201	3	YLQNGKDRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKD	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKDRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKDRKY	18
		HLA A1	1	VTYLQNGKD	12
		HLA A1	7	GKDRKYFHH	10
		HLA A3	3	YLQNGKDRK	23
		HLA A3	2	TYLQNGKDR	9
		HLA A3	4	LQNGKDRKY	9
		HLA A3	6	NGKDRKYFH	8
		HLA A3	7	GKDRKYFHH	8
	VTYLQNGKGRKYFHNN	HLA-A*0201	3	YLQNGKGRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKG	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKGRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKGRKY	19
		HLA A1	1	VTYLQNGKG	12
		HLA A3	3	YLQNGKGRK	24
		HLA A3	4	LQNGKGRKY	12
		HLA A3	2	TYLQNGKGR	9
		HLA A3	5	QNGKGRKYF	9
		HLA A3	6	NGKGRKYFH	9
		HLA A3	7	GKGRKYFHH	8
	GSYFCRGLVGSKNVSS	HLA-A*0201	7	GLVGSKNV S	14
		HLA-A*0201	6	RGLVGSKNV	13
		HLA-A*0201	1	GSYFCRGLV	11
		HLA-A*0201	3	YFCRGLVGS	11
		HLA-A*0201	8	LVGSKNVSS	11
		HLA-A*0201	4	FCRGLVGSK	10
		HLA A1	2	SYFCRGLVG	10
		HLA A3	4	FCRGLVGSK	18
		HLA A3	8	LVGSKNVSS	17
		HLA A3	7	GLVGSKNV S	16
		HLA A3	2	SYFCRGLVG	13
		HLA A3	3	YFCRGLVGS	9
		HLA A3	5	CRGLVGSKN	8

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	6	RGLVGSKNV	8
	GSYFCRGLFGSKNVSS	HLA-A*0201	7	GLFGSKNVS	15
		HLA-A*0201	6	RGLFGSKNV	12
		HLA-A*0201	3	YFCRGLFGS	9
		HLA A1	2	SYFCRGLFG	9
		HLA A3	4	FCRGLFGSK	18
		HLA A3	7	GLFGSKNVS	16
		HLA A3	1	GSYFCRGLF	10
		HLA A3	2	SYFCRGLFG	9
		HLA A3	6	RGLFGSKNV	8
	VTYLQNGKDRKYFHNN	HLA-A*0201	3	YLQNGKDRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKD	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKDRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKDRKY	18
		HLA A1	1	VTYLQNGKD	12
		HLA A1	7	GKDRKYFHH	10
		HLA A3	3	YLQNGKDRK	23
		HLA A3	2	TYLQNGKDR	9
		HLA A3	4	LQNGKDRKY	9
		HLA A3	6	NGKDRKYFH	8
		HLA A3	7	GKDRKYFHH	8
	VTYLQNGKGRKYFHNN	HLA-A*0201	3	YLQNGKGRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKG	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKGRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKGRKY	19
		HLA A1	1	VTYLQNGKG	12
		HLA A3	3	YLQNGKGRK	24
		HLA A3	4	LQNGKGRKY	12
		HLA A3	2	TYLQNGKGR	9
		HLA A3	5	QNGKGRKYF	9
		HLA A3	6	NGKGRKYFH	9
		HLA A3	7	GKGRKYFHH	8
	SGSYFCRGLVGSKNVSS	HLA-A*0201	8	GLVGSKNVS	14
		HLA-A*0201	1	SGSYFCRGL	13
		HLA-A*0201	7	RGLVGSKNV	13
		HLA-A*0201	2	GSYFCRGLV	11
		HLA-A*0201	4	YFCRGLVGS	11
		HLA-A*0201	9	LVGSKNVSS	11
		HLA-A*0201	5	FCRGLVGSK	10
		HLA A1	3	SYFCRGLVG	10
		HLA A3	5	FCRGLVGSK	18
		HLA A3	9	LVGSKNVSS	17
		HLA A3	8	GLVGSKNVS	16
		HLA A3	3	SYFCRGLVG	13
		HLA A3	4	YFCRGLVGS	9
		HLA A3	6	CRGLVGSKN	8
		HLA A3	7	RGLVGSKNV	8
	SGSYFCRGLFGSKNVSS	HLA-A*0201	8	GLFGSKNVS	15
		HLA-A*0201	1	SGSYFCRGL	13
		HLA-A*0201	7	RGLFGSKNV	12
		HLA-A*0201	4	YFCRGLFGS	9
		HLA A1	3	SYFCRGLFG	9
		HLA A3	5	FCRGLFGSK	18
		HLA A3	8	GLFGSKNVS	16
		HLA A3	2	GSYFCRGLF	10
		HLA A3	3	SYFCRGLFG	9
		HLA A3	7	RGLFGSKNV	8
	VFLEPQWYSVLEKDSV	HLA-A*0201	2	FLEPQWYSV	25
		HLA-A*0201	8	YSVLEKDSV	14
		HLA-A*0201	3	LEPQWYSVL	12

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A1	2	FLEPQWYSV	18
		HLA A3	2	FLEPQWYSV	15
		HLA A3	5	PQWYSVLEK	13
	VFLEPQWYRVLEKDSV	HLA-A*0201	2	FLEPQWYRV	23
		HLA-A*0201	8	YRVLEKDSV	14
		HLA-A*0201	3	LEPQWYRVL	12
		HLA A1	2	FLEPQWYRV	18
		HLA A3	5	PQWYRVLEK	15
		HLA A3	2	FLEPQWYRV	13
		HLA A3	6	QWYRVLEKD	10
	VTYLQNGKDRKYFHHNS	HLA-A*0201	3	YLQNGKDRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKD	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKDRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKDRKY	18
		HLA A1	1	VTYLQNGKD	12
		HLA A1	7	GKDRKYFHH	10
		HLA A3	3	YLQNGKDRK	23
		HLA A3	2	TYLQNGKDR	9
		HLA A3	4	LQNGKDRKY	9
		HLA A3	6	NGKDRKYFH	8
		HLA A3	7	GKDRKYFHH	8
	VTYLQNGKGRKYFHHNS	HLA-A*0201	3	YLQNGKGRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKG	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKGRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKGRKY	19
		HLA A1	1	VTYLQNGKG	12
		HLA A3	3	YLQNGKGRK	24
		HLA A3	4	LQNGKGRKY	12
		HLA A3	2	TYLQNGKGR	9
		HLA A3	5	QNGKGRKYF	9
		HLA A3	6	NGKGRKYFH	9
		HLA A3	7	GKGRKYFHH	8
	VFLEPQWYSVLEKDSVTYFI DAA	HLA-A*0201	2	FLEPQWYSV	25
		HLA-A*0201	9	SVLEKDSVT	15
		HLA-A*0201	8	YSVLEKDSV	14
		HLA-A*0201	10	VLEKDSVTY	14
		HLA-A*0201	15	SVTYFIDAA	14
		HLA-A*0201	3	LEPQWYSVL	12
		HLA-A*0201	12	EKDSVTYFI	8
		HLA-A*0203	14	DSVTYFIDA	9
		HLA-A*0203	15	SVTYFIDAA	9
		HLA A1	10	VLEKDSVTY	27
		HLA A1	2	FLEPQWYSV	18
		HLA A1	12	EKDSVTYFI	12
		HLA A1	14	DSVTYFIDA	12
		HLA A3	10	VLEKDSVTY	24
		HLA A3	9	SVLEKDSVT	22
		HLA A3	2	FLEPQWYSV	15
		HLA A3	5	PQWYSVLEK	13
		HLA A3	15	SVTYFIDAA	12
	VFLEPQWYRVLEKDSVTYFI DAA	HLA-A*0201	2	FLEPQWYRV	23
		HLA-A*0201	8	YRVLEKDSV	14
		HLA-A*0201	10	VLEKDSVTY	14
		HLA-A*0201	15	SVTYFIDAA	14
		HLA-A*0201	9	RVLEKDSVT	13
		HLA-A*0201	3	LEPQWYRVL	12

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA-A*0201	12	EKDSVTYFI	8
		HLA-A*0203	14	DSVTYFIDA	9
		HLA A1	15	SVTYFIDAA	9
		HLA A1	10	VLEKDSVTY	27
		HLA A1	2	FLEPQWYRV	18
		HLA A1	12	EKDSVTYFI	12
		HLA A1	14	DSVTYFIDA	12
		HLA A1	5	PQWYRVLEK	7
		HLA A3	9	RVLEKDSVT	25
		HLA A3	10	VLEKDSVTY	24
		HLA A3	5	PQWYRVLEK	15
		HLA A3	2	FLEPQWYRV	13
		HLA A3	15	SVTYFIDAA	12
		HLA A3	6	QWYRVLEKD	10
	TVNDSGEYRCQ	HLA A1	2	VNDSGEYRC	13
		HLA A3	1	TVNDSGEYR	18
	TVDDSGEYRCQ	HLA A1	2	VDDSGEYRC	13
		HLA A1	1	TVDDSGEYR	11
		HLA A3	1	TVDDSGEYR	18
	STQWFHNESLISSQASS	HLA-A*0201	9	SLISSQASS	18
		HLA-A*0201	2	TQWFHNESL	12
		HLA-A*0201	1	STQWFHNES	10
		HLA-A*0201	5	FHNESLISS	10
		HLA-A*0201	3	QWFHNESLI	9
		HLA-A*0203	7	NESLISSQA	9
		HLA A1	6	HNESLISSQ	10
		HLA A1	1	STQWFHNES	8
		HLA A3	9	SLISSQASS	19
	STQWFHNENLISSQASS	HLA-A*0201	9	NLISSQASS	16
		HLA-A*0201	1	STQWFHNEN	10
		HLA-A*0201	2	TQWFHNENL	10
		HLA-A*0201	3	QWFHNENLI	10
		HLA-A*0201	5	FHNENLISS	10
		HLA-A*0203	7	NENLISSQA	9
		HLA A1	6	HNENLISSQ	10
		HLA A1	1	STQWFHNEN	8
		HLA A3	9	NLISSQASS	18
CD1b	PGRLQLVCHVS	HLA-A*0201	2	GRLQLVCHV	18
		HLA-A*0201	3	RLQLVCHVS	11
		HLA A3	3	RLQLVCHVS	20
		HLA A3	1	PGRQLVCH	12
	PGHLQLVCHVS	HLA-A*0201	2	GHLQLVCHV	18
		HLA-A*0201	3	HLQLVCHVS	11
		HLA A3	3	HLQLVCHVS	16
		HLA A3	1	PGHLQLVCH	9
CD32	HSPESDSIQWFHNGNLI	HLA-A*0201	7	SIQWFHNGN	13
		HLA-A*0201	8	IQWFHNGNL	12
		HLA-A*0201	9	QWFHNGNLI	10
		HLA A1	2	SPESDSIQW	16
		HLA A3	4	ESDSIQWFH	14
		HLA A3	7	SIQWFHNGN	9
	HSPESDSIPWFHNGNLI	HLA-A*0201	7	SIPWFHNGN	13
		HLA-A*0201	8	IPWFHNGNL	12
		HLA A1	2	SPESDSIPW	16
		HLA A1	4	ESDSIPWFH	14
		HLA A1	6	DSIPWFHNG	11
		HLA A3	7	SIPWFHNGN	9
	GVPGGRNHRAEVPQLEG	HLA-A*0201	4	GGRNHRAEV	15
		HLA-A*0201	7	NHRAEVPQL	15
		HLA-A*0201	1	GVPGGRNHR	10

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA-A*0201	2	V P G G R N H R A	8
		HLA-A*0203	2	V P G G R N H R A	9
		HLA A1	9	R A E V P Q L E G	17
		HLA A3	1	G V P G G R N H R	19
		HLA A3	6	R N H R A E V P Q	11
		HLA A3	5	G R N H R A E V P	9
		HLA A3	4	G G R N H R A E V	8
		HLA A3	7	N H R A E V P Q L	8
	GVPGGRNHHAIEVPQLEG	HLA-A*0201	4	G G R N H H A E V	15
		HLA-A*0201	7	N H H A E V P Q L	15
		HLA-A*0201	1	G V P G G R N H H	10
		HLA-A*0201	2	V P G G R N H H A	8
		HLA-A*0203	2	V P G G R N H H A	9
		HLA A1	9	H A E V P Q L E G	17
		HLA A3	1	G V P G G R N H H	19
		HLA A3	6	R N H H A E V P Q	8
	HILPEWKIQEIFPFGSQLLH PTSKP	HLA-A*0201	10	E I F P F G S Q L	19
		HLA-A*0201	17	Q L L H P T S K P	17
		HLA-A*0201	3	L P E W K I Q E I	16
		HLA-A*0201	2	I L P E W K I Q E	14
		HLA-A*0201	11	I F P F G S Q L L	13
		HLA-A*0201	7	K I Q E I F P F G	12
		HLA-A*0201	1	H I L P E W K I Q	11
		HLA-A*0201	14	F G S Q L L H P T	11
		HLA A1	3	L P E W K I Q E I	10
		HLA A1	8	I Q E I F P F G S	10
		HLA A1	12	F P F G S Q L L H	10
		HLA A1	13	P F G S Q L L H P	8
		HLA A3	10	E I F P F G S Q L	20
		HLA A3	16	S Q L L H P T S K	18
		HLA A3	17	Q L L H P T S K P	17
		HLA A3	2	I L P E W K I Q E	16
		HLA A3	1	H I L P E W K I Q	13
		HLA A3	7	K I Q E I F P F G	12
		HLA A3	12	F P F G S Q L L H	9
		HLA A3	9	Q E I F P F G S Q	8
	HILPEWKIPEILPFGSHLLH PTSKP	HLA-A*0201	11	I L P F G S H L L	24
		HLA-A*0201	10	E I L P F G S H L	20
		HLA-A*0201	3	L P E W K I P E I	17
		HLA-A*0201	17	H L L H P T S K P	17
		HLA-A*0201	7	K I P E I L P F G	16
		HLA-A*0201	2	I L P E W K I P E	14
		HLA-A*0201	1	H I L P E W K I P	11
		HLA-A*0201	14	F G S H L L H P T	11
		HLA-A*0201	6	W K I P E I L P F	9
		HLA-A*0201	4	P E W K I P E I L	8
		HLA A1	3	L P E W K I P E I	10
		HLA A1	6	W K I P E I L P F	10
		HLA A1	8	I P E I L P F G S	10
		HLA A1	12	L P F G S H L L H	9
		HLA A3	10	E I L P F G S H L	19
		HLA A3	16	S H L L H P T S K	18
		HLA A3	17	H L L H P T S K P	15
		HLA A3	11	I L P F G S H L L	14
		HLA A3	1	H I L P E W K I P	13
		HLA A3	2	I L P E W K I P E	13
		HLA A3	6	W K I P E I L P F	12

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	7	KIPEILPFG	11
		HLA A3	9	PEILPFGSH	11
		HLA A3	12	LPFGSHLLH	9
CD42b	WKQGV DVKAMTSNVASVQ	HLA-A*0201	9	AMTSNVASV	27
		HLA-A*0201	6	DVKAMTSNV	14
		HLA-A*0201	1	WKQGV DVKA	10
		HLA-A*0201	2	KQGV DVKAM	9
		HLA-A*0201	8	KAMTSNVAS	9
		HLA-A*0201	4	GVDVKAMTS	8
		HLA-A*0201	7	VKAMTSNVA	8
		HLA-A*0203	7	VKAMTSNVA	12
		HLA-A*0203	1	WKQGV DVKA	9
		HLA A1	4	GVDVKAMTS	10
		HLA A1	10	MTSNVASVQ	9
		HLA A3	4	GVDVKAMTS	19
		HLA A3	6	DVKAMTSNV	16
		HLA A3	10	MTSNVASVQ	12
		HLA A3	3	QGV DVKAMT	8
		HLA A3	8	KAMTSNVAS	8
		HLA A3	9	AMTSNVASV	8
	WKQGV DVKSMTSNVASVQ	HLA-A*0201	9	SMTSNVASV	27
		HLA-A*0201	6	DVKSMTSNV	14
		HLA-A*0201	2	KQGV DVKSM	10
		HLA-A*0201	4	GVDVKSMTS	8
		HLA-A*0203	7	VKSMTSNVA	9
		HLA A1	4	GVDVKSMTS	10
		HLA A1	10	MTSNVASVQ	9
		HLA A3	4	GVDVKSMTS	16
		HLA A3	6	DVKSMTSNV	14
		HLA A3	10	MTSNVASVQ	12
		HLA A3	3	QGV DVKSMT	8
		HLA A3	8	KSMTSNVAS	8
	PVYKYPGKGCPTLGDEG	HLA-A*0201	5	YPGKGCPTL	17
		HLA-A*0201	4	KYPGKGCPT	8
		HLA A1	3	YKYPGKGCPT	8
		HLA A3	1	PVYKYPGKGCPT	16
		HLA A3	3	YKYPGKGCPT	10
		HLA A3	4	KYPGKGCPT	9
	PVYKYPGKWCP TLGDEG	HLA-A*0201	5	YPGKWCP TL	15
		HLA-A*0201	4	KYPGKWCP T	8
		HLA A1	3	YKYPGKWCP	8
		HLA A3	1	PVYKYPGKW	16
		HLA A3	3	YKYPGKWCP	9
CD64	TEDGNV LKR SPELELQV	HLA-A*0201	5	NVLKR SPEL	19
		HLA-A*0201	7	LKR SPELEL	16
		HLA-A*0201	9	R SPELELQV	14
		HLA-A*0201	6	VLKR SPELE	10
		HLA-A*0201	1	TEDGNV LKR	9
		HLA A1	1	TEDGNV LKR	20
		HLA A1	9	R SPELELQV	10
		HLA A3	6	VLKR SPELE	15
		HLA A3	5	NVLKR SPEL	14
		HLA A3	9	R SPELELQV	11
		HLA A3	1	TEDGNV LKR	9
	TEDGNV LKH SPELELQV	HLA-A*0201	5	NVLKH SPEL	19
		HLA-A*0201	7	LKH SPELEL	16
		HLA-A*0201	9	H SPELELQV	14
		HLA-A*0201	6	VLKH SPELE	10
		HLA-A*0201	1	TEDGNV LKH	9

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A1	1	TE D G N V L K H	20
		HLA A1	9	H S P E L E L Q V	10
		HLA A3	5	N V L K H S P E L	12
		HLA A3	6	V L K H S P E L E	12
		HLA A3	1	T E D G N V L K H	9
	LLQVSSRVFTEGEPLALR	HLA-A*0201	9	F T E G E P L A L	18
		HLA-A*0201	7	R V F T E G E P L	15
		HLA-A*0201	1	L L Q V S S R V F	12
		HLA-A*0201	3	Q V S S R V F T E	10
		HLA-A*0201	8	V F T E G E P L A	9
		HLA-A*0201	10	V F T E G E P L A	9
		HLA-A*0201	2	L Q V S S R V F T	8
		HLA-A*0203	8	V F T E G E P L A	9
		HLA A1	9	F T E G E P L A L	24
		HLA A1	4	V S S R V F T E G	10
		HLA A3	1	L L Q V S S R V F	18
		HLA A3	3	Q V S S R V F T E	18
		HLA A3	7	R V F T E G E P L	17
		HLA A3	10	T E G E P L A L R	8
	LLQVSSRVFMEGEPLALR	HLA-A*0201	9	F M E G E P L A L	22
		HLA-A*0201	7	R V F M E G E P L	15
		HLA-A*0201	1	L L Q V S S R V F	12
		HLA-A*0201	8	V F M E G E P L A	11
		HLA-A*0201	10	M E G E P L A L R	9
		HLA-A*0201	2	L Q V S S R V F M	8
		HLA-A*0201	3	Q V S S R V F M E	8
		HLA-A*0203	8	V F M E G E P L A	9
		HLA A1	9	F M E G E P L A L	18
		HLA A1	4	V S S R V F M E G	10
		HLA A3	1	L L Q V S S R V F	18
		HLA A3	7	R V F M E G E P L	17
		HLA A3	3	Q V S S R V F M E	15
		HLA A3	10	M E G E P L A L R	8
	NGTYHCSEGMGKHRYTSAGI	HLA-A*0201	8	G M G K H R Y T S	12
		HLA-A*0201	11	K H R Y T S A G I	11
		HLA-A*0201	7	S G M G K H R Y T	10
		HLA-A*0203	9	M G K H R Y T S A	9
		HLA A1	6	C S G M G K H R Y	21
		HLA A3	3	T Y H C S G M G K	14
		HLA A3	5	H C S G M G K H R	9
		HLA A3	11	K H R Y T S A G I	9
		HLA A3	6	C S G M G K H R Y	8
	NGTYHCSEGKGKHHYTSAGI	HLA-A*0201	11	K H H Y T S A G I	11
		HLA-A*0201	7	S G K G K H H Y T	9
		HLA-A*0201	2	G T Y H C S G K G	8
		HLA-A*0203	9	K G K H H Y T S A	9
		HLA A1	6	C S G K G K H H Y	21
		HLA A1	2	G T Y H C S G K G	8
		HLA A3	1	N G T Y H C S G K	13
		HLA A3	3	T Y H C S G K G K	13
		HLA A3	5	H C S G K G K H H	10
		HLA A3	6	C S G K G K H H Y	8
	ELKRKKKWDLEISLDSGHEK	HLA-A*0201	6	K K W D L E I S L	16
		HLA-A*0201	9	D L E I S L D S G	14
		HLA-A*0201	2	L K R K K K W D L	13
		HLA-A*0201	4	R K K K W D L E I	10
		HLA-A*0201	12	I S L D S G H E K	8
		HLA A1	7	K W D L E I S L D	12
		HLA A1	9	D L E I S L D S G	11
		HLA A3	12	I S L D S G H E K	18

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	1	ELKRKKKWD	16
		HLA A3	9	DLEISLDSG	13
		HLA A3	10	LEISLDSGH	10
		HLA A3	11	EISLDSGHE	10
		HLA A3	4	RKKKWDLEI	8
	ELKRKKKWNLEISLDSGHEK	HLA-A*0201	6	KKWNLEISL	15
		HLA-A*0201	9	NLEISLDSG	15
		HLA-A*0201	2	LKRKKKWNL	13
		HLA-A*0201	4	RKKKWNLEI	10
		HLA-A*0201	12	ISLDSGHEK	8
		HLA A1	9	NLEISLDSG	11
		HLA A3	12	ISLDSGHEK	18
		HLA A3	1	ELKRKKKWN	16
		HLA A3	9	NLEISLDSG	13
		HLA A3	10	LEISLDSGH	10
		HLA A3	11	EISLDSGHE	10
		HLA A3	4	RKKKWNLEI	8
	KVTSSLQEDRH	HLA-A*0201	1	KVTSSLQED	10
		HLA A3	1	KVTSSLQED	13
	KVISSLQEDRH	HLA-A*0201	1	KVISSLQED	13
		HLA-A*0201	2	VISLQEDR	10
		HLA A3	1	KVISSLQED	16
		HLA A3	2	VISLQEDR	12
	VSSRVFTEGEPLALR	HLA-A*0201	6	FTEGEPLAL	18
		HLA-A*0201	4	RVFTEGEPL	15
		HLA-A*0201	5	VFTEGEPLA	9
		HLA-A*0201	7	TEGEPLALR	9
		HLA-A*0203	5	VFTEGEPLA	9
		HLA A1	6	FTEGEPLAL	24
		HLA A1	1	VSSRVFTEG	10
		HLA A3	4	RVFTEGEPL	17
		HLA A3	7	TEGEPLALR	8
	VSSRVFMEGEPLALR	HLA-A*0201	6	FMEGEPLAL	22
		HLA-A*0201	4	RVFMEGEPL	15
		HLA-A*0201	8	VFMEGEPLA	11
		HLA-A*0201	7	MEGEPLALR	9
		HLA-A*0203	5	VFMEGEPLA	9
		HLA A1	6	FMEGEPLAL	18
		HLA A1	1	VSSRVFMEG	10
		HLA A3	4	RVFMEGEPL	17
		HLA A3	7	MEGEPLALR	8
	LQVSSRVFTEGEPLALR	HLA-A*0201	8	FTEGEPLAL	18
		HLA-A*0201	6	RVFTEGEPL	15
		HLA-A*0201	2	QVSSRVFTE	10
		HLA-A*0201	7	VFTEGEPLA	9
		HLA-A*0201	9	TEGEPLALR	9
		HLA-A*0201	1	LQVSSRVFT	8
		HLA-A*0203	7	VFTEGEPLA	9
		HLA A1	8	FTEGEPLAL	24
		HLA A1	3	VSSRVFTEG	10
		HLA A3	2	QVSSRVFTE	18
		HLA A3	6	RVFTEGEPL	17
		HLA A3	9	TEGEPLALR	8
	LQVSSRVFMEGEPLALR	HLA-A*0201	8	FMEGEPLAL	22
		HLA-A*0201	6	RVFMEGEPL	15
		HLA-A*0201	7	VFMEGEPLA	11
		HLA-A*0201	9	MEGEPLALR	9
		HLA-A*0201	1	LQVSSRVFM	8
		HLA-A*0203	7	VFMEGEPLA	9

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A1	8	FMEGEPLAL	18
		HLA A1	3	VSSRVFMEG	10
		HLA A3	6	RVFMEGEPL	17
		HLA A3	2	QVSSRVFME	15
		HLA A3	9	MEGEPLALR	8
CD65	PATTPPWTRMLWPS	HLA-A*0201	5	PTPWTRML	13
		HLA-A*0201	2	ATTPPWRT	11
		HLA A1	2	ATTPPWRT	11
		HLA A3	7	PWTRMLWP	9
		HLA A3	3	TTTPWTR	8
	PATTPPRRTRMLWPS	HLA-A*0201	5	PTPRRTRML	13
		HLA-A*0201	2	ATTPPRRT	11
		HLA A1	2	ATTPPRRT	11
		HLA A1	3	TTTPRRTR	8
		HLA A3	3	TTTPRRTR	9
		HLA A3	7	PRRTRMLWP	9
		HLA A3	6	TPRTRMLW	8
desmina	GGAGGSGSLRASRL	HLA-A*0201	1	GGAGGSGSL	19
		HLA-A*0201	6	SGSLRASRL	12
		HLA-A*0201	3	AGGSGSLRA	9
		HLA-A*0201	4	GGSGSLRAS	8
		HLA-A*0203	3	AGGSGSLRA	10
		HLA A1	3	AGGSGSLRA	9
		HLA A3	2	GAGGSGSLR	12
		HLA A3	5	GSGSLRASR	10
		HLA A3	6	SGSLRASRL	10
		HLA A3	1	GGAGGSGSL	8
	GGAGGLGSLRASRL	HLA-A*0201	1	GGAGGLGSL	23
		HLA-A*0201	5	GLGSLRASR	16
		HLA-A*0201	6	LGSLRASRL	12
		HLA-A*0201	4	GGLGSLRAS	10
		HLA-A*0201	3	AGGLGSLRA	9
		HLA-A*0201	2	GAGGLGSLR	8
		HLA-A*0203	3	AGGLGSLRA	10
		HLA A1	3	AGGLGSLRA	9
		HLA A3	5	GLGSLRASR	20
		HLA A3	2	GAGGLGSLR	12
		HLA A3	3	AGGLGSLRA	9
		HLA A3	6	LGSLRASRL	9
		HLA A3	1	GGAGGLGSL	8
	RRTFGGAPGFPLGSPLSSPV FPRAGFGSKGSSS	HLA-A*0201	12	LGSPSSPV	15
		HLA-A*0201	11	PLGSPLSSP	14
		HLA-A*0201	4	FGGAPGFPL	12
		HLA-A*0201	15	PLSSPVFPR	12
		HLA-A*0201	2	RTFGGAPGF	11
		HLA-A*0201	8	PGFPLGSPL	11
		HLA-A*0201	6	GAPGFPLGS	10
		HLA-A*0201	16	LSSPVFRA	9
		HLA-A*0201	5	GGAPGFPLG	8
		HLA-A*0201	7	APGFPLGSP	8
		HLA-A*0201	10	FPLGSPLSS	8
		HLA-A*0203	16	LSSPVFRA	9
		HLA A1	16	LSSPVFRA	13
		HLA A1	5	GGAPGFPLG	11
		HLA A1	2	RTFGGAPGF	9
		HLA A1	10	FPLGSPLSS	8
		HLA A3	21	FPRAGFGSK	20
		HLA A3	19	PVFPRAGFG	19
		HLA A3	2	RTFGGAPGF	15

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	11	PLG SPLSSP	15
		HLA A3	15	PLSSPVFPR	14
		HLA A3	1	RRTFGGAPG	12
		HLA A3	10	FPLGSPLSS	10
		HLA A3	8	PGFPLGSPL	9
		HLA A3	13	GSPLSSPVF	9
		HLA A3	18	SPVFPRAGF	9
		HLA A3	22	PRAGFGSKG	9
		HLA A3	25	GFGSKGSSS	9
		HLA A3	14	SPLSSPVFP	9
		HLA A3	24	AGFGSKGSS	9
	RRTFGGAPVFSLG SPLSSPV FPRAPFGSKGSSS	HLA-A*0201	11	SLG SPLSSP	19
		HLA-A*0201	4	FGGAPVFSL	18
		HLA-A*0201	12	LG SPLSSPV	15
		HLA-A*0201	8	PVFSLG SPL	13
		HLA-A*0201	1	RRTFGGAPV	12
		HLA-A*0201	15	PLSSPVFPR	12
		HLA-A*0201	2	RTFGGAPVF	10
		HLA-A*0201	16	LSSPVFPRA	9
		HLA-A*0201	6	GAPVFSLGS	8
		HLA-A*0201	10		
		HLA-A*0203	16	LSSPVFPRA	9
		HLA A1	16	LSSPVFPRA	13
		HLA A1	10	FSLGSPLSS	12
		HLA A1	5	GGAPVFSLG	11
		HLA A1	2	RTFGGAPVF	10
		HLA A3	2	RTFGGAPVF	19
		HLA A3	19	PVFPRAPFG	18
		HLA A3	21	FPRAPFGSK	18
		HLA A3	8	PVFSLG SPL	16
		HLA A3	11	SLG SPLSSP	16
		HLA A3	15	PLSSPVFPR	14
		HLA A3	1	RRTFGGAPV	12
		HLA A3	10	FSLGSPLSS	10
		HLA A3	22	PRAPFGSKG	10
		HLA A3	13	GSPLSSPVF	9
		HLA A3	18	SPVFPRAPF	9
		HLA A3	25	PFGSKGSSS	9
		HLA A3	5	GGAPVFSLG	8
		HLA A3	14	SPLSSPVFP	8
		HLA A3	24	APFGSKGSS	8
	VRFLEQQNALAAEVNRLK	HLA-A*0201	9	ALAAEVNRL	29
		HLA-A*0201	2	RFLEQQNAL	16
		HLA-A*0201	3	FLEQQNALA	16
		HLA-A*0201	6	QQNALAAEV	16
		HLA-A*0201	10	LAAEVNRLK	10
		HLA-A*0201	4	LEQQNALAA	8
		HLA-A*0201	8	NALAAEVNR	8
		HLA-A*0203	1	VRFLEQQNA	9
		HLA-A*0203	3	FLEQQNALA	9
		HLA-A*0203	4	LEQQNALAA	9
		HLA A1	3	FLEQQNALA	17
		HLA A3	9	ALAAEVNRL	16
		HLA A3	3	FLEQQNALA	13
		HLA A3	10	LAAEVNRLK	13
		HLA A3	8	NALAAEVNR	12
		HLA A3	7	QQNALAAEVN	11
		HLA A3	6	QQNALAAEV	10
		HLA A3	2	RFLEQQNAL	8

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
	RFLEQQNAALAAEVNRLK	HLA-A*0201	9	ALAAEVNRL	29
		HLA-A*0201	2	FLEQQNAAL	23
		HLA-A*0201	6	QNAALAAEV	17
		HLA-A*0201	1	RFLEQQNAA	10
		HLA-A*0201	8	ALAAEVNR	10
		HLA-A*0201	10	LAAEVNRLK	10
		HLA-A*0201	3	LEQQNAALA	8
		HLA-A*0201	5	QQNAALAAE	8
		HLA-A*0203	1	RFLEQQNAA	9
		HLA-A*0203	3	LEQQNAALA	9
		HLA-A*0203	4	EQQNAALAA	9
		HLA A1	2	FLEQQNAAL	15
		HLA A3	9	ALAAEVNRL	16
		HLA A3	8	ALAAEVNR	15
		HLA A3	2	FLEQQNAAL	14
		HLA A3	10	LAAEVNRLK	13
		HLA A3	6	QNAALAAEV	11
		HLA A3	7	NAALAAEVN	9
		HLA A3	1	RFLEQQNAA	8
		HLA A3	4	EQQNAALAA	8
		HLA A3	5	QQNAALAAE	8
Glicoforin a	KIIFVLLLSAIVSISASS	HLA-A*0201	6	LLLSAIVSI	30
		HLA-A*0201	2	IIFVLLLSA	23
		HLA-A*0201	4	FVLLLSAIV	20
		HLA-A*0201	3	IFVLLLSAI	16
		HLA-A*0201	7	LLSAIVSIS	16
		HLA-A*0201	1	KIIFVLLLS	15
		HLA-A*0201	10	AIVSISASS	14
		HLA-A*0201	5	VLLLSAIVS	13
		HLA-A*0201	9	SAIVSISAS	13
		HLA-A*0201	8	LSAIVSISA	10
		HLA-A*0203	8	LSAIVSISA	12
		HLA-A*0203	2	IIFVLLLSA	9
		HLA A1	1	KIIFVLLLS	10
		HLA A1	8	LSAIVSISA	10
		HLA A3	5	VLLLSAIVS	20
		HLA A3	1	KIIFVLLLS	18
		HLA A3	6	LLLSAIVSI	18
		HLA A3	4	FVLLLSAIV	16
		HLA A3	10	AIVSISASS	16
		HLA A3	2	IIFVLLLSA	15
		HLA A3	7	LLSAIVSIS	15
		HLA A3	9	SAIVSISAS	8
	KIIFVLLLSEIVSISASS	HLA-A*0201	6	LLLSEIVSI	30
		HLA-A*0201	2	IIFVLLLSE	19
		HLA-A*0201	4	FVLLLSEIV	18
		HLA-A*0201	7	LLSEIVSIS	18
		HLA-A*0201	3	IFVLLLSEI	17
		HLA-A*0201	1	KIIFVLLLS	15
		HLA-A*0201	5	VLLLSEIVS	13
		HLA-A*0201	9	SEIVSISAS	9
		HLA-A*0201	10	EIVSISASS	9
		HLA-A*0203	8	LSEIVSISA	9
		HLA A1	8	LSEIVSISA	20
		HLA A1	1	KIIFVLLLS	10
		HLA A3	1	KIIFVLLLS	18
		HLA A3	6	LLLSEIVSI	18
		HLA A3	5	VLLLSEIVS	17
		HLA A3	2	IIFVLLLSE	15
		HLA A3	7	LLSEIVSIS	14

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	4	FVLLLSEIV	13
		HLA A3	10	EIVSISASS	13
		HLA A3	9	SEIVSISAS	8
Rara	RTVCLDHANLGEGKLSP	HLA-A*0201	7	HANLGEGKL	19
		HLA-A*0201	9	NLGEGKLSP	17
		HLA-A*0201	2	TVCLDHANL	16
		HLA-A*0201	4	CLDHANLGE	12
		HLA-A*0201	5	LDHANLGEG	8
		HLA A1	4	CLDHANLGE	18
		HLA A1	9	NLGEGKLSP	9
		HLA A3	9	NLGEGKLSP	18
		HLA A3	6	DHANLGEGK	15
		HLA A3	2	TVCLDHANL	14
		HLA A3	4	CLDHANLGE	13
		HLA A3	8	ANLGEGKLS	10
	RTVCLDHAKLGEGKLSP	HLA-A*0201	2	TVCLDHAKL	18
		HLA-A*0201	9	KLGEKGLSP	18
		HLA-A*0201	7	HAKLGEGKL	17
		HLA-A*0201	4	CLDHAKLGE	12
		HLA-A*0201	5	LDHAKLGEG	9
		HLA A1	4	CLDHAKLGE	17
		HLA A1	9	KLGEKGLSP	9
		HLA A3	9	KLGEKGLSP	21
		HLA A3	1	RTVCLDHAK	15
		HLA A3	2	TVCLDHAKL	14
		HLA A3	6	DHAKLGEGK	14
		HLA A3	4	CLDHAKLGE	13
		HLA A3	8	AKLGEGKLS	10
	KLAWDFSPGQLDHLFDCFKA SW	HLA-A*0201	6	FSPGQLDHL	17
		HLA-A*0201	1	KLAWDFSPG	13
		HLA-A*0201	12	HLFDCFKAS	12
		HLA-A*0201	2	LAWDFSPGQ	11
		HLA-A*0201	3	AWDFSPGQL	11
		HLA-A*0201	10	QLDHLFDCF	11
		HLA-A*0201	9	GQLDHLFDC	8
		HLA-A*0203	12	DHLFDCFKA	9
		HLA A1	10	QLDHLFDCF	14
		HLA A1	5	DFSPGQLDH	12
		HLA A1	3	AWDFSPGQL	11
		HLA A1	14	LFDCFKASW	10
		HLA A1	6	FSPGQLDHL	8
		HLA A3	1	KLAWDFSPG	17
		HLA A3	10	QLDHLFDCF	16
		HLA A3	5	DFSPGQLDH	12
		HLA A3	13	HLFDCFKAS	12
		HLA A3	11	LDHLFDCFK	11
		HLA A3	3	AWDFSPGQL	8
	KLAWDFSPEQLDHLFDCFKA SW	HLA-A*0201	6	FSPEQLDHL	17
		HLA-A*0201	1	KLAWDFSPE	13
		HLA-A*0201	2	LAWDFSPEQ	12
		HLA-A*0201	13	HLFDCFKAS	12
		HLA-A*0201	3	AWDFSPEQL	11
		HLA-A*0201	10	QLDHLFDCF	11
		HLA-A*0203	12	DHLFDCFKA	9
		HLA A1	7	SPEQLDHLF	14
		HLA A1	10	QLDHLFDCF	14
		HLA A1	3	AWDFSPEQL	11
		HLA A1	5	DFSPEQLDH	10

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A1	14	LFDCFKASW	10
		HLA A3	1	KLAWDF SPE	17
		HLA A3	10	QLDHLFDCF	16
		HLA A3	13	QLDHLFDCF	12
		HLA A3	11	LDHLFDCF K	11
		HLA A3	5	DFSPEQLDH	10
	VLNLLWNLAQSDDVPV	HLA-A*0201	1	VLNLLWNLA	18
		HLA-A*0201	3	NLLWNLAQS	18
		HLA-A*0201	8	LAQSDDVPV	18
		HLA-A*0201	4	LLWNLAQSD	16
		HLA-A*0201	6	WNLAQSDDV	12
		HLA-A*0201	7	NLAQSDDVP	12
		HLA-A*0203	1	VLNLLWNLA	9
		HLA A3	3	NLLWNLAQS	18
		HLA A3	4	LLWNLAQSD	16
		HLA A3	7	NLAQSDDVP	15
		HLA A3	1	VLNLLWNLA	11
	VLNLLWNLAHSDDVPV	HLA-A*0201	1	VLNLLWNLA	18
		HLA-A*0201	3	NLLWNLAHS	18
		HLA-A*0201	8	LAHSDDVPV	18
		HLA-A*0201	4	LLWNLAHSD	17
		HLA-A*0201	6	WNLAHSDDV	12
		HLA-A*0201	7	NLAHSDDVP	12
		HLA-A*0203	1	VLNLLWNLA	9
		HLA A3	4	LLWNLAHSD	16
		HLA A3	3	NLLWNLAHS	15
		HLA A3	7	NLAHSDDVP	15
		HLA A3	1	VLNLLWNLA	11
		HLA A3	2	LNLLWNLAH	11
	FSPGQLDHLFDC	HLA-A*0201	1	FSPGQLDHL	17
		HLA-A*0201	4	GQLDHLFDC	8
		HLA A1	1	FSPGQLDHL	8
	FSPEQLDHLFDC	HLA-A*0201	1	FSPEQLDHL	17
		HLA A1	2	SPEQLDHLF	14
Smcy	RYTLDELPTMLHKLKIR	HLA-A*0201	6	ELPTMLHKL	24
		HLA-A*0201	3	TLDELPTML	23
		HLA-A*0201	2	YTLDELPTM	20
		HLA-A*0201	9	TMLHKLKIR	14
		HLA-A*0201	8	PTMLHKLKI	13
		HLA A1	8	PTMLHKLKI	14
		HLA A1	4	LDELPTMLH	13
		HLA A1	3	TLDELPTML	12
		HLA A1	5	DELPTMLHK	10
		HLA A1	2	YTLDELPTM	8
		HLA A3	5	DELPTMLHK	18
		HLA A3	3	TLDELPTML	14
		HLA A3	6	ELPTMLHKL	10
		HLA A3	7	LPTMLHKLK	10
		HLA A3	1	RYTLDELPT	8
	RYTLDELPAMLHKLKVR	HLA-A*0201	3	TLDELPAML	25
		HLA-A*0201	6	ELPAMLHKL	24
		HLA-A*0201	2	YTLDELPAM	19
		HLA-A*0201	9	AMLHKLKVR	16
		HLA-A*0201	8	PAMLHKLKV	15
		HLA-A*0203	1	RYTLDELPA	9
		HLA A1	4	LDELPAMLH	13
		HLA A1	3	TLDELPAML	12
		HLA A1	5	DELPAMLHK	10
		HLA A1	2	YTLDELPAM	8
		HLA A1	8	PAMLHKLKV	8

(continuación)

Proteína	Sec. de péptidos	HLA	Pos.	Sec. de péptidos	Puntos
		HLA A3	5	DELPAMLHK	18
		HLA A3	3	TLDELPAML	16
		HLA A3	9	AMLHKLKVR	14
		HLA A3	6	ELPAMLHKL	12
		HLA A3	7	LPAMLHKLK	11
		HLA A3	4	LDELPAMLH	9
		HLA A3	1	RYTLDELPA	8
Vimen-tina	MALDIEIATYRKLEGE	HLA-A*0201	2	ALDIEIATY	20
		HLA-A*0201	6	EIATYRKLL	17
		HLA-A*0201	5	IEIATYRKL	16
		HLA-A*0201	8	ATYRKLEGE	15
		HLA-A*0201	1	MALDIEIAT	12
		HLA-A*0201	4	DIEIATYRK	9
		HLA A1	2	ALDIEIATY	27
		HLA A1	8	ATYRKLEGE	13
		HLA A1	4	DIEIATYRK	10
		HLA A1	7	IATYRKLE	8
		HLA A3	2	ALDIEIATY	27
		HLA A3	4	DIEIATYRK	19
		HLA A3	8	ATYRKLEGE	14
		HLA A3	3	LDIEIATYR	12
		HLA A3	6	EIATYRKLL	10
	MALDIEIAAYRKLEGE	HLA-A*0201	2	ALDIEIAAY	19
		HLA-A*0201	6	EIAAYRKLL	17
		HLA-A*0201	5	IEIAAYRKL	16
		HLA-A*0201	8	AAYRKLEGE	15
		HLA-A*0201	1	MALDIEIAA	12
		HLA-A*0201	3	LDIEIAAYR	8
		HLA-A*0201	7	IAAYRKLE	8
		HLA-A*0201	9	AYRKLEGE	8
		HLA-A*0203	1	MALDIEIAA	11
		HLA A1	2	ALDIEIAAY	27
		HLA A1	4	DIEIAAYRK	10
		HLA A1	7	IAAYRKLE	8
		HLA A3	2	ALDIEIAAY	24
		HLA A3	4	DIEIAAYRK	22
		HLA A3	3	LDIEIAAYR	14
		HLA A3	8	AAYRKLEGE	14
		HLA A3	6	EIAAYRKLL	12
		HLA A3	7	IAAYRKLE	8

5 **Tabla 6:** Péptidos de unión de HLA que representan intercambios de aminoácidos fuera de las regiones hipervariables de antígenos HLA. Se identificaron variantes alélicas de moléculas clase I mediante comparaciones con referencia HLA-A*2502:

Alelo HLA-A	Posición AA	Intercambio comparado (referencia HLA-A*2502)	AA con HLA-
A*0230 A*2408 A*2420	3	H>Q	
A*2305 A*2425	7	Y>C	

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Alelo HLA-A	Posición AA	Intercambio comparado (referencia A*2502)	AA con HLA-A*2502)
A*01011 A*02016 A*0225 A*03011 A*7404 A*01012 A*0202 A*0226 A*03012 A*7405 A*0103 A*0203 A*0227 A*03013 A*7406 A*0106 A*0204 A*0229 A*0302 A*7407 A*0107 A*0205 A*0230 A*0304 A*7408 A*0108 A*0206 A*0231 A*0305 A*8001 A*0109 A*0207 A*0233 A*0306 A*02011 A*0208 A*0234 A*0307 A*02012 A*0209 A*0235 A*0308 A*02013 A*0210 A*0236 A*0309 A*02014 A*0211 A*0237 A*2503 A*02015 A*0212 A*0238 A*3201 A*02016 A*0213 A*0239 A*3202 A*0202 A*0216 A*0240 A*3203 A*0203 A*02171 A*0242 A*3204 A*0204 A*02172 A*0245 A*3205 A*0207 A*0218 A*0246 A*3206 A*0209 A*0219 A*0247 A*3601 A*02011 A*02201 A*0248 A*3602 A*02012 A*02202 A*0249 A*3603 A*02013 A*0222 A*0250 A*7401 A*02014 A*0224 A*0252 A*7402 A*02015 A*7403	9	Y>F	
A*0102 A*2415 A*2616 A*2301 A*2417 A*3001 A*2302 A*2418 A*3002 A*2303 A*2419 A*3003 A*2305 A*2420 A*3004 A*2306 A*2421 A*3006 A*2402101 A*2422 A*3007 A*2402102 A*2423 A*3009 A*24022 A*2424 A*3010 A*24031 A*2425 A*3011 A*24032 A*2426 A*3207 A*2404 A*2427 A*2405 A*2428 A*2406 A*2429 A*2407 A*2430 A*2408 A*2431 A*2410 A*2432 A*2413 A*2433 A*2414 A*2434	9	Y>S	
A*2416 A*3103 A*2901101 A*3104 A*2902 A*3105 A*2903 A*3106 A*2904 A*3301 A*2905 A*3303 A*2906 A*3304 A*31012 A*3305 A*3102 A*3306	9	Y>T	
A*0250 A*6802 A*6815	12	V>M	

ES 2 370 688 T3

(continuación)

Alelo HLA-A	Posición AA	Intercambio comparado (referencia A*2502)	AA con HLA-
A*0102 A*3007 A*3001 A*3008 A*3002 A*3009 A*3003 A*3010 A*3004 A*3011 A*3006	17	R>S	
A*1102	19	E>K	
A*0242	24	A>S	
A*0221	30	D>N	
A*3006	31	T>A	
A*8001	31	T>S	
A*0109	33	F>L	
A*8001	35	R>Q	
A*2615	36	F>L	
A*0231	41	A>G	
A*0202	43	Q>R	
A*0205			
A*0208			
A*0214			
A*0247			
A*01011 A*0108 A*01012 A*0109 A*0102 A*3601 A*0103 A*3602 A*0106 A*3603 A*0107	44	P>K	
A*3306	52	I>M	
A*3305	54	I>M	
A*0107 A*3010 A*3001 A*31012 A*3002 A*3102 A*3004 A*3103 A*3006 A*3104 A*3007 A*3105 A*3008 A*3106 A*3009 A*3404	56	G>R	
A*0228	56	G>S	
A*8008	56	G>E	
http://www.eurekah.com/reports/vaccines/kast/01/			

REIVINDICACIONES

1. Método ex vivo para la determinación de la progresión, regresión o comienzo de una condición patológica específica o enfermedad en un individuo, el tratamiento del individuo comprende el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de un donante a dicho individuo, el método comprende

(i) proporcionar una muestra del individuo enfermo antes y/o después del trasplante alogénico, y

5 (ii) controlar la muestra en cuanto a

(a) una proteína, un péptido o polipéptido que representa una falta de coincidencia de un solo aminoácido, o

(b) un anticuerpo que se une de manera selectiva a dicha proteína, péptido o polipéptido, o

10 (c) linfocitos T citotóxicos que reconocen específicamente dicha proteína, péptido o polipéptido unido al complejo de molécula HLA, y

(iii) determinar de este modo la progresión, regresión o comienzo de una condición patológica específica o enfermedad en el individuo,

en donde dicha no coincidencia de un aminoácido se obtiene mediante los siguientes pasos:

15 (ai) proporcionar una muestra del tejido u órgano seleccionado del individuo que padece dicha enfermedad o condición patológica y una muestra derivada del donante que no padece dicha enfermedad o condición patológica

20 (aii) analizar cada muestra para detectar al menos un aminoácido no coincidente de variantes alélicas de dicha proteína, que se une a la proteína HLA y es codificado por un solo SNP, o producto de expresión del mismo, o un fragmento de este producto de expresión, y (aiii) seleccionar una única no coincidencia de un aminoácido que ocurre sólo en el individuo enfermo.

2. Método ex-vivo conforme a la reivindicación 1, en donde el péptido o polipéptido que representa dicha no coincidencia de un solo aminoácido se une sólo o preferentemente a la célula que presenta el antígeno o proteína HLA del individuo enfermo.

25 3. Método ex-vivo conforme a la reivindicación 2, en donde el péptido o polipéptido que representa dicha no coincidencia de un solo aminoácido es reconocido por linfocitos T citotóxicos (CTL).

4. Método ex-vivo conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enfermedad o condición patológica es cáncer.

5. Método ex-vivo conforme a la reivindicación 4, en donde el cáncer es leucemia.

30 6. Método ex-vivo conforme a la reivindicación 5, en donde la proteína específica analizada en cuanto a y relacionada con dicha enfermedad específica se selecciona del grupo que consiste en los marcadores de tejido que se indica en la Tabla 2.