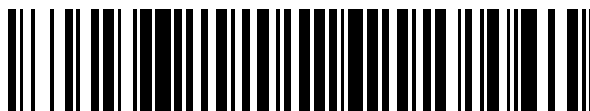


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 486**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008** **E 08750553 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013** **EP 2156183**

54 Título: **Análisis de pronóstico para determinar la respuesta de células T a antígenos HLA y uso del mismo en el campo del trasplante de tejidos**

30 Prioridad:

09.05.2007 WO PCT/GB2007/001690

15.08.2007 GB 0715949

14.11.2007 GB 0722378

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

15.10.2013

73 Titular/es:

CIRCASSIA LIMITED (50.0%)

**MAGDALEN CENTRE THE OXFORD SCIENCE
PARK**

OXFORD OX4 4GA, GB y

THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (50.0%)

72 Inventor/es:

BALL, SIMON

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 425 486 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

Análisis de pronóstico para determinar la respuesta de células T a antígenos HLA y uso del mismo en el campo del trasplante de tejidos

Campo de la invención

La invención se refiere a un método de pronóstico.

Antecedentes de la invención

Las diferencias genéticas entre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad constituyen la barrera predominante contra el trasplante de órganos sólidos y de médula ósea. En los seres humanos estas moléculas se conocen como antígenos leucocitarios humanos (HLA). Hay dos tipos principales de HLA denominados clase I y clase II.

El análisis de la respuesta inmunitaria de un individuo a los HLA puede permitir opciones que deben tomarse con respecto a la idoneidad de un potencial donante de trasplante y con respecto a la estrategia de tratamiento que se usa para prevenir la posterior pérdida del trasplante. El fracaso de un trasplante es determinado por varios factores, por ejemplo la tasa de fracaso de los primeros trasplantes renales de donantes fallecidos es de aproximadamente 3% anual después del primer año, pero es considerablemente mayor en los re-trasplantes. La única estrategia disponible en la actualidad para identificar las respuestas inmunitarias en contra de un trasplante allogénico implica la detección de anticuerpos contra HLA (y, a veces otras moléculas tales como MICA). La detección preoperatoria de donantes con anticuerpos anti-HLA específicos (DSA) contraindica el trasplante. La presencia de anticuerpos anti-HLA durante el curso de post-trasplante se asocia con la disminución de la supervivencia del injerto y la identificación histológica de rechazo mediado por anticuerpos ya sea aguda o crónica. La detección de anticuerpos anti-HLA es específica ya que su presencia está estrechamente asociada con un aumento de la frecuencia de fracaso del injerto, pero carece de sensibilidad debido a que la mayoría de los fallos de injerto no están asociados con DSA anti-HLA.

Además, una proporción de los trasplantes da como resultado daños de origen inmunitario a tejido no-injertado. Este daño se caracteriza típicamente como enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA). La EICA es una complicación importante del trasplante allogénico, particularmente del trasplante de médula ósea (TMO). Se puede clasificar en presentaciones agudas y crónicas por motivos cronológicos y clínicos. La EICA crónica (EICAc) implica generalmente una gama más amplia de órganos que la EICA aguda (EICAa) y en muchos aspectos se asemeja a una enfermedad autoinmunitaria en los no trasplantados. Se diagnostica actualmente mediante criterios clínicos e histopatológicos. Al igual que con otros trastornos de trasplantes, hay algunos indicios de una asociación con los anticuerpos, en este caso anticuerpos tales como anticuerpos anti-nucleares (ANA), anti-mitocondriales (AMA), anti-músculo liso (ASMA), anti-cardiolipina (ACLA), anti-microsomales de hígado y riñón (LKM), anti-ADN, anti-neutrófilos citoplasmáticos (ANCA), y anti-tiroides. Sin embargo, al igual que con otros trasplantes, esta asociación no es fiable en la predicción o diagnóstico de la EICA.

Por tanto, existe una necesidad de análisis alternativos para predecir los resultados del trasplante en general y de ese modo planear las estrategias de tratamiento.

Compendio de la invención

La patogénesis del rechazo del injerto (en particular, el rechazo crónico del injerto) es poco conocida. La incapacidad de los análisis basados en anticuerpos para predecir con precisión el resultado indica que pueden estar ocurriendo respuestas inmunitarias más complejas. La invención descrita en la presente memoria se refiere a hallazgos sobre la respuesta inmunitaria a los fragmentos de péptidos de HLA de clase 1. Los autores de la presente invención han encontrado que los sujetos exhiben respuestas de células T a antígenos concretos de diversos dominios de la molécula de HLA de clase 1. Estos antígenos derivan de regiones de la molécula de HLA que están relativamente conservadas entre alotipos de HLA, por ejemplo, los dominios transmembrana y alfa-3. Por lo tanto, mediante la determinación de la reactividad de células T contra tales antígenos, se proporciona un método para identificar a los individuos en riesgo de sufrir daño o rechazo de injerto de origen inmunitario, y/o daño de origen inmunitario contra tejido no injertado. Se pretende que el rechazo del injerto al que se hace referencia en la presente memoria incluya cualquier respuesta por el sistema inmunitario de un sujeto receptor a un injerto u órgano trasplantado proporcionada por un donante. En consecuencia, la presente invención proporciona un método *in vitro* para determinar si un individuo corre el riesgo de, o está sometido a, daño o rechazo del injerto de origen inmunitario y/o daño de origen inmunitario contra tejido no injertado, en donde el injerto es un aloinjerto o un xenoinjerto, comprendiendo el método:

1. (a) comprobación de que el individuo tiene células T que responden a un péptido de 9 a 30 aminoácidos que incluyen al menos un epítipo de células T de unión al MHC de clase II, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos contiguos del dominio $\alpha 3$ y/o dominio transmembrana de una molécula del MHC de clase I que es reconocido por una célula T que reconoce un epítipo de una molécula del MHC de clase I; y
2. (b) determinar de este modo si el individuo corre el riesgo de, o está sometido a, daño o rechazo del injerto de origen inmunitario y/o daño de origen inmunitario contra tejido no injertado.

Descripción de las Figuras

- La Figura 1 muestra una representación de la estructura 3D de la porción extracelular de la MHC de clase I humano, HLA-A2, que muestra los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y transmembrana, y una $\beta 2$ microglobulina unida a la misma.
- La Figura 2 muestra una representación esquemática de la porción extracelular de HLA-A2, que muestra las secuencias de aminoácidos y de ADN de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y transmembrana.
- La Figura 3 muestra una tabla que enumera 53 péptidos (p1 a p53) que cubren las regiones de HLA-A2, su peso molecular, y su secuencia real. Los 53 péptidos se utilizaron en los Ejemplos 1 y 2.
- La Figura 4 muestra los datos resultantes de los estudios de afinidad de unión en el Ejemplo 1 de los 53 péptidos que se muestran en la Figura 2 a una serie de moléculas del MHC II purificadas DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DR51, DR52-DRB5-DRB4, y DR53-DRB3
- La Figura 5 muestra una representación esquemática de la porción extracelular del MHC de clase humana de clase I, HLA-A2, y el péptido p39 (residuos 192 a 206 de HLA-A2).
- La Figura 6 muestra una representación esquemática de la porción extracelular del MHC de clase humana de clase I, HLA-A2, y los péptidos p50 (residuos 268 a 282 de HLA-A2) y p51 (residuos 270 a 284 de HLA-A2).
- La Figura 7 muestra una representación esquemática de la porción extracelular del MHC de clase humana de clase I, HLA-A2, y los péptidos p52 (residuos 280 a 294 de HLA-A2) y p53 (residuos 282 a 296 de HLA-A2).
- La Figura 8 muestra un gráfico de barras que muestra los datos del recuento ELISPOT de células reactivas/500.000 PBMC en un solo paciente para los péptidos estudiados en el Ejemplo 1.
- La Figura 9 muestra los datos resultantes de los estudios de afinidad de unión en el Ejemplo 1 de los 53 péptidos que se muestran en la Figura 2 a una serie de moléculas del MHC II purificadas DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DR51, DR52-DRB5-DRB4, y DR53-DRB3. Las IC50 expresadas en nM se evaluaron a partir de al menos tres experimentos independientes para cada uno de los 53 péptidos diferentes. Los péptidos de referencia biotinilados fueron buenos aglutinantes para las moléculas HLA-DR y exhibieron las siguientes CI50: 306-318 HA (PKYVKQNTLKLAT) para HLA-DRB1*0101 (1 nM, pH 6), HLADRB1*0401 (22 nM, pH 6), HLA-DRB1*1101 (19 nM, pH 5) y HLA-DRB5*0101 (8 nM, pH 5,5); YKL (AAYAAKAAALAA) para HLADRB1*0701 (6 nM, pH 5); MT 2-16 (AKTIAYDEEARRGLE) para DRB1*0301 (303 nM, pH 4,5); B1 21-36 (TERVRLVTRHIYNREE) para HLA-DRB1*1301 (131 nM, pH 4,5); A3 152-166 (EAEQLRAYLDGTGVE) para HLA-DRB1*1501 (59 nM, pH 4,5); LOL 191-210 (ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT) para HLA-DRB3*0101 (20 nM, pH 5,5) y E2/E168 (AGDLLAIETDKATI) para HLA-DRB4*0101 (27 nM, pH 5). * Significa pares adyacentes de péptidos utilizados combinados en análisis funcionales posteriores.
- La Figura 10 muestra el historial de edad, sexo, tipo de tejido, trasplante, transfusión y sensibilización de los sujetos de estudio en el Ejemplo 2. Los diferentes grupos de pacientes se definen sobre la base de la presencia de HLA-A2 en el sujeto y su producción de anticuerpos contra HLA-A2 u otro HLA. Grupo 1: HLA-A2 negativo con anticuerpos contra un HLA-A2; Grupo 2: HLA-A2 negativo con anticuerpos contra ninguno de HLA-A2; Grupo 3: HLA-A2 negativo sin historial de formación de anticuerpo anti-HLA; Grupo 4: positivo contra HLA-A2 con anticuerpos contra ninguno de HLA-A2; Grupo 5: positivo contra HLA-A2, sin historial de formación de anticuerpo anti-HLA.
- La Figura 11 muestra un gráfico de barras que muestra los datos del recuento ELISPOT de células reactivas/500.000 PBMC en un solo paciente para los péptidos estudiados en el Ejemplo 2. Se muestra el número medio de células que responden por pocillo (5×10^5 PBMC) para un sujeto cultivadas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (1, 10 y $50 \mu\text{gml}^{-1}$) de anticuerpo contra el MHC de clase II (Tu39, Becton Dickinson, Oxford, Reino Unido). Se añadió anticuerpo contra HLA-DR (L243 Becton Dickinson) a $50 \mu\text{gml}^{-1}$ a la más alta concentración de anticuerpos anti-MHC de clase II. Las PBMC se cultivaron en presencia de péptido (p39, P50/51 o p52/53) a $20 \mu\text{gml}^{-1}$, PPD a $10 \mu\text{gml}^{-1}$, el control positivo anti-CD3 suministrado con la placa ELISPOT con interferón γ (Mabtech) o medio solo.
- La Figura 12 muestra la proliferación de las células T en respuesta a algunos de los péptidos en la Figura 2. Las frecuencias medias de ELISPOT con interferón γ por 5×10^5 PBMC (eje y) para cada péptido o par de péptidos (eje x) se muestran para los individuos que elaboran una respuesta significativamente mayor que el fondo. Se estudiaron 21 péptidos o pares de péptidos diferentes a una concentración de $20 \mu\text{gml}^{-1}$ (mostrados) o $4 \mu\text{gml}^{-1}$. Los controles positivos fueron ppd a $10 \mu\text{gml}^{-1}$ o toxoide tetánico a $1 \mu\text{gml}^{-1}$ o en algunos experimentos posteriores anti-CD3 suministrado con la placa de ELISPOT con interferón γ (Mabtech). Los tipos de HLA-DR de los individuos que responden se muestran entre paréntesis.
- La Figura 13 muestra una representación esquemática del péptido p39 (residuos 192 a 206 de HLA-A2). También muestra la diferencia o las diferencias entre p39 y la secuencia correspondiente en varios otros alelos HLA-A y HLA-B.

La Figura 14 muestra una representación esquemática del péptido p40 (residuos 202 a 216 de HLA-A2). También muestra la diferencia o las diferencias entre p39 y la secuencia correspondiente en varios otros alelos HLA-A y HLA-B.

La Figura 15 muestra una representación esquemática de los péptidos p50 (residuos 268 a 282 de HLA-A2) y p51 (residuos 270 a 284 de HLA-A2). También muestra la diferencia o las diferencias entre p39 y la secuencia correspondiente en varios otros alelos HLA-A y HLA-B.

La Figura 16 muestra una representación esquemática de los péptidos p52 (residuos 280 a 294 de HLA-A2) y p53 (residuos 282 a 296 de HLA-A2). También muestra la diferencia o las diferencias entre p39 y la secuencia correspondiente en varios otros alelos HLA-A y HLA-B.

Las Figuras 17 y 18 muestran cada una gráfica de barras que muestra los datos de recuento de ELISPOT de células reactivas en un solo individuo con Enfermedad de Injerto contra Anfitrión Crónica (EICAc) para los péptidos estudiados en el Ejemplo 4.

Las Figuras 19 a 21 muestran cada una gráfica de barras que muestra los datos de recuento Elispot de células reactivas en un solo individuo con Nefropatía Crónica del Injerto (CAN) para los péptidos estudiados en el Ejemplo 4.

Figuras 22A, B y C, respectivamente, muestran los datos del recuento Elispot de células reactivas en individuos normales (serie de control P), receptores de trasplante de médula ósea con EICAc (serie de pacientes C) y los receptores de trasplante de médula ósea sin EICAc (serie de pacientes B), para los péptidos estudiados en el Ejemplo 4.

Figuras 23A y B muestran un gráfico de barras para cada paciente individual en la serie C y la serie B, respectivamente, mostrando cada gráfico de barras los datos del recuento ELISPOT de células reactivas para los péptidos estudiados en el Ejemplo 4.

Figuras 24A y B, C y D, respectivamente, muestran los datos del recuento Elispot de células reactivas en el grupo de control no trasplantado, y los grupos de pacientes Verde, Ambar y Rojo derivados de 100 receptores de trasplante renal, para los péptidos estudiados en el Ejemplo 5.

Descripción de las Secuencias

El SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa del antígeno de la clase I del MHC humano, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101).

El SEQ ID NO: 2 muestra la versión madura de la secuencia de aminoácidos del antígeno de la clase I del MHC humano, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101). En otras palabras, la SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de HLA-A2 sin su secuencia señal. El SEQ ID NO: 2 corresponde a los residuos 25 a 365 del SEQ ID NO: 1.

El SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno de la clase I del MHC humano completo, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101) mostrado en el SEQ ID NO: 1.

El SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de P1 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de P2 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de P3 en la figura 3.

El SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de P4 en la figura 3.

El SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de P5 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de P6 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de p7 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de p8 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de p9 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de p10 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de p11 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de p12 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de p13 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de aminoácidos de p14 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos de la p 15 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de aminoácidos de p16 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de aminoácidos de p17 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de aminoácidos de p18 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de aminoácidos de p19 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de aminoácidos de p20 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia de aminoácidos de p21 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de aminoácidos de p22 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de aminoácidos de p23 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 27 muestra la secuencia de aminoácidos de p24 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de aminoácidos de p25 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de aminoácidos de p26 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 30 muestra la secuencia de aminoácidos de p27 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 31 muestra la secuencia de aminoácidos de p28 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 32 muestra la secuencia de aminoácidos de p29 en la Figura 3.

El SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia de aminoácidos de p30 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 34 muestra la secuencia de aminoácidos de p31 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 35 muestra la secuencia de aminoácidos de p32 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 36 muestra la secuencia de aminoácidos de p33 en la Figura 3.
 5 El SEQ ID NO: 37 muestra la secuencia de aminoácidos de p34 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 38 muestra la secuencia de aminoácidos de p35 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 39 muestra la secuencia de aminoácidos de p36 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 40 muestra la secuencia de aminoácidos de p37 en la Figura 3.
 10 El SEQ ID NO: 41 muestra la secuencia de aminoácidos de p38 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de aminoácidos de p39 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 43 muestra la secuencia de aminoácidos de p40 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 44 muestra la secuencia de aminoácidos de p41 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 45 muestra la secuencia de aminoácidos de p42 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 46 muestra la secuencia de aminoácidos de p43, en la Figura 3.
 15 El SEQ ID NO: 47 muestra la secuencia de aminoácidos de p44 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 48 muestra la secuencia de aminoácidos de p45 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 49 muestra la secuencia de aminoácidos de p46 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 50 muestra la secuencia de aminoácidos de p47 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 51 muestra la secuencia de aminoácidos de p48 en la Figura 3.
 20 El SEQ ID NO: 52 muestra la secuencia de aminoácidos de p49 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 53 muestra la secuencia de aminoácidos de p50 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 54 muestra la secuencia de aminoácidos de p51 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 55 muestra la secuencia de aminoácidos de p52 en la Figura 3.
 El SEQ ID NO: 56 muestra la secuencia de aminoácidos de p53 en la Figura 3.
 25 El SEQ ID NO: 57 muestra la secuencia de aminoácidos de p50/51 (solapamiento de los aminoácidos 268-282 y 270-284 El SEQ ID NO: 2).
 El SEQ ID NO: 58 muestra la secuencia de aminoácidos de p52/53 (solapamiento de los aminoácidos 280-294 y 282-296 del SEQ ID NO: 2).
 El SEQ ID NO: 59 muestra la secuencia de aminoácidos de p45/46 (solapamiento de los aminoácidos 239-253 y
 30 241-256 del SEQ ID NO: 1).
 El SEQ ID NO: 60 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p39.
 El SEQ ID NO: 61 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p39.
 El SEQ ID NO: 62 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p39.
 El SEQ ID NO: 63 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo de p40.
 35 El SEQ ID NO: 64 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p50/51.
 El SEQ ID NO: 65 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p52/53.
 El SEQ ID NO: 66 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p50/51.
 El SEQ ID NO: 67 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p50/51.
 El SEQ ID NO: 68 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 4 de p50/51.
 40 El SEQ ID NO: 69 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p52/53.
 El SEQ ID NO: 70 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p52/53.
 El SEQ ID NO: 71 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 4 de p52/53.
 El SEQ ID NO: 72 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 5 de p52/53.
 El SEQ ID NO: 73 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p45/46.
 45 El SEQ ID NO: 74 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p45/46.
 El SEQ ID NO: 75 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p1.
 El SEQ ID NO: 76 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p2.
 El SEQ ID NO: 77 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p30.
 El SEQ ID NO: 78 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p39.
 50 El SEQ ID NO: 79 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p40.
 El SEQ ID NO: 80 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p50.
 El SEQ ID NO: 81 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p51.
 El SEQ ID NO: 82 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p52.
 El SEQ ID NO: 83 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la p53.
 55 El SEQ ID NO: 84 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p45.
 El SEQ ID NO: 85 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p46.
 El SEQ ID NO: 86 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p50/51.
 El SEQ ID NO: 87 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p52/53.
 El SEQ ID NO: 88 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p45/46.
 60 El SEQ ID NO: 89 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p20.
 El SEQ ID NO: 90 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica p21.
 El SEQ ID NO: 91 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo 1 de p39.
 El SEQ ID NO: 92 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo 1 de p50/51.
 El SEQ ID NO: 93 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo 1 de p52/53.

- El SEQ ID NO: 94 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo de p40.
 El SEQ ID NO: 95 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo 1 de p45/46.
 El SEQ ID NO: 96 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el análogo 2 de p45/46.
 El SEQ ID NO: 97 muestra la secuencia de aminoácidos de p39 (Ser)
 5 El SEQ ID NO: 98 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p39 (Ser).
 El SEQ ID NO: 99 muestra la secuencia de aminoácidos de p39 (b).
 El SEQ ID NO: 100 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p39 (b).
 El SEQ ID NO: 101 muestra la secuencia de aminoácidos de p40 (Ser).
 El SEQ ID NO: 102 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p40 (Ser).
 10 El SEQ ID NO: 103 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p50.
 El SEQ ID NO: 104 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p50.
 El SEQ ID NO: 105 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p51.
 El SEQ ID NO: 106 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p51.
 El SEQ ID NO: 107 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p52.
 15 El SEQ ID NO: 108 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p52.
 El SEQ ID NO: 109 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p52.
 El SEQ ID NO: 110 muestra la secuencia de aminoácidos de p52 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 El SEQ ID NO: 111 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p52 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 20 El SEQ ID NO: 112 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p52 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 El SEQ ID NO: 113 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p52 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 25 El SEQ ID NO: 114 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p53.
 El SEQ ID NO: 115 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p53.
 El SEQ ID NO: 116 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p53.
 El SEQ ID NO: 117 muestra la secuencia de aminoácidos de p53 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 30 El SEQ ID NO: 118 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p53 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 El SEQ ID NO: 119 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 de p53 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 El SEQ ID N °. 120 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 3 de p53 con KR unido en el extremo N-terminal y RK unido al extremo C-terminal.
 35 El SEQ ID NO: 121 muestra la secuencia de aminoácidos de p20/21 (solapamiento de aminoácidos 105-119 y 107-121 del SEQ ID NO: 2).
 El SEQ ID NO: 122 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia HA 306-318.
 El SEQ ID NO: 123 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia YKL.
 40 El SEQ ID NO: 124 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia MT 2-16.
 El SEQ ID NO: 125 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia B1 21-36.
 El SEQ ID NO: 126 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia A3 152-166.
 El SEQ ID NO: 127 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia LOL 191-210.
 El SEQ ID NO: 128 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia E2/E168.
 45 El SEQ ID NO: 129 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 del péptido p45 de referencia.
 El SEQ ID NO: 130 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 del péptido p45 de referencia.
 El SEQ ID NO: 131 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 del péptido p46 de referencia.
 El SEQ ID NO: 132 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 2 del péptido p46 de referencia.

50 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para detectar si un individuo está sufriendo o corre el riesgo de daño o rechazo de injerto, en particular, daño crónico del injerto o rechazo, o daño de origen inmunitario a tejido no injertado.

- 55 El individuo es típicamente un mamífero, preferiblemente un ser humano. El individuo es típicamente un paciente que sufre un trastorno caracterizado por la insuficiencia orgánica que requiere un trasplante, por ejemplo, Enfermedad Orgánica en Fase Terminal. Mediante el término "órgano", se pretende incluir cualquier estructura o grupo de células corporal que contienen los diferentes tejidos que se organizan para llevar a cabo una función específica del organismo, por ejemplo, el corazón, los pulmones, el cerebro, la piel de riñón, el hígado, la médula ósea, etc. En una realización, el injerto es un aloinjerto, es decir, el individuo y el donante son de la misma especie.
 60 En una realización adicional el injerto es un xenoinjerto, es decir, el individuo y de los donantes son de diferentes especies.

El individuo puede típicamente haber sufrido recientemente o estar sufriendo una infección, o puede presentar niveles perjudiciales de fármacos nefrotóxicos en su sistema.

El individuo puede presentar uno o más factores de riesgo que son predictivo de rechazo del injerto. Los principales factores que aumentan el riesgo de disfunción del injerto son: episodios previos de rechazo agudo; trasplantes previos (fallidos); presencia de anticuerpos anti-HLA (donante específico o no - aunque con respuestas específicas de los donantes el riesgo es mayor); incumplimiento de inmunosupresión, escaso grado de compatibilidad de HLA entre donante y receptor; El trasplante se llevó a cabo antes del año 2002, 2000 o 1995; El donante era de una edad o condición no ideal de acuerdo a la práctica clínica habitual; El receptor es un fumador y/o tiene hipertensión y/o hiperlipidemia; Función retardada del injerto; Donante muerto; Toxicidad de los medicamentos.

El individuo puede carecer de alguno o todos los factores antes mencionados y/o puede carecer de cualquier otro indicador de que es probable que rechace del injerto. Por ejemplo, el individuo no puede tener una respuesta de anticuerpos detectable a una molécula dada del MHC de clase I, y/o carecer de síntomas o marcadores de enfermedad cualesquiera asociados con una respuesta inmunitaria. Alternativamente, el individuo puede tener una respuesta de anticuerpos detectable a HLA, en particular una respuesta específica de donante, pero carecer de cualquier otro indicador de disfunción de órganos.

El método es particularmente aplicable a pacientes que están a punto de recibir o se pronostica que requieren un trasplante de órgano para predecir la probabilidad de daño o rechazo del injerto de origen inmunitario, y/o daño de origen inmunitario a tejido no injertado. Por ejemplo, puede esperarse que el paciente reciba un trasplante en los próximos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o doce meses. Alternativamente, el análisis es particularmente aplicable a individuos que han recibido un trasplante para pronosticar la probabilidad de daño o rechazo del injerto de origen inmunitario, y/o daño de origen inmunitario a tejido no injertado. Post-trasplante, el análisis es particularmente aplicable a pacientes que muestran signos de disfunción orgánica crónica (del órgano injertado) o posible enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA), en particular EICA crónica y en particular en los casos en los que el injerto es un trasplante de médula ósea.

En caso de disfunción crónica del injerto, el método puede ser utilizado para estratificar a los pacientes en aquellos en los que la causa es de origen inmunitario (que es el rechazo crónico) o es debida a otros factores. Esto tiene un interés particular en el trasplante renal puesto que la insuficiencia o la disfunción orgánicas pueden ser una consecuencia de la toxicidad de agentes inmunosupresores, tales como los inhibidores de la calcineurina o ser debidas a infección, por ejemplo, infección por el virus del polio. Alternativamente, pueden ser debidas al rechazo crónico en cuyo caso el tratamiento adecuado es típicamente aumentar la inmunosupresión (y por lo menos no reducirla). Las técnicas existentes como la biopsia de trasplante renal discriminan mal entre muchas de estas causas de disfunción del injerto y, aunque la presencia de anticuerpos anti-HLA (particularmente cuando son específicos del donante) es específica para el rechazo es insensible (en particular para el rechazo crónico). El análisis basado en células T de la invención permitirá la adaptación de la inmunosupresión a las necesidades individuales específicas.

En el caso de la EICA, el análisis se puede usar para detectar si un individuo está sufriendo o corre el riesgo de daños de origen inmunitario a tejido no injertado. Esto es particularmente aplicable a pacientes que han sido sometidos a trasplante hace más de alrededor de 100 días, sin embargo, también es aplicable a los pacientes que se han sometido a trasplante hace más de aproximadamente 50, 60, 70, 80, o 90 días, o pacientes que se espera que reciban un trasplante en el futuro, por ejemplo, en los siguientes, dos, tres, cuatro, cinco, seis o doce meses. En esta realización de la invención, el trasplante es típicamente un trasplante de médula ósea. El tejido no injertado es típicamente al menos uno seleccionado del hígado, la piel, las mucosas, el tracto gastrointestinal, los pulmones, el ojo, el timo, el tejido conectivo, y la glándula exocrina.

El análisis de la invención puede formar parte de un régimen de tratamiento en el que, en función de los resultados del análisis, se altera la estrategia de tratamiento. Por ejemplo, cuando el análisis indica que la causa de la disfunción/fallo orgánico o el daño a los tejidos no injertados puede ser de origen inmunitario, la estrategia de tratamiento puede ser alterada mediante la inclusión de la administración o la alteración de la administración de agentes inmunosupresores y/o hacer tolerante a la persona a la molécula o las moléculas del MHC de clase I. Cuando el análisis indica la ausencia de una respuesta inmunitaria, la terapia inmunosupresora puede ser reducida o detenida.

El método de la invención tiene que ver con la determinación de si un individuo tiene una respuesta de células T a antígenos concretos de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Esto puede ser determinado mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, cualquier método que se pueda utilizar para detectar la presencia de células T con experiencia antigénica. En una realización esto se determina midiendo el nivel de células T específicas para el antígeno o los antígenos. Se puede determinar mediante la determinación de si las células T del individuo reconocen el antígeno o los antígenos. Una respuesta positiva de las células T del paciente a los antígenos indica que el paciente tiene más probabilidad de rechazar un trasplante. Una respuesta negativa indica que el paciente tiene menos probabilidad de rechazar un trasplante.

Las células T que reconocen el antígeno en el método son generalmente células T que han sido pre-sensibilizadas *in vivo* frente a un antígeno de una molécula del MHC de clase I. Estas células T con experiencia antigénica están generalmente presentes en la sangre periférica de un individuo, es decir, dentro de la población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en el individuo. Las células T pueden ser células CD4 y/o CD8 T.

En el método las células T se pueden poner en contacto con el antígeno *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro* en una muestra del individuo.

Generalmente las células T que se ponen en contacto en el método se toman del individuo en una muestra de sangre, aunque se pueden utilizar otros tipos de muestras que contienen células T. La muestra puede añadirse directamente al análisis o puede procesarse primero. Normalmente, el procesamiento puede comprender técnicas convencionales tales como centrifugación en gradiente para separar las células T, con resuspensión en cualquier volumen adecuado. Alternativamente, el procesamiento puede comprender la dilución de la muestra, por ejemplo con agua, tampón o medios. La muestra se puede diluir de 1,5 a 100 veces, por ejemplo de 2 a 50 o de 5 a 10 veces.

El procesamiento puede comprender la separación de componentes de la muestra. Típicamente, las células mononucleares (MC) se separan de las muestras. Las MC comprenderán las células T y las células presentadoras de antígeno (APC). Así, en el método las APC presentes en las MC separadas pueden presentar el péptido a las células T. En otra realización sólo las células T, tales como sólo las células T CD4, pueden purificarse a partir de la muestra. Las PBMC, las MC y células T pueden separarse de la muestra utilizando mecanismos conocidos en la técnica.

Preferiblemente, las células T utilizadas en el análisis están en la forma de muestras sin procesar o diluidas, son células T recién aisladas (por ejemplo en forma de MC o PBMC recién aisladas) que se usan directamente *ex vivo*, es decir, no se cultivan antes de ser utilizadas en el método o son células descongeladas (que fueron congeladas previamente). Sin embargo las células T se pueden cultivar antes de su uso, por ejemplo, en presencia del antígeno, y generalmente también de citoquinas exógenas promotoras de crecimiento. Durante el cultivo el antígeno está presente típicamente en la superficie de las APC, tales como la APC utilizada en el método. El pre-cultivo de las células T puede conducir a un aumento de la sensibilidad del método. Por lo tanto las células T pueden convertirse en líneas celulares, tales como líneas celulares a corto plazo utilizando mecanismos conocidos en la técnica.

La APC que típicamente está presente en el método puede provenir de un mismo individuo que la célula T o de un individuo diferente. La APC puede ser una APC de origen natural o una APC artificial. La APC es una célula que es capaz de presentar el antígeno a una célula T. Es típicamente una célula B, una célula dendrítica o un macrófago. Por lo general se separa de la misma muestra que la célula T y típicamente se co-purifica con la célula T. De este modo, la APC puede estar presente en las MC o las PBMC. La APC es típicamente una célula recién aislada *ex vivo* o una célula cultivada. Puede estar en forma de una línea celular, tal como una línea celular a corto plazo o inmortalizada. La APC puede expresar moléculas vacías del MHC de clase II en su superficie.

En una realización, el antígeno se añade directamente a un análisis que comprende células T y APC. Como se comentó anteriormente, las células T y las APC en un análisis podrían estar en forma de MC. Cuando un antígeno puede ser reconocido por la célula T sin necesidad de presentación por las APC, no se requieren las APC. Los análogos que imitan el antígeno original unido a una molécula del MHC son un ejemplo de uno de tales antígenos.

En una realización se proporciona el antígeno a la APC en ausencia de la célula T. La APC se proporciona a continuación a la célula T, típicamente después de que se les permita presentar el antígeno en su superficie. El antígeno puede haber sido tomado del interior de la APC y presentado, o simplemente tomarse de la superficie sin entrar dentro de la APC.

Típicamente se añaden de 10^5 a 10^7 , preferiblemente de $2,5 \times 10^5$ a 10^6 PBMC a cada ensayo. En el caso en el que se añade péptido directamente al ensayo su concentración es de 10^{-1} a 10^3 µg/ml, preferiblemente de 0,5 a 50 µg/ml o 1 a 10 µg/ml.

Típicamente, el tiempo durante el cual las células T se incuban con el antígeno es de 4 a 24 horas (preferiblemente de 5 a 18 horas) para las células T efectoras o de más de 24 horas para las células de memoria centrales. Cuando se utilizan PBMC *ex vivo* se ha encontrado que se pueden incubar $5,0 \times 10^6$ PBMC en 10 µg/ml de péptido durante 5 horas a 37°C.

El antígeno puede estar en cualquier forma adecuada. El antígeno comprende generalmente uno o más epítopos de células T procedentes de una molécula del MHC de clase I, o una variante del mismo. La molécula del MHC de clase I puede ser, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A29, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A30, HLA-A36, HLA-A80, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, o HLA-A23. El antígeno puede ser típicamente un fragmento (tal como un péptido, o

una variante o análogo del mismo) procedente de una molécula del MHC de clase I. Los péptidos, variantes y análogos adecuados para su uso en el método de la invención se discutirán adicionalmente más adelante. El antígeno también puede estar en forma de un análogo que imita al epítipo de la proteína de origen natural unida a una molécula del MHC.

En una realización se investigan respuestas de células T a 2 o más antígenos diferentes, o 2 o más fragmentos diferentes del mismo antígeno, por ejemplo, utilizando combinaciones de antígenos o péptidos.

En una realización, se detectan las respuestas de células T mediante la determinación de si las células T están secretando o no una o más citoquinas. La citoquina es típicamente IFN- γ o IL-2, pero puede ser cualquier citoquina adecuada. Otras citoquinas incluyen, por ejemplo, IL-12, IL-4, IL-5 e IL-10. Las citoquinas se pueden detectar típicamente permitiendo que se unan a un agente de captura específico que puede ser inmovilizado sobre un soporte tal como una placa, cuenta o la propia célula secretora de citoquina, y midiendo a continuación la presencia del complejo de agente de unión específico/citoquina típicamente con un segundo agente de detección de la unión. Se puede incorporar una etapa de lavado para eliminar el material que no se une específicamente al agente de captura.

Típicamente, el segundo agente se une a la citoquina en un sitio que es diferente del sitio que se une el primer agente. El segundo agente se puede conjugar directamente con una enzima tal como fosfatasa alcalina, o una marca fluorescente o puede comprender un radical de biotina para ser detectado por un tercer agente que comprende estreptavidina, que está directamente conjugado con un marca enzimática o fluorescente. La enzima conjugada cambia después el color de un reactivo. El agente es preferiblemente un anticuerpo, mono-o policlonal. Los anticuerpos contra citoquinas están disponibles en el mercado, o se pueden preparar utilizando técnicas convencionales.

El método preferido empleado para detectar citoquinas se basará en inmunoanálisis de tipo sándwich que detectan la frecuencia de células secretoras de citoquinas tales como el ELISPOT colorimétrico o fluorescente, análisis de dilución limitante, tinción intracelular de citoquinas y análisis de secreción de citoquinas con o sin enriquecimiento de células secretoras de citoquinas como el promovido inicialmente por Miltenyi Biotec. Alternativamente, la cantidad de citoquina secretada se puede medir, por ejemplo, por un sistema basado en ELISA tal como el sistema con sangre completa Quantiferon[®] con el anticuerpo de captura inmovilizado en una placa, y sus modificaciones (por ejemplo como el asequible de Cellestis) o la tecnología de matriz de suspensión Luminex[®] utilizando kits Beadlyte[®] con el anticuerpo de captura inmovilizado en una cuenta. La expresión del ARNm de citoquinas también se puede medir con análisis tales como RT-PCR.

En una realización, el sistema de detección que se utiliza es el análisis ELISpot ex-vivo descrito en el documento WO 98/23960. En ese análisis el IFN- γ secretado a partir de la célula T se une a un primer anticuerpo específico de IFN- γ que está inmovilizado sobre un soporte sólido. A continuación se detecta el IFN- γ unido utilizando un segundo anticuerpo específico de IFN- γ que está marcado con un marcador detectable. Tal anticuerpo marcado se puede obtener de MABTECH (Estocolmo, Suecia). Otros marcadores detectables que pueden utilizarse se discuten a continuación.

Kits

La invención también proporciona un kit para llevar a cabo los métodos de la invención que comprende un medio para determinar si un individuo tiene una respuesta de células T a un polipéptido de HLA derivado de un MHC de clase I, o una variante del mismo. Típicamente, el medio para detectar el reconocimiento permite o ayuda a la detección basada en las técnicas discutidas anteriormente. Por lo tanto, el medio pueden permitir la detección de citoquinas (tales como IFN- γ y/o IL-2) secretadas por las células T después del reconocimiento. El kit puede incluir de este modo adicionalmente un agente de unión específico para la citoquina, tal como un anticuerpo. El agente típicamente se inmoviliza sobre un soporte sólido. Esto significa que después de la unión del agente la citoquina se mantendrá en las proximidades de la célula T que la secreta. Por lo tanto se forman 'manchas' de complejo de citoquina/agente sobre el soporte, representando cada mancha una célula T que está secretando la citoquina. La cuantificación de las manchas, y típicamente la comparación con un control, permite la determinación del número relativo de células que secretan la citoquina.

El kit también puede comprender un medio para detectar los complejos de citoquina/agente. Se puede producir un cambio detectable en el propio agente después de la unión de la citoquina, tal como un cambio de color. Alternativamente, se puede permitir que se una un segundo agente marcado directamente o indirectamente para la detección al complejo de citoquina/agente para permitir la determinación de las manchas. Como se discutió anteriormente el segundo agente puede ser específico para la citoquina, pero se une a un sitio diferente en la citoquina que el primer agente.

El soporte inmovilizado puede ser una placa con pocillos, tal como una placa de microtitulación. Por tanto, cada análisis puede llevarse a cabo en un pocillo separado en la placa.

- 5 El kit puede comprender adicionalmente medio para las células T, agentes de detección o tampones de lavado para utilizarlos en las etapas de detección. El kit puede comprender adicionalmente reactivos adecuados para la separación de la muestra, tal como la separación de PBMC o células T de la muestra. El kit puede estar diseñado para permitir la detección de las células T directamente en la muestra sin requerir ninguna separación de los componentes de la muestra.
- 10 El kit también puede comprender controles, tales como controles positivos o negativos. El control positivo puede permitir someter a ensayo el sistema de detección. Así, el control positivo típicamente imita el reconocimiento del péptido en cualquiera de los métodos anteriores. Típicamente, en los kits diseñados para determinar el reconocimiento *in vitro* el control positivo es una citoquina, tal como IFN- γ y/o IL-2.
- 15 El kit también puede comprender un medio para tomar una muestra que contiene células T del ser humano, tal como una muestra de sangre. El kit puede comprender un medio para separar células mononucleares o células T de una muestra del individuo.

Péptidos

- 20 Como se discutió anteriormente, el antígeno es típicamente un fragmento (tal como un péptido) de una molécula del MHC de clase I. El péptido comprende típicamente al menos un epítipo de una molécula del MHC de clase I. El péptido puede ser de una proteína de origen natural que es reconocido por una célula T que reconoce una secuencia del epítipo de células T natural del MHC de clase I. El péptido puede comprender una secuencia que es reconocida por una célula T que reconoce un epítipo de una molécula del MHC de clase I. Tales secuencias pueden tener una homología de al menos 70%, 80%, 90% con la secuencia del epítipo original. En una realización, el péptido comprende al menos un epítipo de células T de unión al MHC de Clase II de una molécula del MHC de clase I.
- 25 El péptido consiste típicamente en menos de 30 aminoácidos contiguos de una molécula del MHC de clase I humana, o una variante de la misma. El péptido consiste típicamente en menos de 30 aminoácidos contiguos del dominio $\alpha 3$ y/o del dominio transmembrana de una molécula del MHC de clase I, o una variante de la misma. Los péptidos pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en las secuencias mostradas en cualquiera de los SEQ ID NOS: 4 a 96. También se pueden utilizar variantes o análogos de los péptidos anteriores.
- 30 El término "una molécula del MHC de clase I" utilizado en la presente memoria, se refiere a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1), definido como una molécula del MHC de clase I en el 14^a International HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos 50% de identidad con un producto génico codificado por un alelo de HLA del MHC de clase I humano (por ejemplo, identificado como SEQ ID NO: 3) y/o homólogos de HLA humanos de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. Más preferiblemente, el producto génico de HLA del MHC de clase I tiene al menos 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% de identidad con los productos codificados por los alelos de HLA del MHC de clase I humano y/u homólogos de HLA del MHC de clase I humano de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. El HLA puede ser HLA-A, HLA-B o HLA-C.
- 35 El término "una molécula del MHC de clase I" utilizado en la presente memoria, se refiere a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1), definido como una molécula del MHC de clase I en el 14^a International HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos 50% de identidad con un producto génico codificado por un alelo de HLA del MHC de clase I humano (por ejemplo, identificado como SEQ ID NO: 3) y/o homólogos de HLA humanos de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. Más preferiblemente, el producto génico de HLA del MHC de clase I tiene al menos 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% de identidad con los productos codificados por los alelos de HLA del MHC de clase I humano y/u homólogos de HLA del MHC de clase I humano de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. El HLA puede ser HLA-A, HLA-B o HLA-C.
- 40 El término "una molécula del MHC de clase I" utilizado en la presente memoria, se refiere a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1), definido como una molécula del MHC de clase I en el 14^a International HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos 50% de identidad con un producto génico codificado por un alelo de HLA del MHC de clase I humano (por ejemplo, identificado como SEQ ID NO: 3) y/o homólogos de HLA humanos de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. Más preferiblemente, el producto génico de HLA del MHC de clase I tiene al menos 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% de identidad con los productos codificados por los alelos de HLA del MHC de clase I humano y/u homólogos de HLA del MHC de clase I humano de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. El HLA puede ser HLA-A, HLA-B o HLA-C.
- 45 El término "una molécula del MHC de clase I" utilizado en la presente memoria, se refiere a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1), definido como una molécula del MHC de clase I en el 14^a International HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos 50% de identidad con un producto génico codificado por un alelo de HLA del MHC de clase I humano (por ejemplo, identificado como SEQ ID NO: 3) y/o homólogos de HLA humanos de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. Más preferiblemente, el producto génico de HLA del MHC de clase I tiene al menos 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% de identidad con los productos codificados por los alelos de HLA del MHC de clase I humano y/u homólogos de HLA del MHC de clase I humano de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. El HLA puede ser HLA-A, HLA-B o HLA-C.

- El autor de la presente invención basó sus investigaciones en el antígeno del MHC de clase I más común, HLA-A2. Las secuencias para el antígeno del MHC de clase I, HLA-A2, son conocidas en la técnica, y pueden encontrarse en bases de datos disponibles públicamente, tales como NCBI, p. ej. en:
- 50 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=37518361>

- Por ejemplo, la secuencia de proteína completa del antígeno del MHC humano de clase I, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101) se identifica como SEQ ID NO: 1. La secuencia de la proteína madura del antígeno del MHC de clase I humano, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101) se identifica como SEQ ID NO: 2. Además, la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno del MHC de clase I, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101) se puede identificar como SEQ ID NO: 3.
- 55 La secuencia de ácido nucleico identificada por el SEQ ID NO: 3 comprende 8 exones y 7 intrones. Estos pueden ser definidos como sigue: - exón 1: 200 pb - 272 pb; intrón 1: 273 pb - 402 pb; exón 2: 403 pb - 672 pb; intrón 2: 673 pb - 913 pb; exón 3: 914 pb - 1189 pb; intrón 3: 1190 pb - 1789 pb; exón 4: 1790 pb - 2065 pb; intrón 4: 2066 pb - 2164 pb; exón 5: 2165 pb - 2281 pb; intrón 5: 2282 pb - 2719 pb; exón 6: 2720 pb - 2752 pb; intrón 6: 2753 pb - 2894 pb; exón 7: 2895 pb - 2942 pb; intrón 7: 2943 pb - 3111 pb; y exón 8: 3112 pb-3116 pb.
- 60 La secuencia de ácido nucleico identificada por el SEQ ID NO: 3 comprende 8 exones y 7 intrones. Estos pueden ser definidos como sigue: - exón 1: 200 pb - 272 pb; intrón 1: 273 pb - 402 pb; exón 2: 403 pb - 672 pb; intrón 2: 673 pb - 913 pb; exón 3: 914 pb - 1189 pb; intrón 3: 1190 pb - 1789 pb; exón 4: 1790 pb - 2065 pb; intrón 4: 2066 pb - 2164 pb; exón 5: 2165 pb - 2281 pb; intrón 5: 2282 pb - 2719 pb; exón 6: 2720 pb - 2752 pb; intrón 6: 2753 pb - 2894 pb; exón 7: 2895 pb - 2942 pb; intrón 7: 2943 pb - 3111 pb; y exón 8: 3112 pb-3116 pb.

La molécula del MHC de clase I puede ser HLA-A2. El término "HLA-A2" utilizado en la presente memoria, se refiere a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1 o 2), definida como HLA-A2 en el 14^o International HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos 50% de identidad con un producto génico codificado por un alelo de HLA-A2 humano (por ejemplo, identificado como SEQ ID NO: 3) y/u homólogos de HLA-A2 humanos de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. Más preferiblemente, el producto del gen HLA-A2 tiene al menos 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% de identidad con los productos codificados por los alelos de HLA-A2 humano y/u homólogos de HLA-A2 humanos de otras especies, o una de sus variantes o fragmentos funcionales. En realizaciones preferidas, el HLA tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Un HLA del MHC de clase I comprende cinco dominios, a saber, un dominio $\alpha 1$, un dominio $\alpha 2$, un dominio $\alpha 3$, un dominio transmembrana y un dominio citosólico.

Se apreciará a partir del SEQ ID NO: 1 que la molécula de histocompatibilidad de clase I humana completa, la proteína HLA-A2, consiste en 365 residuos de aminoácidos. Se apreciará a partir del SEQ ID NO: 2 que la molécula de histocompatibilidad de clase I humana madura, la proteína HLA-A2, consiste en 341 residuos de aminoácidos. La Figura 1 muestra una representación esquemática de la porción extracelular de HLA-A2. Se puede observar que el HLA-A2 comprende un dominio $\alpha 1$, un dominio $\alpha 2$, un dominio $\alpha 3$, y también un dominio transmembrana y un dominio citosólico, no mostrándose los dos últimos dominios en la Figura. Se apreciará que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ definen una región sustancialmente polimórfica de la molécula HLA-A2, y que el dominio $\alpha 3$ y el dominio transmembrana definen una región sustancialmente no polimórfica de la molécula HLA-A2. Por otra parte, una molécula de beta-2-microglobulina (β_2m) se une al empalme de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y al dominio $\alpha 3$ mediante interacciones no covalentes. En la figura 1 no se muestra la presencia de un corto péptido unido de forma no covalente en la ranura entre las hélices alfa de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Se apreciará que la combinación del péptido y las porciones adyacentes de las hélices alfa hace visible el epítipo a las células T CD8⁺. Esta discusión relativa a la estructura y la función de los cinco dominios en HLA-A2 también se aplica a otras HLA del MHC de clase I, tales como HLA-B o HLA-C.

La discusión que sigue se centra en péptidos (o variantes o análogos de los mismos) de HLA-A2. La molécula de HLA-A2 completa comprende 365 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Sin embargo, tal discusión también se aplica a otros HLA del MHC de clase I, tales como HLA-B o HLA-C. Se prefiere que uno de sus péptidos, variantes o análogos de HLA-A2 comprenda menos de 30 aminoácidos, y más preferiblemente, menos de 20 aminoácidos, y lo más preferiblemente, aproximadamente 15 aminoácidos.

Puesto que los linfocitos T reconocen proteínas sobre la base de su secuencia primaria como péptidos cortos unidos a moléculas del MHC, el método de la invención utiliza péptidos para detectar específicamente las respuestas de células T. El péptido, variante o análogo del mismo de una molécula del MHC de clase I pueden comprender una secuencia contigua de aminoácidos del dominio $\alpha 3$ de una molécula del MHC de clase I; el dominio transmembrana; el dominio citosólico; o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el péptido puede comprender una secuencia contigua de aminoácidos del dominio $\alpha 3$ y/o el dominio transmembrana de una molécula del MHC de clase I. Los péptidos preferidos comprenden la secuencia contra la que se han detectado respuestas de células T en un paciente. Por tanto, tales péptidos deben unirse a las moléculas del MHC de clase II. En consecuencia, las secuencias preferidas son las que comprenden al menos un epítipo de células T de unión al MHC de clase II. También se describen péptidos de los dominios $\alpha 1$ y/o $\alpha 2$.

El método de la invención puede utilizar típicamente un polipéptido (o variante o análogo del mismo) que consiste en menos de 30 aminoácidos contiguos desde el dominio $\alpha 3$ y/o dominio transmembrana de una molécula del MHC de clase I, o una variante del mismo. En realizaciones preferidas, el polipéptido consiste de menos de 20 aminoácidos contiguos o aproximadamente 15 aminoácidos contiguos desde el dominio $\alpha 3$ y/o dominio transmembrana de una molécula del MHC de clase I. Las secuencias específicas preferidas para su uso en la invención (SEQ ID NO: 42, 43, 48, 49 y 53 a 74) se discuten con más detalle a continuación.

En HLA-A2, el dominio $\alpha 1$ es codificado por el exón 2, es decir, los nucleótidos 403-672 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, se describen polipéptidos que comprenden menos de 30 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos definida como residuos 1-90 del SEQ ID NO: 2, es decir, los residuos codificados por los nucleótidos 403-672 del SEQ ID NO: 3. El dominio $\alpha 2$ está codificado por el exón 3, es decir, los nucleótidos 914-1189 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, se describen polipéptidos que comprenden menos de 30 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos definida como residuos 91-182 del SEQ ID NO: 2, es decir, los residuos codificados por los nucleótidos 914 a 1189 del SEQ ID NO: 3.

El dominio $\alpha 3$ es codificado por el exón 4, es decir, los nucleótidos 1790-2065 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, el polipéptido de la invención puede comprender menos de 30 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos definida como los residuos 183-274 del SEQ ID NO: 2, es decir, los residuos codificados por los nucleótidos 1790-

2065 del SEQ ID NO: 3. El dominio transmembrana es codificado por el exón 5, es decir, los nucleótidos 2165-2281 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, el polipéptido de la invención puede comprender menos de 30 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos definida como los residuos 275-314 del SEQ ID NO: 2, es decir, los residuos codificados por los nucleótidos 2165-2281 del SEQ ID NO: 3.

Los resultados de los estudios de unión comentados en los Ejemplos 1 y 2 revelaron un número significativo de polipéptidos que se unen de manera relativamente 'promiscua' al MHC de clase II, es decir, secuencias de péptidos que se unen a múltiples tipos del MHC de clase II. Algunos de los péptidos derivan de la región hipervariable o polimórfica de HLA-A2 (es decir, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$). Por ejemplo, el péptido P20 (SEQ ID NO: 23) deriva de los residuos de aminoácidos 105-119 de HLA-A2 (SEQ ID NO: 2), y el péptido p21 (SEQ ID NO: 24) deriva de los residuos 107-121). Ambos péptidos corresponden al péptido que se ha eluido de DR1. Se observó una respuesta positiva en 10 de 15 pacientes que habían elaborado anti-HLA-A2. Por lo tanto, un único péptido de 17 aminoácidos que se une promiscuamente a moléculas del MHC de clase II explica gran parte de la inmunogenicidad en esta región sea cual sea el MHC de clase II.

Por consiguiente, se puede utilizar un único (o dos péptidos solapados estrechamente) para detectar una alta proporción de potenciales respuestas inmunitarias de células T a moléculas del MHC de clase I. Algunos polipéptidos descritos en la presente memoria derivan de una región sustancialmente polimórfica de una molécula de HLA del MHC de clase I, por ejemplo, del dominio $\alpha 1$ y/o $\alpha 2$ de las misma. Por lo tanto, los polipéptidos descritos en la presente memoria comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

1. (a) HSMRYFFTSVSRPGR (SEQ ID NO: 4). Este péptido corresponde a los aminoácidos 3-17 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 1$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p1 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1827,1.
2. (b) MRYFFTSVSRPGRGE (SEQ ID NO: 5). Este péptido corresponde a los aminoácidos 5-19 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 1$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p2 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1789.
3. (c) HKWEAAHVAEQLRAY (SEQ ID NO: 33). Este péptido corresponde a los aminoácidos 145-159 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 2$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p30 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1.808.
4. (d) SDWRFLRGYHQYAYD (SEQ ID NO: 23). Este péptido corresponde a los aminoácidos 105-119 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 2$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p20 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1976,1.
5. (e) WRFLRGYHQYAYDGK (SEQ ID NO: 24). Este péptido corresponde a los aminoácidos 107-121 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 2$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p21 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1959,2.

Se debe apreciar que cada uno de los péptidos (a) a (e) derivan de la región polimórfica de HLA-A2. Sin embargo, un número significativo de individuos también responden a péptidos derivados de otra parte de la molécula de HLA-A2, y, en particular, las regiones de HLA-A2 que tienen polimorfismo limitado, por ejemplo, los dominios $\alpha 3$ y transmembrana. No se ha informado previamente de que tales regiones de la molécula del MHC de clase I sean reconocidas en respuestas inmunes de células T. Debido a que tienen polimorfismo limitado, estos péptidos actúan como sitios de potencial de reactividad cruzada entre diferentes moléculas de HLA. Por consiguiente, se prefieren los péptidos procedentes de estas regiones para su uso en el método de la invención puesto que una respuesta a estas moléculas sugiere que es más probable que un paciente inicie una respuesta inmunitaria contra un injerto, independientemente de alotipo de injerto.

Por consiguiente, los polipéptidos, variantes o análogos de los mismos preferidos para su uso en el método de la invención derivan de una región sustancialmente limitada o no polimórfica de la molécula de HLA del MHC de de clase I, tal como el dominio $\alpha 3$ y/o transmembrana. Por lo tanto, los péptidos más preferidos utilizados de acuerdo con la invención comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

- (f) HAVSDHEATLRCWAL (SEQ ID NO: 42). Este péptido corresponde a los aminoácidos 192-206 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p39 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1708.
- (g) RCWALSFYPAEITLT (SEQ ID NO: 43). Este péptido corresponde a los aminoácidos 202-216 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p40 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1770.
- (h) KPLTLRWEPSQPTI (SEQ ID NO: 53). Este péptido corresponde a los aminoácidos 268-282 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 3$ y del dominio transmembrana de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p50 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1752.
- (i) LTLRWEPSQPTIPI (SEQ ID NO: 54). Este péptido corresponde a los aminoácidos 270-284 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 3$ y el dominio transmembrana de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p51 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1737.

(j) PTIPVGIAGLVLF (SEQ ID NO: 55). Este péptido corresponde a los aminoácidos 280-294 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio transmembrana de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p52 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1522.

(k) IPIVGIIAGLVLFGA (SEQ ID NO: 56). Este péptido corresponde a los aminoácidos 282-296 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio transmembrana de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p53 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1452.

(l) GTFQKWAAVVPSGQEQR (SEQ ID NO: 48). Este péptido corresponde a los aminoácidos 239-253 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p45 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1574.

(m) FQKWAAVVPSGQEQR (SEQ ID NO: 49). Este péptido corresponde a los aminoácidos 241-256 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula HLA-A2. Este péptido se denomina p46 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1829.

Se debe apreciar que cada uno de los péptidos (f) a (m) derivan de la región sustancialmente no polimórfica de HLA-A2. Se muestra aquí que tales péptidos derivados de la región no polimórfica (es decir, los dominios $\alpha 3$ y transmembrana) de HLA-A2 muestran una sorprendentemente alta frecuencia de respuesta en pacientes que han elaborado anticuerpos contra HLA-A2 y respuestas significativas en algunos otros.

Los polipéptidos, variantes o análogos, que comprenden regiones solapantes de cualquiera de los péptidos preferidos descritos en la presente memoria también son reconocidos por las células T de los individuos, y por lo tanto son también útiles para la detección de la respuesta de células T a moléculas del MHC de clase I. Los polipéptidos, variantes o análogos de los mismos derivados de las regiones no polimórficas de un HLA del MHC de clase I, tales como HLA-A2, pueden comprender secciones o regiones solapantes. Por lo tanto, polipéptidos adicionales utilizados de acuerdo con la invención comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

(n) KPLTLRWEPSQPTIPI (SEQ ID NO: 57). Este péptido corresponde al solapamiento de los aminoácidos 268 a 282 y 270 a 284 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2). Este péptido se denomina p50/51 cuando es referido en la presente memoria.

(o) PTIPVGIAGLVLFGA (SEQ ID NO: 58). Este péptido corresponde al solapamiento de los aminoácidos 280 a 294 y 282 a 296 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2). Este péptido se denomina p52/53 cuando es referido en la presente memoria.

(p) GTFQKWAAVVPSGQEQR (SEQ ID NO: 59). Este péptido corresponde al solapamiento de los aminoácidos 239-253 y 241-256 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2). Este péptido se denomina p45/46 cuando es referido en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

(q) SDWRFLRGYHQYAYDGK (SEQ ID NO: 121). Este péptido corresponde al solapamiento de los aminoácidos 105-119 y 107-121 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2). Este péptido se denomina p20/21 cuando es referido en la presente memoria.

Por analogía con los anticuerpos anti-HLA, los péptidos preferidos derivados de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana podrían ser denominados epítomos de células T 'públicos'. Esto es relevante para la evolución de la propagación de las respuestas inmunitarias a diferentes HLA, y en el diseño de péptidos o mezclas útiles para la detección de la respuesta inmunitaria de células T para moléculas del MHC de clase I.

A modo de ejemplo, como se muestra en las Figuras 5 y 13, la secuencia de péptido p39, es decir, el SEQ ID NO: 42, que deriva de los aminoácidos 192 a 206 de HLA-A2, también está presente en la secuencia de las siguientes moléculas de HLA: HLA-A2, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A29, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69 y HLA-A74. Por lo tanto, la detección de una respuesta de células T al péptido p39 (o una variante o análogo del mismo) indica que también probable una respuesta inmunitaria a cualquiera de estas moléculas de HLA es. Esto a su vez es predictivo de rechazo de un injerto que expresa una amplia gama de moléculas de HLA.

Además, de manera similar, sólo hay una única variante de la secuencia de p39 (SEQ ID NO: 42) expresada por todas las demás moléculas de HLA-A, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A30, HLA-A36, HLA-A80, y la mayoría de las moléculas de HLA-B, como se indica en las Figuras 5 y 13. Esta variante se denomina análogo 1 de p39 y se muestra en SEQ ID NO: 60. Por consiguiente, las pruebas de una respuesta de células T al péptido p39 y al análogo 1 de p39 analógica (en el que prolina reemplaza la alanina en el residuo de 193 e isoleucina reemplaza la valina en el residuo 194), proporciona una combinación que puede predecir una respuesta inmunitaria a un trasplante que porte cualquier molécula de HLA-A y la mayoría de las moléculas de HLA-B.

Además, de manera similar, hay una sola variante de la secuencia de p39 (SEQ ID NO: 42) expresada por otras moléculas de HLA-B, HLA-B51, HLA-B52, HLA-58B53, HLA-B58, HLA-B78 como se indica en la Figura 13. Esta variante se denomina análogo 2 de p39 y se muestra en SEQ ID NO: 61. Por consiguiente, el ensayo de una

respuesta de células T al péptido p39 y al análogo 2 de p39 (en el que una prolina reemplaza una alanina en el residuo 193), proporciona una combinación que puede predecir una respuesta inmunitaria a un trasplante que tiene una amplia gama de moléculas de HLA-A y algunas moléculas de HLA-B.

Además, de manera similar, hay una sola variante de la secuencia de p39 (SEQ ID NO: 42) expresada por HLA-B44, como se indica en la Figura 13. Esta variante se denomina análogo 3 de p39 y se muestra en SEQ ID NO: 62. Por consiguiente, el ensayo de una respuesta de células T al péptido p39 y al análogo de p39 (en el que una prolina reemplaza alanina en el residuo 193 y una valina reemplaza una alanina en el residuo 199), proporciona una combinación que puede predecir una respuesta inmunitaria a un trasplante que tiene una amplia gama de moléculas HLA-A, así como de HLA-B44.

Otras variantes de p39 incluyen p39 (ser) (SEQ ID NO: 97), en el que una serina reemplaza una cisteína en el residuo 203, el análogo 1 de p39 (ser) (SEQ ID NO: 98), en el que una prolina reemplaza una alanina en el residuo 193, una isoleucina reemplaza valina en el residuo 194, y una serina reemplaza una cisteína en el residuo 203, p39 (b) (SEQ ID NO: 99), en el que un ácido 2-aminobutírico reemplaza una cisteína en el residuo 203, y el análogo 1 de p39 (b) (SEQ ID NO: 100), en el que una prolina reemplaza una alanina en el residuo 193, una isoleucina reemplaza valina en el residuo 194, y un ácido 2-aminobutírico reemplaza una cisteína en el residuo 203.

A modo de un ejemplo adicional, como se muestra en la Figura 13, la secuencia del péptido p40, es decir, SEQ ID NO: 43, que deriva de los aminoácidos 202 a 216 de HLA-A2, también está presente en la secuencia de las siguientes moléculas de HLA: HLA-A2, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A29, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74 y HLA-A74. Por lo tanto la detección de una respuesta de células T al péptido p40 (o una variante o análogo del mismo) indica que también es probable una respuesta inmunitaria a cualquiera de estas moléculas de HLA. Esto a su vez es predictivo de rechazo de un injerto que expresa una amplia gama de moléculas de HLA.

Además, de manera similar, hay una sola variante de la secuencia de p40 (SEQ ID NO: 43) expresada por otras moléculas de HLA-A, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A30, HLA-A36, así como la mayoría de las moléculas HLA-B, como se indica en la Figura 14. Esta variante se denomina análogo de p40 y se muestra en SEQ ID NO: 63. Por consiguiente, el ensayo de una respuesta de células T al péptido p40 y al análogo de p40 (en el que una serina reemplaza una glicina en el residuo 207), proporciona una combinación que puede predecir una respuesta inmunitaria a un trasplante que tiene una amplia gama de moléculas de HLA-A y moléculas de HLA-B.

Otras variantes de p40 incluyen p40 (ser) (SEQ ID NO: 101), en la que una serina reemplaza una cisteína en el residuo 203, y el análogo 1 de p40 (SER) (SEQ ID NO: 102), en el que una serina reemplaza una cisteína en el residuo 203 y una glicina reemplaza una serina en el residuo 207.

Por otra parte, existen variantes de la secuencia de p45 que incluyen el análogo 1 de p45 (SEQ ID NO: 129) en el que Glu reemplaza Gln en el residuo 253, y el análogo 2 de p45 (SEQ ID NO: 130) en el que Ser reemplaza Ala en el residuo 246.

Por otra parte, existen variantes de la secuencia de p46 incluyendo el análogo 1 de p46 (SEQ ID NO: 131) en el que Glu reemplaza Gln en el residuo 253, y el análogo 2 de p46 (SEQ ID NO: 132) en el que Ser reemplaza Ala en el residuo 246.

Por otra parte, como se ilustra en las Figuras 6 y 15, el péptido p50 (SEQ ID NO: 53), que deriva de los aminoácidos 268 a 282, y el péptido p51 (SEQ ID NO: 54), que deriva de los aminoácidos 270-284, comprenden secuencias que son compensadas con solo 2 aminoácidos, por lo que abarcan un tramo de 17 aminoácidos. Del mismo modo, como se ilustra en las Figuras 7 y 16, el péptido p52 (SEQ ID NO: 55), que deriva de los aminoácidos 280 a 294, y el péptido p53 (SEQ ID NO: 56), que deriva de los aminoácidos 282-296, comprenden secuencias que son compensadas por solo 2 aminoácidos, por lo que abarcan un tramo de 17 aminoácidos. En ambos casos, los péptidos identificados no sólo están presentes en HLA-A2, sino también en HLA-A25, HLA-A26, HLA-A29, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74 y HLA-A80. P51 (SEQ ID NO: 54) y P52 (SEQ ID NO: 55) también están presentes en HLA-B15, HLA-B18, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B45, HLA-B48, HLA-B49, HLA-B50, HLA-B51, HLA-B52, HLA-B53, HLA-B54, HLA-B55, HLA-B58, HLA-B59, HLA-B73, HLA-B78, HLA-B82 y HLA-B95 (Figura 14).

Además, los análogos de estas dos secuencias en las que una leucina es reemplazada por una prolina en el residuo 276 (para el heptadecámero 268-284; SEQ ID NO: 64) o una leucina es reemplazada por una fenilalanina en 294 (para el heptadecámero 280-296; SEQ ID NO: 65), podrían proporcionar secuencias de péptidos que podrían ser expresados por la mayoría de las moléculas de HLA-A de una manera análoga a la descrita para p39, siendo las únicas omisiones sustanciales HLA-A23 y HLA-A24.

Las variantes de p50 incluyen el análogo 1 de p50 (SEQ ID NO: 103), en el que una leucina reemplaza una prolina en el residuo 276, y el análogo 2 de P50 (SEQ ID NO: 104), en el que una leucina reemplaza una prolina en el residuo 276 y una valina reemplaza una isoleucina en el residuo 282.

- 5 Las variantes de p51 incluyen el análogo 1 de p51 (SEQ ID NO: 105), en el que una leucina reemplaza una prolina en el residuo 276, y el análogo 2 de p51 (SEQ ID NO: 106), en el que una valina reemplaza una isoleucina en el residuo 282.

- 10 Las variantes de p52 incluyen el análogo 1 de p52 (SEQ ID NO: 107), en el que una leucina reemplaza una fenilalanina en el residuo 294, el análogo 2 de p52 (SEQ ID NO: 108), en la que una alanina reemplaza una valina en el residuo 292, una valina reemplaza una leucina en el residuo 293, una leucina reemplaza una fenilalanina en el residuo 294, y el análogo 3 de p52 (SEQ ID NO: 109), en el que una valina reemplaza una isoleucina en el residuo 282, una alanina reemplaza una valina en el residuo 292, una valina reemplaza una leucina en el residuo 293, y una leucina reemplaza una fenilalanina en el residuo 294. Las variantes rk de p52 (SEQ ID NO: 110), el análogo 1 rk de p52 (SEQ ID NO: 111), el análogo 2 rk de p52 (SEQ ID NO: 112), y el análogo 3 rk de p52 (SEQ ID NO: 113), respectivamente corresponden a los péptidos de los SEQ ID NO: 55 y 107 a 109 con KR unido en el extremo N y RK unido al extremo C.
- 15

- 20 Las variantes de p53 incluyen el análogo 1 de p53 (SEQ ID NO: 114), en el que una leucina reemplaza una fenilalanina en el residuo 294, el análogo 2 de p53 (SEQ ID NO: 115), en el que una alanina reemplaza una valina en el residuo 292, una valina reemplaza una leucina en el residuo 293, una leucina reemplaza una fenilalanina en el residuo 294, una alanina reemplaza una glicina en el residuo 295, y una valina reemplaza una alanina en el residuo 296, y el análogo 3 de p53 (SEQ ID NO: 116), en el que una valina reemplaza una isoleucina en el residuo 282, una alanina reemplaza una valina en el residuo 292, una valina reemplaza una leucina en el residuo 293, una leucina reemplaza una fenilalanina en el residuo 294, una alanina reemplaza una glicina en el residuo 295, y una valina reemplaza una alanina en el residuo 296. Las variantes rk de p53 (SEQ ID NO: 117), el análogo 1 rk de p53 (SEQ ID NO: 118), el análogo 2 rk de p53 (SEQ ID NO: 119), y el análogo 3 rk de p53 (SEQ ID NO: 120), respectivamente corresponden a los péptidos de los SEQ ID NO: 56 y 114 a 116 con KR unido en el extremo N y RK unido al extremo C.
- 25

- 30 Otros análogos de p50/51 y p52/53 se describen en la Tabla 1 de más abajo.

Tabla 1 - Análogos adicionales de p50/51 y p52/53

SEQ ID NO:	Análogo	Cambio o cambios para llegar al análogo	Presente en HLA
66	análogo 2 de p50/51	Lisina en 273	A0320
67	análogo 3 de p50/51	Valina en 282	A24
			Todos los HLA-B en I que p50 no está presente
68	análogo 4 de p50/51	Valina en 282	A23
		Histidina en 283	
69	análogo 2 de p52/53	Valina en 282	A24
		Leucina en 294	
70	análogo 3 de p52/53	Valina en 282	A23
		Histidina en 283	
71	análogo 4 de p52/53	Alanina en 292	HLA-B 15, 18, 35, 37, 45, 48-55, 58, 59, 73, 78,82,95
		Valina a 293	
		Leucina en 294	
		Alanina en 295	
		Valina en 296	
72	análogo 5 de p52/53	Valina en 282	El resto de HLA-B
		Alanina en 292	
		Valina a 293	
		Leucina en 294	
		Alanina en 295	
		Valina en 296	

Por lo tanto, el ensayo de una respuesta de células T a una combinación de polipéptidos p50, p51, 52, y p53, o variantes o análogos de los mismos, proporciona una combinación que puede predecir una respuesta inmunitaria a un trasplante que tenga cualquiera de estas moléculas de HLA.

Como será evidente, en ensayo de una respuesta de células T a combinaciones específicas de p39, p40, p50, p51, p50/51, p52, p53 y/o p52/53 y una o más de sus variantes comentadas anteriormente puede predecir una respuesta inmunitaria. Esto tiene la ventaja de utilizar un número de polipéptidos tan bajo como sea posible para predecir la respuesta inmunitaria a un trasplante que tenga cualquier molécula de HLA-A o HLA-B.

Por lo tanto, se apreciará a partir de lo anterior que los polipéptidos, variantes o análogos de los mismos preferidos que derivan de la región no polimórfica de HLA-A2 también son expresados por muchas otras moléculas de HLA-A, y no sólo de HLA-A2, actuando como sitios de reactividad cruzada potencial entre diferentes moléculas de HLA. Por lo tanto, los beneficios de la utilización de tales péptidos en los métodos de acuerdo con la invención, y en particular para usos en la predicción de rechazo del injerto, pueden ser mucho más claros que contra el antígeno de HLA-A2 solo.

Las indicaciones anteriores son significativas ya que demuestran que un análisis de células T sencillo con sólo un pequeño número de péptidos puede detectar respuestas inmunitarias a una amplia gama de diferentes moléculas del MHC de clase I, debido a la reactividad cruzada de ciertos epítopos de células T. En consecuencia, los polipéptidos preferidos derivados de la molécula del MHC de clase I pueden incluir p39 (SEQ ID NO: 42), p50/51 (SEQ ID NO: 57), p52/53 (SEQ ID NO: 58), p50 (SEQ ID NO: 53), p51 (SEQ ID NO: 54), 52 (SEQ ID NO: 55), y p53 (SEQ ID NO: 56), o variantes o análogos de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Se apreciará que estos polipéptidos derivan de HLA-A2. Los polipéptidos correspondientes de otros antígenos de clase I del MHC, como HLA-B y HLA-C, también se pueden utilizar en el método de la invención.

Algunas variantes adecuadas de los polipéptidos preferidos descritos anteriormente se muestran a continuación:

P39 (SEQ ID NO: 42)	HAVSDHEATLRCWAL
(q) análogo 1 de p39 (SEQ ID NO: 60)	HPISDHEATLRCWAL
P50 (SEQ ID NO: 53)	KPLTLRWEPSQPTI
P51 (SEQ ID NO: 54)	LTLRWEPSQPTIPI
(r) heptadecámero del análogo 1 (SEQ ID NO: 64)	KPLTLRWELSSQPTIPI
P52 (SEQ ID NO: 55)	PTIPIVGIIAGLVLF
p53 (SEQ ID NO: 56)	IPIVGIIAGLVLFGA
(s) heptadecámero del análogo 1 (SEC ID NO: 65)	PTIPIVGIIAGLVLLGA
P40 (SEQ ID NO: 43)	RCWALSFYPAEITLT
(t) análogo de p40 (SEQ ID NO: 63)	RCWALGFYPAEITLT
p45/46 (SEQ ID NO: 59)	GTFQKWA AVVVPSGQEQR
(u) análogo 1 de p45/46 (SEQ ID NO: 73)	GTFQKWA AVVVPSGEEQR
(v) análogo 2 de p45/46 (SEQ ID NO: 74)	GTFQKWASVVVPSGQEQR

Por lo tanto, las variantes preferidas utilizadas de acuerdo con la invención pueden comprender sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

- 5 (q) HPISDHEATLRCWAL (SEQ ID NO: 60). Este análogo deriva del péptido P39 (SEQ ID NO: 42), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula de HLA-A2, excepto que el residuo de alanina se reemplaza por un residuo de prolina, y el residuo de valina se reemplaza por un residuo de isoleucina. Este análogo se denomina "análogo 1 de p39" cuando es referido en la presente memoria.
- 10 (r) KPLTLRWELSSQPTIPI (SEQ ID NO: 64). Este análogo deriva de los péptidos p50 (SEQ ID NO: 53) y P51 (SEQ ID NO: 54), y deriva del dominio $\alpha 3$ y el dominio transmembrana de la molécula de HLA-A2, excepto que el residuo de prolina en la posición 276 se reemplaza por un residuo de leucina. Este análogo se denomina "análogo 1 de p50/p51" cuando es referido en la presente memoria.
- 15 (s) PTIPIVGIIAGLVLLGA (SEQ ID NO: 65). Este análogo deriva de los péptidos p52 (SEQ ID NO: 55) y p53 (SEQ ID NO: 56), y deriva del dominio transmembrana de la molécula de HLA-A2, excepto que el residuo de fenilalanina en 294 se reemplaza por un residuo de leucina. Este análogo se denomina "análogo 1 de p52/53" cuando es referido en la presente memoria.
- (t) RCWALGFYPAEITLT (SEQ ID NO: 63). Este análogo deriva del péptido p40 (es decir SEQ ID NO: 43), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula de HLA-A2, excepto que el residuo de serina en la posición 207 se reemplaza por un residuo de glicina. Este análogo se denomina "análogo de p40" cuando es referido en la presente memoria.
- 20 (u) GTFQKWA AVVVPSGEEQR (SEQ ID NO: 73). Este análogo deriva del péptido p45/46 (SEQ ID NO: 59), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula de HLA-A2, excepto que el residuo de glutamina se reemplaza por un residuo de ácido glutámico. Este análogo se denomina "análogo 1 de p45/p46" cuando es referido en la presente memoria.
- 25 (v) GTFQKWASVVVPSGQEQR (SEQ ID NO: 74). Este análogo deriva del péptido p45/46 (SEQ ID NO: 59), y deriva del dominio $\alpha 3$ de la molécula de HLA-A2, excepto que el residuo de alanina se reemplaza por un residuo de serina. Este análogo se denomina "análogo 2 de p45/46" cuando es referido en la presente memoria.

Las variantes o análogos de péptidos de los mismos utilizados en el método de la invención se pueden obtener químicamente a partir de un polipéptido de la molécula de HLA, por ejemplo, mediante escisión proteolítica o se pueden obtener en un sentido intelectual a partir del polipéptido, por ejemplo, haciendo uso de la secuencia de aminoácidos del polipéptido y sintetizando los péptidos basados en la secuencia. Los péptidos se pueden sintetizar utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Variantes y análogos de los péptidos

- 35 Los péptidos variantes o análogos se mencionan en la presente memoria. Tales variantes o análogos comprenden típicamente una secuencia que se une a la misma molécula del MHC de clase II y/o es reconocida por una célula T que reconoce el epítipo correspondiente en el polipéptido de los SEQ ID NO: 4 a 74.

Las variantes de los SEQ ID NO: 4 a 74 pueden ser fragmentos obtenidos por truncamiento, p. ej. por eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos N- y/o C-terminales de un polipéptido. Los fragmentos también se pueden generar por una o más delecciones internas, siempre que el núcleo de 9 aminoácidos que componen el epítipo de células T no se interrumpa sustancialmente.

Por ejemplo, una variante del SEQ ID NO: 4 puede comprender un fragmento del SEQ ID NO: 4, es decir, una secuencia más corta. Esto puede incluir una delección de uno, dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N-terminal del SEQ ID NO: 4 o del extremo C-terminal del SEQ ID NO: 1. Tales delecciones pueden realizarse en ambos extremos del SEQ ID NO: 4. Una variante del SEQ ID NO: 4 puede incluir aminoácidos adicionales (por ejemplo de la secuencia de la proteína parental de la cual deriva el péptido) que se extienden más allá del extremo o los extremos del SEQ ID NO: 4. Una variante puede incluir una combinación de las delecciones y adiciones comentadas anteriormente. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden eliminar de un extremo del SEQ ID NO: 4, pero se pueden añadir aminoácidos adicionales de la secuencia de la proteína matriz completa en el otro extremo del SEQ ID NO: 4. La misma discusión de las variantes anteriores también se aplica a los SEC ID NOS: 5-74.

Un péptido variante puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74 o un fragmento del mismo. Un péptido variante puede comprender una secuencia que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con al menos 9 o más aminoácidos contiguos en cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74. Más preferiblemente una variante adecuada puede comprender al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% de identidad de aminoácidos con al menos 9 aminoácidos contiguos de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74. Este nivel de identidad de aminoácidos puede ser observado en cualquier sección del péptido, aunque es preferiblemente la región central. El nivel de identidad de aminoácidos es de más de al menos 9 aminoácidos contiguos pero puede ser al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15 o al menos 16 o 17 aminoácidos, dependiendo del tamaño de los péptidos de comparación. En consecuencia, cualquiera de los niveles de identidad especificados anteriormente puede ser a través de toda la longitud de la secuencia.

En relación con las secuencias de aminoácidos, "identidad de secuencia" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evaluó utilizando ClustalW (Thompson et al, 1994, supra.) Con los siguientes parámetros: parámetros de alineación por parejas -Método: exacto, Matriz: PAM, Penalización abierto: 10,00, penalización por extensión de Huevo: 0,10; múltiple alineación parámetros de Matriz: PAM, Penalización por apertura de hueco: 10,00, % de identidad en caso de retraso: 30, Penalizar huecos terminales: activado, Distancia de separación del hueco: 0, Matriz negativa: no, Penalización por extensión del hueco: 0,20, Penalizaciones por huecos específicos del residuo: activadas, Penalización por huecos hidrófilos: activada, Residuos hidrófilos: GPSNDQEKR. Se pretende que la identidad de secuencia en un residuo concreto incluya residuos idénticos que simplemente han sido derivatizados.

Un péptido variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más, o hasta 10 sustituciones de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74. Las variantes por sustitución implican preferiblemente la sustitución de uno o más aminoácidos con el mismo número de aminoácidos y la realización de sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, un aminoácido puede ser sustituido por un aminoácido alternativo que tiene propiedades similares, por ejemplo, otro ácido amino alcalino, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido con carga, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que se pueden utilizar para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Áspid	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
Su	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, cargado (+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

Las variantes adicionales incluyen aquellas en las que en lugar del aminoácido de origen natural el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos utilizados en las secuencias también

pueden ser modificados, p. ej., marcados, siempre que la función del péptido no resulte significativamente afectada adversamente.

5 Cuando el péptido tiene una secuencia que varía de la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74 o un fragmento del mismo, las sustituciones pueden producirse en la longitud completa de la secuencia, dentro de la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74 o fuera de la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74. Por ejemplo, las variaciones descritas en la presente memoria, tales como adiciones, deleciones, sustituciones y modificaciones, pueden producirse dentro de la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74. Un péptido variante puede comprender o consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID
10 NO: 4 a 74 en la que se han realizado una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácidos. Un péptido variante puede comprender un fragmento de la proteína parental que es más grande que cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74. En esta realización, las variaciones descritas en la presente memoria, tales como sustituciones y modificaciones, pueden producirse dentro y/o fuera de la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74.

15 Los péptidos variantes de la invención tienen de 9 a 30 aminoácidos de longitud inclusive. Preferiblemente, pueden tener de 9 a 20 o más, preferiblemente de 13 a 17 aminoácidos de longitud. Los péptidos pueden tener la misma longitud que las secuencias de peptídicas de cualquiera de los SEQ ID NO: 4 a 74.

20 El término "péptido" incluye no solo moléculas en las que los residuos de aminoácidos están unidas por enlaces peptídicos(-CO-NH-), sino también moléculas en las que se invierte el enlace peptídico. Tales peptidomiméticos retro-inversos pueden elaborarse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo tales como los descritos por Meziere y col. (1997) en J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica la elaboración de pseudopéptidos que contienen modificaciones en el esqueleto, y no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y col (1997) muestran que, al menos para el MHC de clase II y las respuestas de células T auxiliares, estos pseudopéptidos son
25 útiles. Los péptidos de tipo retro-inverso, que contienen enlaces NH-CO en lugar de uniones peptídicas CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Las variantes pueden ser alteradas por la inclusión de residuos adicionales en ambos/cualquiera de los extremos de una secuencia epitópica o internamente a una secuencia epitópica para mejorar la solubilidad, siempre que la variante todavía funcione como un epítipo de célula T de unión al MHC de clase II.
30

Del un modo similar, se puede prescindir por completo del enlace peptídico siempre que se use un radical conector apropiado que conserve la separación entre los átomos de carbono de los residuos de aminoácidos; se prefiere particularmente que radical conector tenga sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planaridad que un enlace peptídico. También se apreciará que el péptido puede ser bloqueado convenientemente en su extremo N o C con el fin de ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica. Por ejemplo, el grupo amino N-terminal de los péptidos puede estar protegido por reacción con un ácido carboxílico y el grupo carboxilo C-terminal del péptido puede estar protegido por reacción con una amina. Otros ejemplos de modificaciones incluyen glicosilación y fosforilación. Otra modificación posible es que los hidrógenos en las aminas de la cadena lateral de R o K pueden ser sustituidos por grupos metileno
35 (-NH₂→ -NH(Me) o -N(Me)₂).

Los análogos de péptidos de acuerdo con la invención también pueden incluir variantes de péptidos que aumentan o disminuyen la vida media del péptido *in vivo*. Los ejemplos de los análogos capaces de aumentar la vida media de los péptidos utilizados de acuerdo con invención incluyen análogos peptoides de los péptidos, derivados D-aminoácido de los péptidos, e híbridos de péptido-peptoides. Una realización adicional de los polipéptidos variantes utilizados de acuerdo con la invención comprende formas de D-aminoácidos del polipéptido. La preparación de polipéptidos utilizando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos disminuye enormemente cualquier rotura no deseada de tal agente por procesos metabólicos normales, disminuyendo las cantidades de agente que debe ser administrado, junto con la frecuencia de su administración.
45
50

Los péptidos proporcionados por la presente invención pueden derivar de las variantes de empalme de las proteínas parentales codificadas por el ARNm generado por corte y empalme alternativo de los transcritos primarios que codifican las cadenas de proteínas parentales. Los péptidos también pueden derivar de mutantes de aminoácidos, variantes de glicosilación y otros derivados covalentes de las proteínas parentales que retienen al menos una propiedad de unión al MHC de las proteínas parentales. Los derivados ilustrativos incluyen moléculas en las que los péptidos de la invención se modifican covalentemente mediante sustitución, medios químicos, enzimáticos, u otros medios apropiados con un radical distinto de un aminoácido de origen natural. También se incluyen variantes de origen natural de las proteínas parentales. Tales variantes pueden estar codificadas por una variante alélica o representan una variante de corte y empalme alternativa.
55
60

Las variantes descritas anteriormente se pueden preparar durante la síntesis del péptido o mediante modificación posterior a la producción, o cuando el péptido está en forma recombinante utilizando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o escisión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos.

Ejemplos

Visión General

Los anticuerpos específicos del donante para las moléculas de HLA que contraindican el trasplante y el post-trasplante están asociados con el rechazo o el fracaso del injerto. Las respuestas de las células T son importantes para este proceso debido a que proporcionan ayuda para la producción de anticuerpos. El autor de la presente invención estudio sistemáticamente por lo tanto las respuestas de las células T a una única molécula del MHC de clase I, HLA-A2, que tiene una especificidad para al anticuerpo diana común en pacientes sensibilizados en lista de espera para un trasplante de órganos, esto es, pacientes que han elaborado anticuerpos contra HLA-A2. En ambos Ejemplos 1 y 2, el autor de la presente invención diseñó una serie de 60 péptidos de 15 unidades solapantes que abarcaban la secuencia primaria de HLA*020101. Sin embargo, solamente 53 (p1-p53) pudieron ser sintetizados utilizando la tecnología F-moc. A continuación se estudió la afinidad de unión de estos 53 péptidos a 13 moléculas del MHC de clase II diferentes por medio de ELISA. El autor de la presente invención descubrió que los péptidos de diferentes localizaciones a lo largo de la molécula HLA-A2 mostraron una unión promiscua al MHC.

Los 30 péptidos que se unieron al MHC de clase II se utilizaron a continuación para estimular células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 40 pacientes incluidos en listas de trasplantes con historiales conocidos de sensibilización a anticuerpos. Las respuestas se evaluaron mediante Elispot para interferón γ , y los descubrimientos se resumen más abajo.

En el Ejemplo 3, el autor de la presente invención comparó la secuencia de algunos de los péptidos de 15 unidades de HLA-A2 con secuencias de otros polipéptidos de HLA para encontrar secuencias adicionales de relevancia. Los Ejemplos 4 a 6 son estudios de respuestas a los péptidos de la invención en diferentes grupos de pacientes con tranplantes y controles.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

1) Predicción de epítomos *in silico*

Con el fin de limitar el número de péptidos que se iba a escrutar en los análisis directo de unión a péptidos del MHC y para maximizar la discriminación en zonas que probablemente son de interés, se adoptó un enfoque enzimático que implicaba una evaluación computarizada inicial de la secuencia de aminoácidos primaria de la molécula de HLA-A*0201, esto es, HLA-A2. La secuencia de ADN de HLA-A2 se identifica como SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos se identifica como SEQ ID NO: 1 y 2.

Referente a la Figura 1, se muestra una representación esquemática de la porción extracelular de la molécula de histocompatibilidad de clase I humana, HLA-A2. Los tramos de conformación beta están representados por flechas amplias (que señalan el extremo N a C). Las regiones de hélice alfa se muestran como cintas helicoidales. Los pares de esferas representan puentes disulfuro. La molécula de beta-2-microglobulina (β_2m) está unida al empalme de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y al dominio $\alpha 3$ por medio de interacciones no covalentes solamente. En la Figura 1 no se muestra la presencia de un péptido corto unido no covalentemente en la ranura entre las hélices alfa de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. La combinación del péptido y las porciones adyacentes de las hélices alfa conforma el epítopo visualizado por las células T CD8+. La porción transmembrana y citosólica de la moléculas de HLA-A2 no se muestran, pero se apreciará que la porción transmembrana se extiende desde aproximadamente el residuo de aminoácido 283 en adelante.

El análisis de la secuencia de aminoácidos primaria de la molécula de HLA-A2 se llevó a cabo utilizando el algoritmo ampliamente asequible TEPITOPE (Sturniolo, T., et al., Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nat Biotechnol, 1999. 17(6): págs. 555-61). Se utilizó el programa para identificar las secuencias que comparten motivos de unión a HLA con los epítomos previamente identificados y caracterizados. Sin embargo, debido a que tales enfoques *in silico* pueden omitir epítomos que no coinciden con los motivos convencionales, el autor de la presente invención llevó a cabo búsquedas adicionales en la bibliografía y las bases de datos con el fin de identificar todas las secuencias de unión al MHC de clase II referidas previamente de la molécula HLA-A2.

2) Análisis de solubilidad

Las secuencias que se pronosticó que se unirían a las moléculas del MHC de clase II fueron evaluadas para determinar su solubilidad utilizando algoritmos computarizados predictivos tales como EXPASY (www.expasy.org/). El autor de la presente invención creyó que semejante análisis de solubilidad era un precursor importante de los análisis de unión física ya que permitía la identificación de cualquier secuencia peptídica que contuviera importantes

motivos centrales de unión al MHC procesados naturalmente, pero teóricamente insolubles. Frecuentemente, tales epítomos se pueden volver solubles mediante la adición de diferentes residuos flanqueantes que existen naturalmente en la proteína de origen (HLA-A*0201 en este caso). Este enfoque evitó una síntesis que lleva mucho tiempo y costosa de péptidos que no generaría datos en los análisis de unión al MHC, y por lo tanto hubiera tenido, por último, poco uso para la intervención clínica.

3) Síntesis de péptidos

Se diseñó una serie de 60 péptidos de 15 unidades solapantes que abarcaban la secuencia primaria de HLA*020101. No obstante, solamente se pudieron sintetizar 53 (p1-p53). Por consiguiente, se generó una serie de 53 fragmentos de 15 unidades solapantes sintéticos compensados por 2 a 5 residuos, correspondientes a motivos de unión al MHC de clase II, solubles, en forma de sales de HCl por medio de la química Fmoc convencional y se suministraron en forma de polvo liofilizado (NeoMPS SA, Strasbourg, Francia). Los péptidos se reconstituyeron en HCl 10^{-4} M.

En referencia a la Figura 2, se muestran los detalles de los 53 péptidos, designados p1 a p53. La Figura 2 muestra la posición, el peso molecular y la secuencia de cada péptido.

4) Unión del péptido a moléculas del MHC purificadas *in vitro*

El análisis de unión péptido-MHC fue un análisis competitivo en el que los péptidos "problema" se titulan en pocillos que contienen moléculas de MHC purificadas, inmovilizadas y concentraciones conocidas de péptidos de referencia biotinilados que se sabe que se unen a la molécula en cuestión con una elevada afinidad.

Las moléculas del MHC para el estudio incluyeron: DRB1*0101 (DR1), DRB1*0301 (DR3), DRB1*0401 (DR4), DRB1*0701 (DR7), DRB1*1101 (DR11), DRB1*1301 (DR13), DRB1*1501 (DR15); DRB3*0101 (DRB3), HLA-DRB4*0101 (DRB4) y HLA-DRB5*0101 (DRB5); HLA-DPA1*0103/DPB1*0401 (DP401) y HLA-DPA1*0103/DPB1*0402 (DP402). Éstas se sometieron a CEA-Saclay utilizando técnicas que están bien establecidas en el laboratorio del autor de la presente invención para el análisis de otros antígenos (Texier, C., et al., HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. J Immunol, 2000. 164(6): págs. 3177-84).

Los experimentos de unión se repitieron en tres ocasiones separadas para confirmar los resultados. Los resultados se expresaron como la CI50 nm y como la proporción de unión de cada péptido en comparación con un péptido de referencia (también escrutado en este análisis) con una unión por afinidad elevada conocida para cada alelo de MHC concreto.

Las razones de unión de menos de 20 se consideran indicativas de unión de alta afinidad y las razones de 21-100, indicativas de una unión moderada. Los datos previos indicaban que los epítomos de las células T importantes solo raramente tenían afinidades de unión fuera de estas ventanas, aunque existen excepciones.

En referencia a la Figura 4, se muestran los datos de los estudios de unión generados. Estos datos muestran la razón de la concentración inhibidora del 50% (CI50) del péptido de ensayo en comparación con la concentración de unión del 50% del péptido de control, a la molécula del MHC de clase II en investigación.

5) Análisis funcional *in vitro* – Respuestas inmunitarias de células mononucleares de sangre periférica

Los estudios descritos anteriormente identificaron que una amplia gama de péptidos unidos al menos a una molécula del MHC de clase II, aunque un número limitado mostró una unión promiscua. Basándose en estos estudios, el número de péptidos para el futuro estudio se redujo de 53 a 30. Los 23 péptidos que mostraron poca o ninguna unión significativa al MHC de clase II, esto es, la razón de su afinidad de unión con respecto al péptido de control fue >100, no se estudiaron más. Esto se realizó con el fin de limitar la cantidad de sangre que se requería de cada paciente en estudio.

La presencia de linfocitos específicos para cualquier péptido dado se determinó utilizando Elispot para interferón γ y con 500.000 células mononucleares de sangre periférica por pocillo por cuadruplicado. En resumen, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron a partir de sangre completa heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad. Estas se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo completo (que contenía suero AB al 10%). Las células se cultivaron con péptidos individuales en placas Elispot para interferón γ y de 96 pocillos, (Mabtech, Nacka Strand, Suecia) en 100 μ l de medio completo, con péptido a una concentración de 4 μ g y 20 μ g/ml. La frecuencia de células productoras de interferón γ se evaluó mediante Elispot, como se muestra en la Figura 7 para un solo paciente del ejemplo. La frecuencia y la especificidad de las respuestas específicas para el péptido se compararon después entre los individuos de los grupos sensibilizados y no sensibilizados.

6) Reclutamiento de sujetos para el estudio

Los sujetos pacientes se reclutaron de la lista de espera para trasplantes renales del University Hospital of Birmingham. Los pacientes en diálisis del University Hospital of Birmingham se propusieron inicialmente, siguiendo las pautas de aprobación del comité ético de investigación local. Los sujetos que estaban recibiendo tratamiento con inmunosupresores o que tenían la hemoglobina < 10 g/dl fueron excluidos. Habiendo obtenido el consentimiento informado completo, se obtuvieron 50 ml de sangre venosa en el momento de una venisección rutinaria.

El tipo de HLA determinado mediante técnicas moleculares convencionales fue asequible para cada sujeto a partir de una evaluación clínica rutinaria por parte del West Midlands Blood Transfusion Service Immunogenetics Laboratory. Este laboratorio caracterizó las especificidades de los anticuerpos anti-HLA utilizando técnicas basadas en la citometría de flujo convencional incluyendo el uso de cuentas monoespecíficas, dentro del contexto de la práctica clínica rutinaria y proporcionó información histórica relevante sobre las especificidades de los anticuerpos para los respectivos sujetos.

Resultados

El autor de la presente invención examinó 5 grupos de pacientes resumidos en la siguiente Tabla.

Tabla 3 – Grupos de Pacientes

Estado de anticuerpos anti-HLA del paciente	Tipo de HLA del paciente	
	A2+	A2-
Sensibilizado con anti-HLA A2		12/15 (Grupo 1)
Sensibilizado sin anti-HLA A2	0/6	1/5
	(Grupo 2)	(Grupo 3)
No sensibilizado	1/6	2/8
	(Grupo 4)	(Grupo 5)

La presencia o ausencia de anticuerpos se determinó utilizando técnicas de citometría de flujo, en fase sólida convencionales ("Luminex™"). El denominador de cada grupo identifica el número de pacientes estudiados y el numerador, el número de cada grupo que respondió al menos a 1 péptido.

En el grupo 1, 10 pacientes respondieron a p20/21. Este procede de la región altamente polimórfica de HLA-A2. Los péptidos íntimamente solapantes se han eluido de DR1 de HLA de linfocitos B humanos, esto es, se ha demostrado que es una proteína endógena "procesada naturalmente" y presentada. También se ha identificado un péptido más grande que contiene estas secuencias como un epítipo restringido DR15 en un paciente que rechazó un riñón positivo para A2.

En el grupo 1: 10 pacientes respondieron a péptidos derivados de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana que muestran un polimorfismo muy limitado. Estos péptidos fueron muy comúnmente p39 (192-206), p50/51(268-284) y p52/53 (280-296), aunque un pequeño número de otros sitios también dio como resultado respuestas que incluían a p40 (202-216) y p45/46 (239-256). Estos péptidos no han sido identificados previamente como epítipos de células T. En dos de los pacientes, algunos de los péptidos $\alpha 3$ /transmembrana eran epítipos autólogos, por ejemplo el paciente 1 es positivo para A68 y por lo tanto comparte las secuencias de p39, p52/53 con HLA-A2.

Referente a la Figura 5, se muestra la secuencia del péptido 39. El círculo a mano izquierda muestra los tipos de HLA en los que la secuencia de la región homóloga es compartida con HLA-A2 y el círculo a mano derecha, aquellos tipos de HLA en los que la región homóloga es diferente de HLA-A2, y los dos aminoácidos en los cuales difieren (alanina por prolina en 193 y valina por isoleucina en 194).

Referente a la Figura 6, se muestran las secuencias de los péptidos p50 y p51. El círculo a mano izquierda muestra los tipos de HLA en los cuales la secuencia de la región homóloga es compartida con HLA-A2 y los otros círculos, aquellos en los que la región homóloga es diferente de HLA-A2, y los aminoácidos en los cuales difieren, (prolina por leucina en 276, para A1, A3, A11, A30, A36 etc.).

Referente a la Figura 7, se muestran las secuencias de los péptidos p52 y p53. El círculo a mano izquierda muestra los tipos de HLA en los cuales la secuencia de la región homóloga es compartida con HLA-A2 y los otros círculos, aquellos en los que la región homóloga es diferente de HLA-A2, y los aminoácidos en los cuales difieren, (fenilalanina por leucina en 294 para A1, A3, A11, A30, A36 etc.).

En el grupo 2: no hubo respuesta.

En el grupo 3: 1/5 pacientes elaboraron una respuesta a los péptidos de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana. De nuevo esto es coherente con la hipótesis de que es probable que los pacientes sensibilizados a otro HLA-A, no a HLA-A2 elaboren respuestas a las secuencias compartidas de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana.

En el grupo 4: 1/6 pacientes elaboraron una respuesta. Esta es una auto-respuesta a p39, 50/51, 52/53 y p11. Semejante respuesta también se ha observado en 1/6 de los controles normales "sin diálisis".

En el grupo 5: 2/8 elaboraron una respuesta a p39 o p50/51 y p52/53. Estos pacientes habían recibido transfusiones previas y por lo tanto podían haber sido sensibilizados a nivel de linfocitos T sin producir anticuerpo anti-HLA.

Pacientes del Ejemplo

Referente a la Figura 8, se muestra un recuento Elispot de células reactivas a péptidos/500.000 PBMC. La concentración de péptido fue de 20 $\mu\text{g/ml}$. Los datos demuestran que este individuo, que ha elaborado elevados niveles de anticuerpo anti-HLA durante aproximadamente 10 años, sobre la base de un embarazo y una transfusión previas, elabora respuestas de elevada frecuencia a p20, p39 y una mezcla de p52 y p53. Su tipo de tejido es A1,68; B37,44; C6,7 DR10,11. Por consiguiente, el paciente respondió a la región altamente polimórfica y en particular a una secuencia con los residuos 105-121 de la secuencia de HLA-A2 cubierta por p20 y 21, que el autor de la presente invención demostró que se unía promiscuamente al MHC de clase II. Ella también respondió a los péptidos de la región $\alpha 3$ y transmembrana de HLA-A2, cuyas propiedades se han descrito anteriormente. En efecto en su caso, estas respuestas son autorreactivas debido a que estas secuencias son compartidas con HLA-A68. La respuesta del control positivo es al derivado de proteína purificado de Mycobacterium tuberculosis (PPD) y la del control negativo al medio solo.

Resumen

En resumen, los resultados demuestran que los péptidos de polimorfismo limitado de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana inducen frecuentemente una respuesta inmunitaria. Ésta es normalmente alogénica, pero algunas veces es autoinmunitaria, en su especificidad. La asociación de las respuestas a estos péptidos con sensibilización a HLA-A2 implica que son relevantes para la formación de anticuerpos anti-HLA. También constituyen epítomos presentados indirectamente que es probable que dirijan el rechazo a través de mecanismos de lesión mediados por células T. Puesto que estos péptidos son tan ampliamente expresados, son las dianas ideales para la des-sensibilización terapéutica. Además, los análogos de péptidos descritos en la presente memoria que comprenden una o dos sustituciones de aminoácidos proporcionan una representación casi completa de HLA-A.

Además, cada uno de los péptidos preferidos de acuerdo con la invención puede ser expresado por muchas otras moléculas de HLA-A, y no solo por HLA-A2. Por lo tanto, las ventajas de utilizar tales péptidos en los métodos de acuerdo con la invención, y en particular para usos en la predicción del rechazo de injertos, pueden ser mucho más amplias que para el antígeno HLA-A2 solamente.

Sin estar ligado a ninguna hipótesis, se sugiere que se puede utilizar una pequeña mezcla o "cóctel" de péptidos, variantes o análogos de acuerdo con la invención para detectar las respuestas de las células T a la mayor parte de las moléculas del MHC de clase I, y por lo tanto permitir una determinación más exacta de si un paciente está en riesgo o no de rechazar un injerto.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

Diseño de péptidos

Se diseñaron 60 péptidos solapantes, de 15 o 16 aminoácidos de longitud, con el fin de proporcionar una cobertura óptima de HLA-A*020101 para supuestos epítomos de células T, utilizando el programa Tepitope (33). La solubilidad de los péptidos se predijo utilizando el programa de www.expasy.org. Los péptidos se sintetizaron (NeoMPS, Strasbourg, Francia) utilizando la química de Fmoc como se ha descrito previamente, pero de los diseñados, solamente 53 se pudieron elaborar. La biotinylation de los péptidos de control se logró mediante la reacción con ácido biotinil-6-aminocaproico (Fluka Chimie, St. Quentin Fallavier, Francia) en el extremo NH_2 de la molécula. Todos los péptidos se purificaron mediante HPLC en fase inversa sobre una columna Vydac C 18, y su calidad se evaluó mediante espectrometría de masas por electropulverización y HPLC analítica.

Purificación de Moléculas HLA-DR

Las moléculas HLA-DR se purificaron a partir de líneas celulares de EBV homocigotas para HLA mediante

cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo monoclonal anti-DR L-243, acoplado a gel con proteína A-Sepharose CL 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, Francia) como se ha descrito previamente (Texier et al., J Immunol 2000; 164(6):3177-84).

5 Análisis de unión del péptido HLA-DR

La unión de los péptidos a diferentes moléculas de HLA-DR se llevó a cabo en un análisis competitivo como se ha descrito previamente (Texier et al., Eur J Immunol 2001;31(6):1837-46). Se utilizaron péptidos de control biotinilados que se unen bien a la molécula del MHC de clase II en investigación (véase la Figura 9) y péptidos de ensayo titulados en el análisis de unión con el MHC de clase II inmovilizado, purificado. La unión máxima se determinó incubando el péptido biotinilado con la molécula del MHC de clase II en ausencia de competidor. Los datos se expresan como la concentración de péptido que evitó la unión del 50% del péptido marcado (CI50). Una razón de CI50 del péptido de control con respecto al péptido de ensayo de < 20 se consideró una unión de alta afinidad y una de 20-100 una de afinidad moderada.

15 Población del estudio

Este estudio se llevó a cabo con la aprobación del comité de ética de la investigación de South Birmingham. Todos los sujetos estuvieron en diálisis en el University Hospital of Birmingham o en el St James Hospital, Leeds. Las muestras de sangre se obtuvieron en heparina a partir de pacientes en diálisis en el momento de la venipunción rutinaria. Los genotipos de HLA se determinaron utilizando técnicas moleculares convencionales en el National Blood Service Laboratory, Birmingham, Reino Unido, a partir de las cuales estuvieron disponibles los historiales de formación de aloanticuerpos para cada sujeto, se escrutaron para determinar la citotoxicidad convencional, la citometría de flujo y, desde 2004, análisis en fase sólida.

Los pacientes se excluyeron basándose en la anemia (Hb <10 g/dl) o si habían recibido fármacos inmunosupresores en los 3 meses de la investigación. Los sujetos se dividieron en 5 grupos basándose en el tipo de tejido y el historial de síntesis de anticuerpos anti-HLA (véase la Tabla 4).

30 Tabla 4 – Grupos de pacientes

Grupo 1	HLA-A2 negativo con anticuerpos anti HLA para HLA-A2
Grupo 2	HLA-A2 negativo con anticuerpos anti HLA para ningún HLA-A2
Grupo 3	HLA-A2 negativo sin historial de formación de anticuerpos anti-HLA
Grupo 4	HLA-A2 positivos con anticuerpos anti HLA para ningún HLA-A2
Grupo 5	HLA-A2 positivo sin historial de formación de anticuerpos anti-HLA

Análisis de Inmunoabsorción con Enzima Ligada-Spot

Se aislaron las PBMC a partir de la sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll antes de su uso. Las células viables se enumeraron mediante exclusión por azul de tripan. Se utilizó un análisis Elispot para interferón γ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mabtech, Nacka Strand, Suecia). Se añadieron un total de 5×10^5 PBMC a cada pocillo, en un volumen final de 100 μ l de "medio completo": 95% de medio RPMI 1640 (Sigma, Poole, UK)/5% de suero AB humano (PAA Laboratories, Somerset, Reino Unido), con L-glutamina y penicilina/estreptomicina (Sigma) junto con el péptido a una concentración final de 4 μ gml⁻¹ o 20 μ gml⁻¹. Los péptidos se utilizaron o bien individualmente o bien en pares si las secuencias estaban compensadas por 2 aminoácidos.

Los pocillos de control negativo contenían PBMC respondedoras más medio solo. Los pocillos de control positivos contenían PPD (SSI, Copenhagen, Dinamarca) a una concentración final de 10 μ gml⁻¹, toxoide del tétanos (Calbiochem, Merck Biosciences, Reino Unido) a 1 μ g/ml, o por último un control positivo (basado en anti-CD3) suministrado por el fabricante del análisis Elispot. Las PBMC se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 horas, a continuación se descartaron y la placa se lavó 6 veces con PBS. Después las placas se incubaron a la temperatura ambiente durante 2 horas con el reactivo de detección de una etapa (anticuerpo monoclonal de detección 7-B6-1 conjugado con fosfatasa alcalina, preparado diluyendo 1:200 en PBS filtrado que contenía suero de ternera fetal al 0,5% (Sigma). A continuación se descartó y las placas se lavaron 5 veces con PBS. Se añadió el sustrato de fosfatasa alcalina cromogénico listo para usar filtrado ((nitroazul de tetrazolio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP/NBT-plus)) proporcionado por el fabricante a un volumen de 100 μ l/pocillo. Se dejó que las placas se revelaran y la reacción se terminó una vez que aparecieron las manchas. Las placas se lavaron exhaustivamente bajo agua potable y después se secaron al aire en la oscuridad durante al menos 12 horas antes del análisis. Después se contó el número de manchas de cada pocillo utilizando un lector de placa AID Elispot (Strassberg, Alemania). Se definió una respuesta positiva al péptido de ensayo si el número de manchas por pocillo era

significativamente mayor que el control por medio de ANOVA.

Inhibición de respuestas aloinmunitarias indirectas con anticuerpos anti-MHC de clase II

- 5 La restricción de las respuestas del MHC a los péptidos se investigó por medio de la adición de una mezcla de anticuerpo monoclonal anti-MHC clase II (Tu39, Becton Dickinson, Oxford, Reino Unido) y un anticuerpo monoclonal anti-DR (L243, Becton Dickinson) a los cultivos celulares.

Evaluación de la proliferación mediante CFSE

- 10 Las PBMC se resuspendieron a 10^6 células/ml en RPMI templado a 37°C al que se había añadido CFSE (Molecular Probes, Cambridge Biosciences) a una concentración final de 10 μ M. Esto se incubó a 37°C, 5% de CO₂ con agitación intermitente durante 10 minutos, se añadió suero AB humano (Sigma) para terminar el marcaje, y a continuación las células se lavaron dos veces. Las células se resuspendieron a $2,5 \times 10^5$ /pocillo en placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos en 200 μ l de medio completo, en ausencia o presencia de péptido de ensayo a una concentración final de 4 μ gml⁻¹ o 20 μ gml⁻¹ o PPD a 10 μ gml⁻¹, continuación se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 10 días. Se recuperaron las células de 3 o más pocillos, se lavaron dos veces y se tiñeron con anticuerpo para CD4 (SK3-PerCP, Becton Dickinson) o CD8 (SKI-PerCP, Becton Dickinson), o control de isotipo (IgG1-PerCP, Becton Dickinson). Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando el programa Winmdi 2.8 (Scripps Research), que adquiere información de un total de 50.000 células viables.

Resultados

- 25 Estudios de unión a péptidos demuestran múltiples regiones de unión promiscua a HLA-DR

Se diseñaron un total de 60, y se pudieron elaborar 53 péptidos de 15 unidades que abarcaban HLA-A2. Los otros 7 péptidos, en su mayor parte derivados de la región transmembrana, fueron insolubles y por lo tanto no se pudieron sintetizar satisfactoriamente. La afinidad de la unión del péptido a HLA-DR se muestra en la Figura 9.

- 30 Los datos demuestran que diversas secuencias muestran una unión promiscua a una gama de HLA-DR. Estas incluyen el péptido 20 (105-119), el péptido íntimamente solapante 21 (107-121) y el péptido 7 (31-45) que corresponden a las secuencias previamente referidas de los experimentos en los que el péptido se hizo eluir del MHC clase II. Resulta evidente que un gran número de epítomos diferentes de HLA-A2 se unen a MHC de clase II de diferentes especificidades (Figura 9). Esto tiene un interés particular puesto que un epítomo compuesto formado por el péptido del MHC propio derivado presentado en el contexto del MHC de clase II propio, sería un método seguro por medio del cual se definiría como propio.

- 40 Los péptidos 20 y 21 también corresponden al epítomo (92-120) reconocido por los clones de células T restringidos a DR15 generados a partir del receptor de un trasplante renal con HLA-A2 erróneo no logrado.

- 45 Basándose en el descubrimiento relativamente común de una unión de afinidad elevada o moderada al MHC de clase II, se evaluaron adicionalmente 30 péptidos en experimentos funcionales. Se utilizó un pequeño número de péptidos compensados por dos aminoácidos como una mezcla de dos péptidos, con el fin de optimizar la utilización de las PBMC.

Producción de interferón y en respuesta a péptidos de HLA-A2

- 50 Los detalles de los sujetos reclutados se muestran en la Figura 10. El número de células que producen interferón y en respuesta a PPD: 143 (15 - 422)/ 10^6 PBMC fue significativamente menor en pacientes en diálisis que han elaborado aloanticuerpos que en controles sanos (no emparejados) 337 (40 - 885)/ 10^6 PBMC ($p = 0,007$). Los controles de medio en estos sujetos variaron entre 0 - 9/ 10^6 PBMC y la respuesta máxima al péptido fue 122/ 10^6 PBMC.

- 55 El número de pacientes que respondió a al menos un péptido, evaluado mediante Elispot para interferón y se muestra en la Tabla 5. El número de pacientes que respondió al menos a un péptido derivado de HLA-A2 se muestra para cada grupo de pacientes. Los pacientes que elaboraron anticuerpo anti-HLA-A2 tienen una probabilidad significativamente mayor que otros pacientes de elaborar una respuesta indirecta a péptidos derivados de HLA-A2.

60

Tabla 5 – Resumen de los resultados en cada uno de los 5 grupos

Anticuerpo	Tipo de tejido	
	A2+	A2-
Anti-HLA con anti-A2		<i>Grupo 1</i>
		14/18
Anti-HLA sin anti-A2	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 2</i>
	1/9	3/8
Sin anti HLA	<i>Grupo 5</i>	<i>Grupo 3</i>
	1/10	2/10

En la mayor parte de los pacientes, el número de células que respondían era el más alto con el péptido a una concentración de 20 μgml^{-1} pero en un número pequeño la concentración óptima fue de 4 μgml^{-1} . En la Figura 1 se muestra la respuesta al péptido a 20 μgml^{-1} para cada individuo.

En el grupo 1 de sujetos, 14/18 pacientes elaboraron una respuesta al menos a un péptido de HLA-A2, mostrado en la Fig 1a. El número de pacientes que elaboraron una respuesta en el grupo 1 fue estadísticamente más significativo que en los otros grupos combinados ($p < 0,0001$) (aunque en comparación con el grupo 2 solo la diferencia no alcanzó significación $p = 0,08$ mediante el ensayo exacto de Fishers). La asociación de las respuestas aloinmunitarias indirectas a HLA-A2 y la formación de anticuerpo específico contra HLA-A2, es coincidente con modelos animales de formación de aloanticuerpos (Lovegrove et al., J Immunol 2001;167(8):4338-44).

Un descubrimiento menos esperado fue la observación de que aunque 12 sujetos del “grupo 1” respondieron a los péptidos de la región hipervariable $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (muy comúnmente p20 o p21), de estos sujetos, 8 también respondieron a otros péptidos de la región $\alpha 3$ y transmembrana temprana; y dos más respondieron a estos solos. Las respuestas a los péptidos de estas regiones, que sepa el autor de la presente invención, no han sido referidas previamente en estudios con seres humanos o animales. Estas secuencias tienen un polimorfismo muy limitado, son expresadas por una amplia gama de alelos como se ilustra en la Tabla 6.

Tabla 6 – Ilustración de tipos de HLA que comparten secuencias con HLA-A2 en la región de los péptidos p39, 40, 50, 51, 52 y 53

Péptido	Sitio	Secuencias	Secuencia compartida por	Y
P39	192-206	HAVSDHEATLRCWAL	A2, 25, 26, 29, 31, 32, 33, 43, 66, 68, 69, 74	A34
P40	202-216	RCWALSFYPAEITLT		A34, 80
P50	268-282	KPLTLRWEPSQPTI		A80
P51	270-284	LTLRWEPSQPTIPI		A80
P52	280-294	PTIPIVGIIAGLVLF		A3402
P53	282-296	IPIVGIIAGLVLFGA		A3402

Además, 3 pacientes del “grupo 1” elaboraron respuestas significativas a los péptidos del dominio $\alpha 3$ que estaban compartidos entre HLA-A2 y HLA-A68 propio (el sujeto 1.1 respondió a p39 y p52/53), HLA-A2 y HLA-A33 propio (el sujeto 1.10 respondió a p52/53) o HLA-A2 y HLA-A32 propio (el sujeto 1.17 respondió a p39 y p52/53).

En el “grupo 2” de sujetos, 3 pacientes respondieron a una gama de péptidos derivados de HLA-A2 (resultados no mostrados). Por ejemplo, el sujeto 2.1 respondió a los péptidos p30, p40, 45/46, 50/51 y 52/53 presentes en una gama de HLA-A diferentes (Tabla 5), que incluían el péptido de la región hipervariable p30. Se observó un patrón similar de respuesta tanto a la región hipervariable como a $\alpha 3$ y a la región transmembrana con el sujeto 2.2 y 2.3. Ninguno de estos péptidos es único para HLA-A2 de manera que los descubrimientos siguen coincidiendo con el historial de producción de anticuerpos. En el paciente 2.2 se elaboraron respuestas para las secuencias p39 y p52/53 compartidas con HLA-A68 propio.

En el “grupo 3”, 3 sujetos elaboraron respuestas significativas a péptidos derivados de HLA-A2. El sujeto 3.3 respondió a p39, 3.1 a p1/2 y p39 y 3.7 respondió a p19 y p52/53. Aunque estos pacientes no elaboraron anticuerpo anti-HLA detectable en suero actual o del historial, todos habían experimentado múltiples transfusiones y por lo tanto es posible que todos hubieran sido cebados para estos péptidos sin elaborar una respuesta humoral. En el “grupo 4” de pacientes”, un paciente 4.9, que había perdido rápidamente un trasplante renal (A3,11) para un rechazo Banff III

17 meses antes del ensayo, elaboró una respuesta inmunitaria a p39, p50/51 y p52/53 pero también a p20 que es único para HLA-A2. Un paciente, 5.1 del "grupo 5" también elaboró una respuesta autoinmunitaria a los péptidos p39, p50/51 y p52/53. También se sometió a ensayo un grupo de 15 controles normales, (denominado grupo 6) sin eventos de sensibilización previa conocidos. Un varón (6.3) elaboró una respuesta inmunitaria a péptidos derivados de HLA-A2 incluyendo p39, y p50/51 y p52/53. Este individuo era HLA-A32 positivo y estas respuestas eran por lo tanto autoinmunitarias. Ningún otro control normal elaboró una respuesta detectable.

La producción de interferón γ en respuesta a péptidos HLA-A2 es inhibida por anticuerpos contra el MHC de clase II

La restricción de las respuestas a la clase II fue inferida a partir de la inhibición de la producción de interferón γ por anticuerpos contra MHC de clase II en 3 individuos. En la Figura 11 se muestra un experimento representativo.

Proliferación de células T CD4⁺ en respuesta a péptidos HLA-A2

Se estudió la correspondencia de la proliferación con la producción de interferón γ en "controles normales": 6.3 que respondió a los péptidos p39 y p52/53 fue evaluado mediante Elispot. Como se muestra en la Figura 12, hubo una proliferación de células CD4⁺ en presencia de estos péptidos, pero no en presencia de péptidos de control que no estimulaban la producción de interferón.

Discusión

La contribución del alorreconocimiento indirecto al rechazo está bien establecida en diferentes modelos experimentales de trasplante (por ejemplo, Benichou et al., J Exp Med 1992;175(1):305-8). En estudios clínicos, se ha asociado el alorreconocimiento indirecto con el rechazo del riñón, el corazón y el pulmón. Los antígenos utilizados en estos estudios clínicos incluyen: células lisadas por congelación-descongelación, péptidos que abarcan el dominio β 1 de HLA-DR y péptidos del dominio α 1 de HLA de clase I. La alorrespuesta indirecta ha sido detectada por la producción de IL2, la proliferación celular (en cultivos primarios o secundarios) o la producción de citoquinas por medio de Elispot.

En estudios tanto experimentales como clínicos se ha referido frecuentemente la presencia de un único epítipo "inmuno-dominante", pero estos descubrimientos pueden ser determinados mediante diseño experimental, tal como el uso de cultivos secundarios para detectar respuestas después de la expansión preliminar del número de linfocitos T in vitro. De hecho, se pueden detectar múltiples epítipos utilizando estos métodos pero en diferentes momentos después del trasplante. Además en modelos animales de trasplante resulta evidente que puede haber un reconocimiento de múltiples epítipos aparte del epítipo "proliferativamente inmuno-dominante"; y estas respuestas pueden incluir epítipos crípticos propios.

El uso de la técnica de Elispot permite la detección de linfocitos T específicos de antígenos presentes a frecuencias relativamente bajas, en cultivos primarios. Se ha permitido la evaluación del alorreconocimiento indirecto en pacientes en lista de espera para trasplante renal. En particular el autor de la presente invención analizó las respuestas inmunitarias de pacientes que elaboraron aloanticuerpos de especificidad conocida contra HLA-A2. La frecuencia de respuestas que observó el autor de la presente invención es coincidente con las observadas en receptores de trasplante renal estimulados con péptidos de 20 unidades derivados de HLA-DR del donante evaluados de un modo similar por el Elispot para interferón γ . Estas son del mismo orden de magnitud que las frecuencias referidas a partir de receptores de trasplante renal estimulados por productos lisados de PBMC del donante mediante síntesis de ADN en análisis de dilución limitante y receptores de trasplante de pulmón con bronquiolitis obliterante estimulados por uno o dos péptidos con el dominio α 1 (derivados de A1, A2, B8 y B44) también analizados mediante síntesis de ADN en dilución limitante en otro estudio. En este estudio se utilizó un péptido de 25 unidades: 60-84 del dominio α 1 de HLA-A2, pero el autor de la presente invención observó una respuesta a esta región solamente en un paciente.

Los resultados demuestran que aunque las respuestas a los péptidos de la región hipervariable eran relativamente comunes, como se esperaba a partir de la bibliografía, hubo un descubrimiento inesperado de respuestas a péptidos de la región transmembrana α 3 y temprana. Como se ilustra en la Tabla 6, las secuencias de péptidos tales como p39, p40, p50/51 y p52/53 están ampliamente representadas en HLA-A y en aquellos en los que estas secuencias no están presentes hay comúnmente un polimorfismo de un único o dos aminoácidos que incluye la mayoría de los otros tipos. Estos péptidos se pudieron describir por lo tanto como "epítipos de células T públicos", cuya implicación es que la exposición a una molécula de HLA puede dar como resultado el cebado de linfocitos T que responden a una gama de otros miembros de la familia de HLA-A o viceversa. Puesto que estos epítipos son distintos de los reconocidos por el anticuerpo, este es un mecanismo potencial para la disminución de la supervivencia de los injertos en pacientes sensibilizados, con independencia de la detección de anticuerpos específicos del donante. De un modo similar sugiere un mecanismo por medio del cual la transfusión de sangre podría influir en las respuestas de anticuerpos anamnésicas, con independencia de la presencia de un epítipo de célula B reconocido.

Puesto que las secuencias identificadas como "epítomos de células T públicos" en HLA-A2 muestra solamente un polimorfismo muy limitado, es posible que una porción de la respuesta alógena presente reacción cruzada con el péptido propio, como han informado Benichou y col. para la respuesta inmunitaria a péptidos del MHC de clase I en ratones (Tam et al., J Immunol 1996;156(10):3765-71); y esta posibilidad está bajo investigación. Por supuesto, numerosas respuestas descritas en la Fig. 2 son realmente autoinmunitarias, puesto que la secuencia del péptido para el cual se elabora una respuesta es compartida por HLA-A2 y el péptido propio. Esto es ilustrado por los pacientes 1.1, 1.10 y 1.17. Esto es similar a la respuesta observada por Lovegrove y col. a los epítomos crípticos propios, en un modelo de rata de rechazo asociado con la formación de aloanticuerpos (Lovegrove et al., J Immunol 2001; 167(8):4338-44).

El descubrimiento de "epítomos de células T públicos" también es relevante para el mecanismo del efecto de la transfusión sanguínea: la ventaja de la transfusión sanguínea previa sobre la supervivencia del trasplante renal, observada principalmente antes del uso generalizado de inhibidores de calcineurina. Los modelos experimentales del efecto de la transfusión sugieren que existe una inducción de las células T reguladoras específica para el aloantígeno presentado indirectamente (Kishimoto et al., J Am Soc Nephrol 2004; 15(9):2423-8). Aunque éstos generalmente refieren la tolerancia específica a los antígenos del donante, existen ahora nuevos modelos, que intentan imitar el escenario clínico, en el que las transfusiones de sangre al azar inducen células reguladoras que protegen contra el rechazo (Bushell et al., Transplantation 2003;76(3):449-55) aparentemente sin depresión no específica de la respuesta inmunitaria (Bushell et al., J Immunol 2005;174(6):3290-).

En seres humanos el efecto de la transfusión de sangre requiere que el donante de sangre y el receptor compartan al menos un HLA-DR y un número relativamente pequeño de transfusiones para un máximo beneficio. Esto, a pesar de la amplia gama de aloantígenos que los receptores pueden encontrar. Esto se podría justificar por la inducción de células reguladoras restringidas propias, específicas para los epítomos alógenos que son todavía comunes a una amplia gama de donantes. Si bien no es imprescindible que éstas sean del MHC, los "epítomos de células T públicos" descritos anteriormente satisfacen las propiedades necesarias para justificar la mayor parte de la evidencia disponible.

Una segunda característica de muchos de los epítomos de péptidos derivados de HLA-A2 es que se unen con cierta promiscuidad al MHC de clase II, y por consiguiente inducen respuestas en una proporción relativamente alta de pacientes sensibilizados. Esto se verificó tanto para los epítomos únicos para HLA-A2 como para los "epítomos de células T públicos". Esto, en parte, permitió extraer conclusiones del estudio de sólo 55 sujetos no seleccionados para el tipo de HLA. Las implicaciones son sin embargo más amplias con respecto al uso potencial de dichos péptidos en los protocolos de desensibilización.

Ha habido un interés desde hace mucho tiempo en la modulación del rechazo por parte de los péptidos derivados de aloantígenos. Estos efectos son generalmente específicos del antígeno que si se trasladan al entorno clínico limitarían la utilidad de tal enfoque. Por consiguiente, estos péptidos derivados de HLA que han estimulado el mayor interés han afectado a vías independientes de reconocimiento de antígenos basadas en TCR convencionales. Esto es distinto de muchos modelos animales de tolerancia inducida por péptidos en los que hay evidencia de especificidad de antígeno a través de la inducción de células T reguladoras. Las propiedades exhibidas por los epítomos de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana, es decir que son tanto públicos como promiscuos, identifican candidatos ideales con los cuales explorar la inmunoterapia de péptidos en el trasplante. La inducción de la actividad de las células T reguladoras, por ejemplo, ha sido referida en pacientes alérgicos tratados con protocolos de desensibilización de péptidos.

En resumen, la identificación de alo-epítomos indirectos de las regiones $\alpha 3$ y transmembrana del MHC de clase I tiene implicaciones importantes para la respuesta inmunitaria alógena, su regulación y el desarrollo de la terapia específica de antígenos.

Ejemplo 3

El autor de la presente invención comparó la secuencia de algunos de los alo-epítomos de 15 unidades identificados en los Ejemplos 1 y 2 con las secuencias correspondientes en los otros polipéptidos HLA. El autor de la presente invención identificó de este modo alo-epítomos adicionales. Los resultados se muestran en las Figuras 13 a 16.

Ejemplo 4

En un estudio preliminar, el autor de la presente invención ha sometido a ensayo las respuestas de células T a péptidos HLA de clase I en dos individuos con Enfermedad de Injerto Contra Anfitrión (EICAc) que han recibido trasplantes de médula ósea. Los péptidos sometidos a ensayo son los mostrados en la Tabla 7. Para todos los péptidos de la Tabla 7, el sufijo "a1" indica que un péptido es un "análogo 1" del péptido numerado correspondiente.

Las respuestas a cada péptido se determinó mediante análisis ELISPOT para determinar la producción de interferón-gamma como se describe en el Ejemplo 1. Los péptidos se sometieron a ensayo a una concentración final de $20 \mu\text{gml}^{-1}$. Los resultados se muestran en las Figuras 17 y 18.

5

Tabla 7

Péptido	Posición en HLA-A2	Secuencia de aminoácidos															
P1	3-17	H	S	M	R	Y	F	F	T	S	V	S	R	P	T	R	
P2	5-19	M	R	Y	F	F	T	S	V	S	R	P	T	R	T	E	
P11	57-71	P	E	Y	w	D	T	E	T	R	K	V	K	A	H	S	
P19	101-115	C	D	V	T	S	D	W	R	F	L	R	T	Y	H	Q	
P20	105-119	S	D	W	R	F	L	R	T	Y	H	Q	Y	A	Y	D	
P21	107-121	W	R	F	L	R	T	Y	H	Q	Y	A	Y	D	T	K	
P25	121-135	K	D	Y	I	A	L	K	E	D	L	R	S	W	T	A	
P29	136-150	A	D	M	A	A	Q	T	T	K	H	K	W	E	A	A	
P30	145-159	H	K	W	E	A	A	H	V	A	E	Q	L	R	A	Y	
P32	154-168	E	Q	L	R	A	Y	L	E	T	T	C	V	E	W	L	
P34	163-177	T	C	V	E	W	L	R	R	Y	L	E	N	T	K	E	
P35	165-179	V	E	W	L	R	R	Y	L	E	N	T	K	E	T	L	
P39	192-206	H	A	V	S	D	H	E	A	T	L	R	C	W	A	L	
P39a1	192-206	H	P	I	S	D	H	E	A	T	L	R	C	W	A	L	
P40	202-216	R	C	W	A	L	S	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	
P40a1	202-216	R	C	W	A	L	T	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	
P45	239-253	T	T	F	Q	K	W	A	A	V	V	V	P	S	T	Q	
P46	241-256	F	Q	K	W	A	A	V	V	V	P	S	T	Q	E	Q	R
P45a1	239-253	T	T	F	Q	K	W	A	A	V	V	V	P	S	T	E	
P46a1	241-256	F	Q	K	W	A	A	V	V	V	P	S	T	E	E	Q	R
P45a2	239-253	T	T	F	Q	K	W	A	S	V	V	V	P	S	T	Q	
P46a2	241-256	F	Q	K	W	A	S	V	V	V	P	S	T	Q	E	Q	R
P50	268-282	K	P	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	I	
P51	270-284	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	I	P	I	
P50a1	268-282	K	P	L	T	L	R	W	E	L	S	S	Q	P	T	I	
P51a1	270-284	L	T	L	R	W	E	L	S	S	Q	P	T	I	P	I	
P52	280-294	P	T	I	P	I	V	T	I	I	A	T	L	V	L	F	
P53	282-296	I	P	I	V	T	I	I	A	T	L	V	L	F	T	A	
P52a1	280-294	P	T	I	P	I	V	T	I	I	A	T	L	V	L	L	
P53a1	282-296	I	P	I	V	T	I	I	A	T	L	V	L	L	T	A	

Ejemplo 5

En un estudio preliminar adicional, el autor de la presente invención sometió a ensayo las respuestas de células T a los péptidos de HLA de clase I en tres individuos con nefropatía crónica del aloinjerto (CAN). Los péptidos sometidos a ensayo se muestran en la Tabla 8.

10

Para todos los péptidos de la Tabla 8, los sufijos de los números de péptidos indican variantes o análogos de un

péptido dado, con los cambios de la secuencia original destacados en **negrita** o *cursiva*. En particular, el sufijo "a1" indica que un péptido es un "análogo 1" del péptido numerado correspondiente. Del mismo modo, "a2" indica un "análogo 2" y así sucesivamente. El sufijo "(ser)" indica que un péptido es una variante en la que un residuo de cisteína del péptido numerado correspondiente ha sido remplazado por serina. El sufijo "(b)" indica que un péptido es una variante en el que un residuo de cisteína en el péptido numerado correspondiente ha sido reemplazado por ácido aminobutírico. El sufijo "RK" indica que un residuo de Lisina y uno de arginina (en ese orden, extremo N-C) se han añadido en el extremo N del péptido numerado correspondiente, y un residuo de arginina y uno de lisina (en ese orden, extremo N-C) se han añadido al extremo C como se muestra.

Tabla 8

Péptido	Secuencia	Pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
p39	192-206	1	H	A	V	S	D	H	E	A	T	L	R	C	W	A	L	Tra30
p39a1	192-206	2	H	P	I	S	D	H	E	A	T	L	R	C	W	A	L	Tra31
p39a2	192-206	3	H	P	V	S	D	H	E	A	T	L	R	C	W	A	L	Tra32
p39 (ser)	192-206	4	H	A	V	S	D	H	E	A	T	L	R	S	W	A	L	Tra33
p39a1 (ser)	192-206	5	H	P	I	S	D	H	E	A	T	L	R	S	W	A	L	Tra34
P39 (b)	192-206	6	H	A	V	S	D	H	E	A	T	L	R	b	W	A	L	Tra36
p39a1 (b)	192-206	7	H	P	I	S	D	H	E	A	T	L	R	b	W	A	L	Tra37
p40	202-216	8	R	C	W	A	L	S	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	Tra39
p40a1	202-216	9	R	C	W	A	L	G	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	Tra40
p40 (ser)	202-216	10	R	S	W	A	L	S	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	Tra41
p40a1 (ser)	202-216	11	R	S	W	A	L	G	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	Tra42
p50	268-282	12	K	P	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	I	Tra45
p50a1	268-282	13	K	P	L	T	L	R	W	E	L	S	S	Q	P	T	I	Tra46
p50a2	268-282	14	K	P	L	T	L	R	W	E	L	S	S	Q	P	T	V	Tra47
p51	270-284	12	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	I	P	I	Tra48
p51a1		13	L	T	L	R	W	E	L	S	S	Q	P	T	I	P	I	Tra49
p51 a2	270-284	14	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	V	P	I	Tra50
p52	280-294	15	P	T	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	F	Tra01
p52a1	280-294	16	P	T	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	L	Tra05
p52a2	280-294	17	P	T	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	L	Tra07
p52a3	280-294	18	P	T	V	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	L	Tra09
p52 rk	280-294	19	R	P	T	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	Tra02
p52a1 rk	280-294	20	R	P	T	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	Tra06
p52a2 rk	280-294	21	R	P	T	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	Tra08
p52a3 rk	280-294		R	P	T	V	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	Tra010
p53	282-296	15	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	F	G	A	Tra13
p53a1	282-296	16	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	L	G	A	Tra18
p53a2	282-296	17	I	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	L	A	V	Tra23
p53a3	282-296	18	V	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	L	A	V	Tra28
p53 rk	282-296	19	R	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	F	G	A	Tra14
p53a1 rk	282-296	20	R	P	I	V	G	I	I	A	G	L	V	L	L	G	A	Tra19
p53a2 rk	282-296	21	R	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	L	A	V	Tra24
p53a3 rk	282-296		R	P	V	P	I	V	G	I	I	A	G	L	A	V	L	Tra29

Las respuestas para cada péptido se determinaron mediante análisis ELISPOT para determinar la producción de interferón-gamma como se describe en el Ejemplo 1. Los péptidos se sometieron a ensayo a una concentración final de $20\mu\text{gml}^{-1}$. Los resultados se muestran en las Figuras 19 a 21.

5 Ejemplo 6

El autor de la presente invención llevó a cabo un estudio más amplio que sometía a ensayo las respuestas de las células T a péptidos de HLA clase I en 40 individuos que habían recibido trasplantes de médula ósea (TMO). Veintiuno de estos individuos fueron diagnosticadas de EICAc crónica (serie C de pacientes). Diecinueve individuos fueron se clasificaron como carentes de EICAc (series B de pacientes). Se sometieron a ensayo 30 individuos "normales" sin historial de alosensibilización para establecer un punto de referencia (serie P de control).

Las respuestas para cada péptido se determinaron mediante análisis ELISPOT para la determinación de la producción de interferón-gamma como se describe en el Ejemplo 1. Los péptidos se sometieron a ensayo a una concentración final de $20\mu\text{gml}^{-1}$. Los números de ELISPOT fueron comparados entre diferentes poblaciones por medio de la estadística U de Mann Whitney. El número de respondedores en cada grupo se comparó mediante la prueba exacta de Fisher. Los resultados para cada serie se muestran en las Figuras 22A a C. Los resultados de los pacientes individuales para las Series C y B se muestran como paneles separados en las Figuras 23A y B, respectivamente.

20 Resultados

La producción de interferón- γ en respuesta a los péptidos derivados de HLA se asocia con un historial de EICAc

Las respuestas al péptido se muestran como: (número medio de manchas por pocillo con el péptido especificado - número medio de manchas con control de medio). El control de medio en los pacientes estaba en el intervalo 0-6 por pocillo. Un resultado positivo se definió como un número medio de manchas por pocillo (corregido para el control de medio) $> 7,5$. Esto se define por la distribución de frecuencia de las respuestas en los pocillos que contienen péptido de la serie P de control (que se muestra en la Figura 22A). Esto permite el hecho de que se realicen comparaciones múltiples (21 combinaciones de péptidos diferentes) en cada individuo. En la población de control, no hubo diferencia significativa entre las respuestas en los pocillos que contenían péptido y la respuesta en los pocillos con control de medio (datos no mostrados). El umbral de 7,5 manchas por pocillo proporciona una probabilidad de $< 0,001$ de lograr un resultado positivo por casualidad.

El número de individuos que respondían al menos a un péptido en el análisis ELISPOT fue de 13/21 pacientes de la serie C (receptores de TMO con EICAc; Figura 22B), 1/19 pacientes de la serie B (receptores de TMO sin EICAc; Figura 22C) y 1/30 individuos de la serie P de control (Figura 22A). El número de respondedores en serie C fue estadísticamente significativamente mayor que los otros grupos ($p < 0,0002$ para la serie B de pacientes y $p < 0,0001$ para la serie P de control).

Los controles de medio en receptores de TMO variaron entre 0-6 manchas/pocillo (5×10^5 PBMC). No hubo una diferencia significativa en la respuesta a la estimulación por anti-CD3 con respecto al número de células que responden contadas mediante ELISPOT para interferón γ (serie C de pacientes = 393/pocillo, series B de pacientes = 520/pocillo y la serie P de control = 318/pocillo).

La frecuencia de células que respondían a PPD en la serie P de control fue $142/5 \times 10^5$, significativamente más alta que la respuesta en la serie C ($49,6/5 \times 10^5$, ($p < 10^{-7}$)) y serie B ($19,8/5 \times 10^5$, ($p < 10^{-4}$)). Tres individuos de la serie C y 6 de la serie B elaboraron una respuesta no detectable a PPD, mientras que los 37 individuos de la serie P de control elaboraron una respuesta significativamente por encima del fondo. La respuesta a PPD en la serie C fue ligeramente mayor que en la serie B; se aproximó a la significación estadística ($p = 0,05$)

Estos datos demuestran que la detección de la producción de interferón gamma por PBMC tras la incubación con péptidos derivados de HLA es un evento raro en los controles normales en las condiciones experimentales descritas anteriormente. También demuestran que la producción de interferón gamma (γ) por PBMC a partir de receptores de TMO incubadas con péptido derivado de HLA está asociada con un diagnóstico de EICAc. Es poco probable que las diferencias observadas sean justificadas por discrepancias en el número de linfocitos con el potencial para la síntesis de interferón y dados los resultados similares en los 3 grupos después de la estimulación con anti-CD3. Aunque hubo una respuesta ligeramente superior al antígeno nominal (PPD) en los receptores de TMO con EICAc (serie C) que en los que no la tienen (serie B), es poco probable que la regulación al alza no específica de la producción de interferón γ y asociada con la enfermedad justifique los resultados ya que los controles normales elaboran excelentes respuestas a PPD sin elaborar una respuesta al péptido.

La respuesta a los péptidos individuales a menudo tuvo una alta frecuencia en la serie C en comparación con los pacientes en diálisis alosensibilizados y los receptores de trasplantes renales (datos no mostrados).

Las respuestas de los receptores de TMO fueron en gran parte autoinmunitarias, esto es a péptidos cuyas secuencias son comunes al donante de TMO y el receptor de HLA. Esto contrasta con los hallazgos en los pacientes alosensibilizados en espera de trasplante renal y en modelos animales de trasplante en los que hay generalmente una mezcla de respuestas aloinmunitarias y autoinmunitarias.

5

Respuestas inmunitarias a análogos peptídicos con el dominio $\alpha 3$

Las secuencias de aminoácidos de HLA-A y B indican que para cualquier epítipo peptídico con el dominio $\alpha 3$, el número de alelos es pequeño (entre 2 y 4) con cambios relativamente limitados en la secuencia. Por ejemplo p39 y p39a1 cubren todo el repertorio de moléculas de HLA-A (y están presentes en la mayor parte de HLA-B), difieren en la secuencia en dos aminoácidos consecutivos 193 y 194. Sin embargo, los pacientes de la serie C respondieron sobre todo a uno u otro péptido, al menos con respecto a un análisis in vitro de la producción de interferón y policlonal. Esto se observa en cuatro pacientes (C6, C7, C12 y C20). En contraste, dos pacientes (C21 y C22) demostraron respuestas significativas (aunque inferiores) a p39a, así como a p39. Esta observación también es válida para otros péptidos con el dominio $\alpha 3$ para los que se identificó una respuesta.

10

15

En resumen, este estudio identifica las respuestas inmunitarias a epítipos peptídicos derivados de HLA de pacientes con EICAc. Por lo tanto existe una clara correlación entre EICA y las respuestas inmunitarias a epítipos peptídicos derivados de HLA en pacientes trasplantados. Por lo tanto, los péptidos representan biomarcadores que pueden ser utilizados para las pruebas pre-trasplante de los donantes y la prueba post-trasplante de los receptores.

20

Ejemplo 7

Tras el estudio preliminar del Ejemplo 5, el autor de la presente invención ha llevado a cabo un estudio más amplio de prueba de respuestas de células T a péptidos de HLA clase I en 100 individuos que han recibido trasplantes renales más de un año antes del estudio. Los pacientes no fueron seleccionados sobre la base de la función renal. Se sometieron a ensayo 30 individuos "normales" sin historial de alosensibilización como controles. Los péptidos sometidos a ensayo se muestran en la Tabla 8. Las respuestas para cada péptido se determinaron mediante análisis ELISPOT para determinar la producción de interferón gamma como se describe en el Ejemplo 1. Los péptidos se sometieron a ensayo a una concentración final de $20\mu\text{gml}^{-1}$.

25

30

Sobre la base de sus respuestas, los pacientes se dividieron en tres grupos:

- Rojo (recuento de ELISPOT medio con al menos un péptido > 15) (25 pacientes)
- Ámbar (recuento de ELISPOT medio con al menos un péptido entre 7,5 y 15) (29 pacientes)
- Verde (recuento de ELISPOT medio con cualquier péptido < 7,5) (46 pacientes).

35

Los resultados se muestran en las Figuras 24A (control), 24B (Verde), 24C (Ámbar) y 24D (Rojo). Como se muestra, la respuesta a los péptidos de la invención se asocia con la aloinmunitad, sobre la base de una comparación de las respuestas en los receptores de trasplante con el grupo de control.

40

Para proporcionar información adicional sobre la asociación entre la disfunción del injerto y las respuestas a los péptidos, se analizaron adicionalmente los datos de los grupos de pacientes mediante la comparación del número de pacientes de los grupos Verde y Rojo, que se habían sometido a una biopsia para determinar la disfunción crónica del aloinjerto. Esto se define como cualquier biopsia renal que tienen lugar más de 1 año después del trasplante y se utiliza aquí como un indicador de daño incipiente o rechazo del injerto. Se determinó que solo 20% de los pacientes del grupo Verde se había sometido a una biopsia en comparación con 33% en el grupo de Rojo ($p > 0,001$). Por lo tanto hay una clara correlación entre la lesión crónica del injerto que indicaba la necesidad de una investigación adicional y la posterior detección de respuestas inmunitarias a epítipos peptídicos derivados de HLA en pacientes con trasplante renal. Por lo tanto, los péptidos representan biomarcadores que pueden ser utilizados para las pruebas de pre-trasplante de los donantes y las pruebas post-trasplante de los receptores.

45

50

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Circassia Limited
The University of Birmingham
<120> ANÁLISIS PROGNÓSTICO
<130> N103191A WO SA/GML
<150> PCT/GB07/01690
<151> 2007-05-09
<150> GB 0715949.4
<151> 2007-08-15
<150> GB 0722378.7
<151> 2007-11-14
<160> 132

55

60

<170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

5

```

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

260      265      270
Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275     280     285
Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
290     295     300
Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
305     310     315     320
Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
325     330     335
Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
340     345     350
Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
355     360     365
    
```

10

<210> 2
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

15

ES 2 425 486 T3

Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly
1				5					10					15	
Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln
			20					25					30		
Phe	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Gln	Arg	Met	Glu	Pro	Arg
		35					40					45			
Ala	Pro	Trp	Ile	Glu	Gln	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asp	Gly	Glu	Thr
	50					55					60				
Arg	Lys	Val	Lys	Ala	His	Ser	Gln	Thr	His	Arg	Val	Asp	Leu	Gly	Thr
65					70					75				80	
Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Val	Gln
				85					90					95	
Arg	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp	Val	Gly	Ser	Asp	Trp	Arg	Phe	Leu	Arg	Gly
			100					105					110		
Tyr	His	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Gly	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Lys	Glu
		115					120					125			
Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Lys
	130					135					140				
His	Lys	Trp	Glu	Ala	Ala	His	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu
145					150					155					160
Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys
				165					170					175	
Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Thr	Asp	Ala	Pro	Lys	Thr	His	Met	Thr	His	His
		180						185					190		
Ala	Val	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Ser	Phe
		195					200					205			
Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln
	210					215					220				
Thr	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr
225					230					235					240
Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg
				245					250					255	
Tyr	Thr	Cys	His	Val	Gln	His	Glu	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu
		260						265					270		
Arg	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Ile	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	Ile
		275					280					285			
Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Ala
	290					295					300				
Ala	Val	Met	Trp	Arg	Arg	Lys	Ser	Ser	Asp	Arg	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr
305					310					315					320
Ser	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Asp	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Asp	Val	Ser	Leu
				325					330					335	
Thr	Ala	Cys	Lys	Val											
				340											

5

<210> 3
 <211> 3287
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

```

ggattcccca actccgcagt ttctttttctc cctctcccaa cctatgtagg gtcctttcttc 60
ctggatactc acgacgcgga cccagttctc actcccatcg ggtgtcgggt ttccagagaa 120
gccaatcagt gtcgtcgcgg tcgcggttct aaagtccgca cgcacccacc gggactcaga 180
ttctccccag acgcccagga tggccgtcat ggcgccccga accctcgtcc tgctactctc 240
gggggctctg gccctgacct agacctgggc ggggtgagtgc ggggtcggga gggaaacggc 300
ctctgtgggg agaagcaacg ggcccgcctg gcgggggcgc aggaccggg aagccgcgcc 360
gggaggaggg tcgggcgggt ctacgccact cctcgtcccc aggtctcac tccatgaggt 420
atctcttcac atccgtgtcc cggcccggcc gcggggagcc ccgcttcac gcagtgggct 480
acgtggacga cagcagttc gtgcggttcg acagcgacgc cgcgagccag aggatggagc 540
cgcgggcgcc gtggatagag caggaggggc cggagtattg ggacggggag acacggaaag 600
tgaaggccca ctcacagact caccgagtgg aacctgggac cctgcgcggc tactacaacc 660
agagcgaggc cgtgagtga ccccgcccg ggcgcaggt cagcacctc catccccac 720
ggacgggcca ggtcgccac agtctccggg tccgagatcc gccccgaagc cgcgggaccc 780
cgagaccctt gccccgggag agggccaggg gcctttaccc ggtttcattt tcagtttagg 840
ccaaaaatcc ccccaggttg gtgcggggcg ggcggggctc gggggaccgg gctgaccgcg 900
gggtccgggc caggttctca caccgtccag aggatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac 960
tggcgcttcc tccgcgggta ccaccagtac gcctacgacg gcaaggatta catcgccctg 1020
aaagaggacc tgcgtctctg gaccgcggcg gacatggcag ctcagaccac caagcacaag 1080
tgggaggcgg ccatgtgtgc ggagcagttg agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag 1140
tggctccgca gatacctgga gaacgggaag gagacgtgc agcgcacggg taccaggggc 1200
cacggggcgc ctccctgatc gcctgtagat ctcccggtc ggcctccac aaggagggga 1260
gacaattggg accaacacta gaatatcgcc ctccctctgg tcctgaggga gaggaaatcct 1320
cctgggtttc cagatcctgt accagagagt gactctgagg ttccgcccctg ctctctgaca 1380
caattaaggg ataaaaatctc tgaaggaaatg acgggaagac gatccctcga atactgatga 1440
gtggttccct ttgacacaca caggcagcag ccttggggcc gtgacttttc ctctcaggcc 1500
ttgttctctg cttcacactc aatgtgtgtg ggggtctgag tccagcactt ctgagtcctt 1560
cagcctccac tcaggtcagg accagaagtc gctgttccct cttcaggggac tagaattttc 1620
cacggaatag gagattatcc caggtgcctg tgtccaggct ggtgtctggg ttctgtgctc 1680
ccttccccat ccaggtgtc ctgtccattc tcaagatagc cacatgtgtg ctggaggagt 1740
gtcccatgac agatgcaaaa tgccctgaat atctgactct tcctgacaga cgcacccaaa 1800
acgcataatga ctcaccacgc tgtctctgac catgaagcca ccctgagggtg ctgggcccctg 1860
agcttctacc ctgcggagat cacactgacc tggcagcggg atggggagga ccagaccag 1920
gacacggagc tcgtggagac caggcctgca ggggatggaa ccttccagaa gtgggcccgt 1980
gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg 2040
cccaagcccc tcaccctgag atggggtaag gagggagacg ggggtgtcat gtcttttagg 2100
gaaagcagga gcctctctga cctttagcag ggtcagggcc cctcaccttc cctcttttc 2160
ccagagccgt cttcccgacc caccatcccc atcgtgggca tcattgctgg cctggttctc 2220
tttgagctg tgatcactgg agctgtggtc gctgctgtga tgtggaggag gaagagctca 2280
ggtggggaag ggtgaaggg tgggtctgag atttctgtc tcaactgagg ttccaagacc 2340
caggtagaag tgtgccctgc ctgcttactg ggaagcacca cccacaatta tgggcctacc 2400
cagcctgggc cctgtgtgac agcacttact cttttgtaaa gcacctgtta aaatgaagga 2460
cagatttatc accctgatta cagcgggtgat gggacctgat cccagcagtc acaagtca 2520
ggggaaggtc cctgaggacc ttccaggagg cggttggtcc aggaccaca cctgctttct 2580
tcatgtttcc tgatcccgcc ctgggtctgc agtcacacat ttctggaaac ttctctgagg 2640
tccaagactt ggaggttcct ctaggacctt aaggccctga ctcctttctg gtatctcaca 2700
ggacattttc ttcccacaga tagaaaagga gggagctact ctcaggctgc aagtaagtat 2760
gaaggaggct gatgcctgag gtccttggga tattgtgtt gggagcccat gggggagctc 2820
accaccccca caattcctcc tctagccaca tcttctgtgg gatctgacca ggttctgttt 2880
ttgttctacc ccaggcagtg acagtgccca gggctctgat gtgtctctca cagcttgtaa 2940
aggtgagagc ctggaggggc tgatgtgtgt tgggtgttgg gcggaacagt ggacacagct 3000
gtgctatggg gtttctttcc attggatgta ttgagcatgc gatgggctgt ttaaagtgtg 3060
accctcact gtgacagata cgaatttgtt catgaatatt ttttctata gtgtgagaca 3120
gctgccttgt gtgggactga gaggcaagag ttgttcctgc ccttcccttt gtgacttgaa 3180
gaaccctgac tttgtttctg caaaggcacc tgcattgtgc tgtgtctgtg taggcataat 3240
gtgaggagggt ggggagacca cccaccccc atgtccacca tgaccct 3287

```

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 4

His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg
 1 5 10 15

<210> 5

5 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 5

 Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu
 1 5 10 15

 10 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 6

 Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
 1 5 10 15

 20 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 7

 Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val
 1 5 10 15

 30 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 8

 Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp
 1 5 10 15

 40 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 9

 Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp
 1 5 10 15

 50 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 10

 Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met
 1 5 10 15

ES 2 425 486 T3

5
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 11

 Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
 1 5 10 15
 10
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 12
 15
 Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro
 1 5 10 15
 20
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 13
 25
 Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu
 1 5 10 15
 30
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 14
 35
 Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser
 1 5 10 15
 40
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 15
 45
 Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly
 1 5 10 15
 50
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 16
 55
 His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
 1 5 10 15
 37

ES 2 425 486 T3

5 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 17

 Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
 1 5 10 15
 10
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 18
 15
 Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His
 1 5 10 15
 20
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 19
 25
 Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
 1 5 10 15
 30
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 20
 35
 His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp
 1 5 10 15
 40
 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 21
 45
 Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu
 1 5 10 15
 50
 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 22
 55
 Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln
 1 5 10 15
 38

ES 2 425 486 T3

5
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 23

 Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp
 1 . 5 10 15
 10
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 24
 15

 Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 20
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 25
 25

 Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala
 1 5 10 15
 30
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 26
 35

 His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
 1 5 10 15
 40
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 27
 45

 Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 50
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 28
 55

 Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala
 1 5 10 15
 60
 39

ES 2 425 486 T3

5
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 29

 Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
 1 5 10 15

 10
 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 30

 Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr
 1 5 10 15

 20
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 31

 Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His
 1 5 10 15

 30
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 32

 Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala
 1 5 10 15

 40
 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 33

 His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr
 1 5 10 15

 50
 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 34

 Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys
 1 5 10 15
 40

ES 2 425 486 T3

5 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 35

 Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
 1 5 10 15
 10
 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 36
 15
 Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr
 1 5 10 15
 20
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 37
 25
 Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
 1 5 10 15
 30
 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 38
 35
 Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu
 1 5 10 15
 40
 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 39
 45
 Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp
 1 5 10 15
 50
 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 40
 55
 Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His
 1 5 10 15
 41

ES 2 425 486 T3

5 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 41

10 Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu
 1 5 10 15

15 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 42

20 His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu
 1 5 10 15

25 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 43

30 Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 1 5 10 15

35 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 44

40 Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp
 1 5 10 15

45 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 45

50 Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr
 1 5 10 15

55 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 46

Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu
 1 5 10 15
 42

ES 2 425 486 T3

5
 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 47

 Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln
 1 5 10 15
 10
 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 48
 15
 Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln
 1 5 10 15
 20
 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 49
 25
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
 1 5 10 15
 30
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 50
 35
 Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys
 1 5 10 15
 40
 <210> 51
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 51
 45
 Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 50
 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 52
 55
 Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 43

5
 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 53

 Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile
 1 5 10 15
 10
 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 54
 15

 Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile
 1 5 10 15
 20
 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 55
 25

 Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe
 1 5 10 15
 30
 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 56
 35

 Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
 1 5 10 15
 40
 <210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 57
 45

 Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro
 1 5 10 15
 Ile
 50
 <210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 58
 55

ES 2 425 486 T3

Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala

<210> 59
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 59

Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu
 1 5 10 15
 Gln Arg

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 60

His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 61

His Pro Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 62

His Pro Val Ser Asp His Glu Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 63

Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 425 486 T3

<220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 64

	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu	Arg	Trp	Glu	Leu	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Ile	Pro
	1				5					10					15	
5	Ile															

<210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 65

	Pro	Thr	Ile	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	Ile	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Gly
	1				5					10					15	
15	Ala															

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 66

	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu	Lys	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Ile	Pro
	1				5					10					15	
25	Ile															

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 67

	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu	Arg	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Val	Pro
	1				5					10					15	
35	Ile															

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 68

	Lys	Pro	Leu	Thr	Leu	Arg	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Val	His
	1				5					10					15	
45	Ile															

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 69

ES 2 425 486 T3

Pro Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 70

Pro Thr Val His Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 71

Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Val

<210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 72

Pro Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Val

<210> 73
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 73

Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Arg

<210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 74

Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu
 1 5 10 15
 Gln Arg

<210> 75

	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 75	
	cactccatga ggtatttctt cacatccgtg tcccgcccg gccgc	45
10	<210> 76	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 76	
	atgaggtatt tctcacatc cgtgtcccgg cccggccgcg gggag	45
20	<210> 77	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 77	
	cacaagtggg aggcggccca tgtggcggag cagtgagag cctac	45
30	<210> 78	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 78	
	cacgtgtct ctgacatga agccaccctg agtgctggg ccctg	45
40	<210> 79	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 79	
	agtgctggg ccctgagctt ctaccctgcg gagatcacac tgacc	45
50	<210> 80	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 80	
	aagcccctca ccctgagatg ggagccgtct tccagccca ccatc	45
60	<210> 81	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 425 486 T3

<223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 81

5 ctcaccctga gatgggagcc gtcttccag cccaccatcc ccatc 45

<210> 82
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 82

15 cccaccatcc ccatcgtggg catcattgct ggcctggtc tcttt 45

<210> 83
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 83

25 atccccatcg tgggcatcat tgctggcctg gttctcttg gagct 45

<210> 84
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 84

35 ggaaccttc agaagtggc ggctgtggtg gtccttctg gacag 45

<210> 85
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 85

45 ttccagaagt gggcggctgt ggtggtgct tctggacagg agcagaga 48

<210> 86
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 86

55 aagcccctca cctgagatg ggagccgtct tccagccca ccatcccat c 51

<210> 87
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 87

cccaccatcc ccatcgtggg catcattgct ggcctggtc tcttggagc t 51

5	<210> 88 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 88	
10	ggaaccttcc agaagtgggc ggctgtggtg gtgccttctg gacaggagca gaga	54
15	<210> 89 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 89	
20	tcggactggc gcttcctccg cggtaccac cagtacgcct acgac	45
25	<210> 90 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 90	
30	tggcgcttcc tccgcgggta ccaccagtac gcctacgacg gcaag	45
35	<210> 91 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 91	
40	caccccatct ctgacatga ggccaccctg aggtgctggg ccctg	45
45	<210> 92 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 92	
50	aagccctca ccctgagatg ggagccttct tcccagcca ccatcccat c	51
55	<210> 93 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 93	
60	cccacatcc ccacgtggg catcattgct ggctgtgtc tcctggagc t	51
	<210> 94 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 425 486 T3

<220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 94

5 aggtgctggg ccctgggctt ctacctgcg gagatcacac tgacc 45
 <210> 95
 <211> 54
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 95

15 ggaaccttc agaagtgggc ggctgtggtg gtccttctg gagaggagca gaga 54
 <210> 96
 <211> 54
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 96

25 ggaaccttc agaagtgggc gtctgtggtg gtccttctg gacaggagca gaga 54
 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 97

35 His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Ser Trp Ala Leu
 1 5 10 15
 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 98

45 His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Ser Trp Ala Leu
 1 5 10 15
 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 99

55 His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Abu Trp Ala Leu
 1 5 10 15
 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 425 486 T3

<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 100

His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Abu Trp Ala Leu
1 5 10 15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 101

Arg Ser Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 102

Arg Ser Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 103

Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Leu Ser Ser Gln Pro Thr Ile
1 5 10 15

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 104

Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Leu Ser Ser Gln Pro Thr Val
1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 105

Leu Thr Leu Arg Trp Glu Leu Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile
1 5 10 15

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 425 486 T3

```

<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 106

 5      Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Val Pro Ile
      1          5          10          15

<210> 107
<211> 15
<212> PRT
10      <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 107

15      Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu
      1          5          10          15

<210> 108
<211> 15
<212> PRT
20      <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 108

25      Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu
      1          5          10          15

<210> 109
<211> 15
<212> PRT
30      <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 109

35      Pro Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu
      1          5          10          15

<210> 110
<211> 19
<212> PRT
40      <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 110

45      Lys Arg Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu
      1          5          10          15
      Phe Arg Lys

<210> 111
<211> 19
<212> PRT
50      <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 111

55      Lys Arg Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu
      1          5          10          15
      Leu Arg Lys

<210> 112

```

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 112

 Lys Arg Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Arg Lys ,

 10 <210> 113
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 113

 Lys Arg Pro Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Arg Lys

 20 <210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 114

 Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

 30 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 115

 Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val
 1 5 10 15

 40 <210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 116

 Val Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val
 1 5 10 15

 50 <210> 117
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 117

ES 2 425 486 T3

Lys Arg Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Arg Lys
 <210> 118
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 118
 Lys Arg Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Arg Lys
 <210> 119
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 119
 Lys Arg Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Arg Lys
 <210> 120
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 120
 Lys Arg Val Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Arg Lys
 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 121
 Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 1 5 10 15
 Lys
 <210> 122
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> reference peptide HA 306-318
 <400> 122
 Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10
 <210> 123

5 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> reference peptide YKL
 <400> 123

 Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala
 1 5 10

 10 <210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> reference peptide MT 2-16
 <400> 124

 Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
 1 5 10 15

 20 <210> 125
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> reference peptide B1 21-36
 <400> 125

 Thr Glu Arg Val Arg Leu Val Thr Arg His Ile Tyr Asn Arg Glu Glu
 1 5 10 15

 30 <210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> péptido de referencia A3 152-166
 <400> 126

 Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Val Glu
 1 5 10 15

 40 <210> 127
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> péptido de referencia LOL 191-210
 <400> 127

 Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Pro Phe Thr
 20

 50 <210> 128
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> péptido de referencia E2/E168
 <400> 128

ES 2 425 486 T3

	Ala	Gly	Asp	Leu	Leu	Ala	Ile	Glu	Thr	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile		
	1				5					10						
	<210> 129 <211> 15 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 129															
5																
	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	
	1				5					10					15	
	<210> 130 <211> 15 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 130															
10																
	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ser	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	
	1				5					10					15	
	<210> 131 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 131															
15																
	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Glu	Gln	Arg
	1				5					10					15	
	<210> 132 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 132															
20																
	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ser	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg
	1				5					10					15	
	<210> 132 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 132															
25																
	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ser	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg
	1				5					10					15	
	<210> 132 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 132															
30																
	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ser	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg
	1				5					10					15	
	<210> 132 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 132															
35																
	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ser	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg
	1				5					10					15	
	<210> 132 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia derivada de HLA-A2 <400> 132															
40																

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar si un individuo corre el riesgo de, o está sometido a, daño o rechazo del injerto de origen inmunitario y/o daño de origen inmunitario contra tejido no injertado, en donde el injerto es un aloinjerto o un xenoinjerto, comprendiendo el método:
 - 5 (a) someter a ensayo si el individuo tiene células T que responden a un péptido de 9 a 30 aminoácidos incluyendo al menos un epítipo de células T que se une al MHC de clase II, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos contiguos del dominio $\alpha 3$ y/o del dominio transmembrana de una molécula del MHC de clase I que es reconocida por una célula T que reconoce un epítipo de una molécula del MHC de clase I; y
 - 10 (b) determinar de ese modo si el individuo corre el riesgo, o está sometido a, daño o rechazo del injerto de origen inmunitario y/o daño de origen inmunitario contra tejido no injertado.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
 - 15 - el individuo requiere o ha recibido un injerto; y/o
 - el individuo tiene o no tiene una respuesta de anticuerpo a una molécula del MHC de clase I; y/o
 - el daño o rechazo del injerto es daño o rechazo del injerto agudo o crónico; y/o
 - el daño de origen inmunitario al tejido no injertado es daño agudo o crónico.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde se mide una respuesta inmunitaria de células T a dicha molécula poniendo en contacto el péptido con células T en una muestra tomada del sujeto, en condiciones que permitan que el péptido y las células T interactúen; y determinando si cualquiera de las células T es estimulada o no y determinando de ese modo si está presente o ausente una respuesta inmunitaria de células T.
- 25 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el injerto es un injerto o trasplante de órganos, y opcionalmente en donde el órgano es pulmón, hígado, corazón, piel, médula ósea o riñón.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el individuo tiene, se sospecha que tiene, o se considera que corre el riesgo de, rechazo de injerto crónico.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el injerto es médula ósea y en donde el tejido no injertado es al menos uno seleccionado entre hígado, piel, mucosa, tracto gastrointestinal, pulmones, ojo, timo, tejido conectivo, y glándula exocrina.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el individuo tiene, se sospecha que tiene, o se considera que corre el riesgo de Enfermedad de Injerto Contra Anfitrión (EICA), particularmente EICA crónica.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula del MHC de clase I es HLA-A, HLA-B o HLA-C, y preferiblemente HLA-A2.
- 40 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se lleva a cabo como se ha definido en la reivindicación 3 y las células T están presentes en una población de PBMC aislada de una muestra de sangre o suero tomada del individuo.
- 45 10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la determinación de si las células T del individuo reconocen el péptido se lleva a cabo midiendo la producción de una citoquina por las células T.
- 50 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la citoquina es interferón gamma.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 o 11, en donde la producción de citoquina es detectada mediante un análisis ELISPOT.
- 55 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la molécula del MHC de clase I es HLA-A2, y en donde el dominio $\alpha 3$ es definido como residuos 183 a 274 del SEQ ID NO: 2, y el dominio transmembrana es definido como residuos 275 a 314 del SEQ ID NO: 2.
14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 42, 43, 48, 49, 53 a 74, 97 a 120 y 129 a 132.
- 60

Figura 1

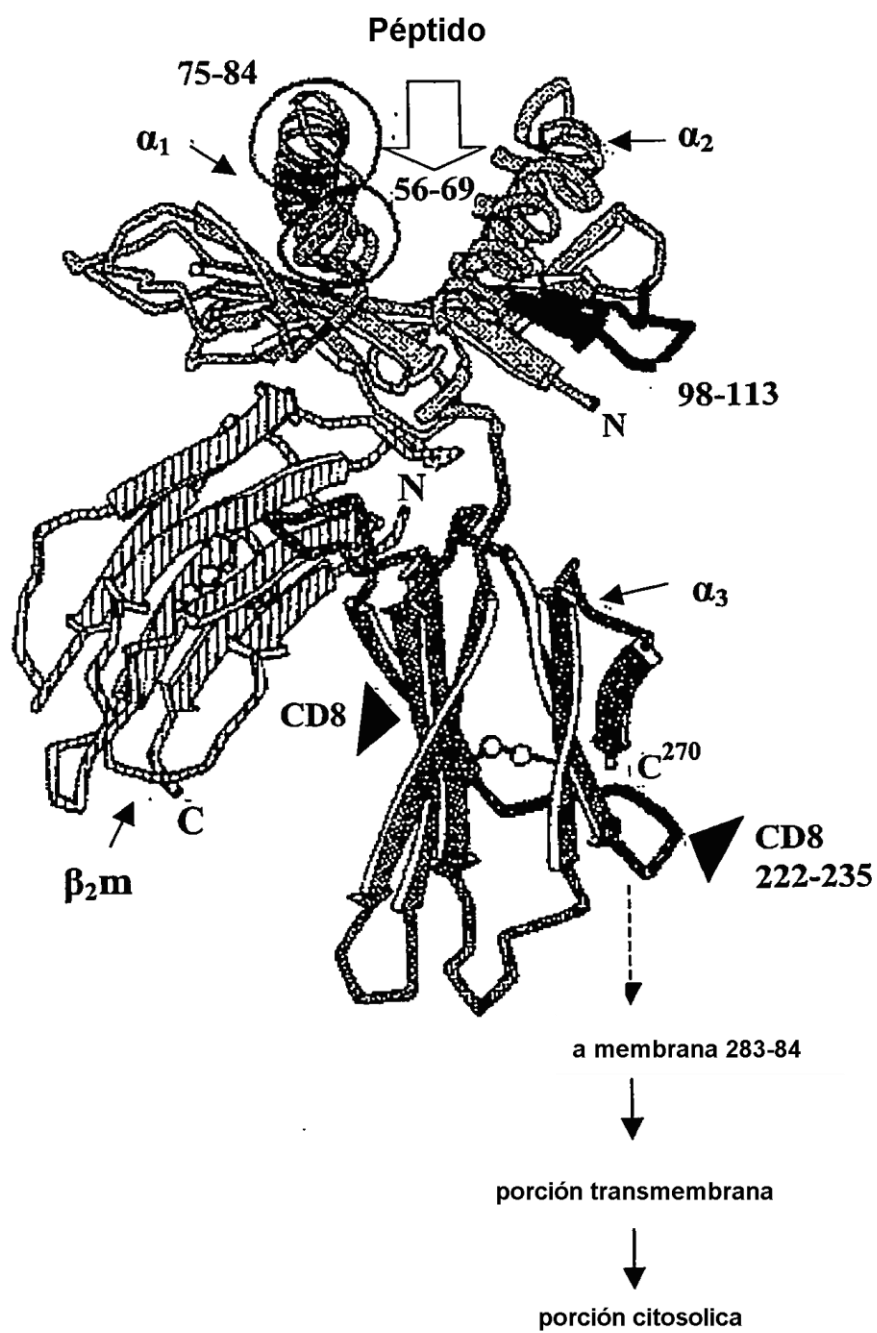


Figura 2

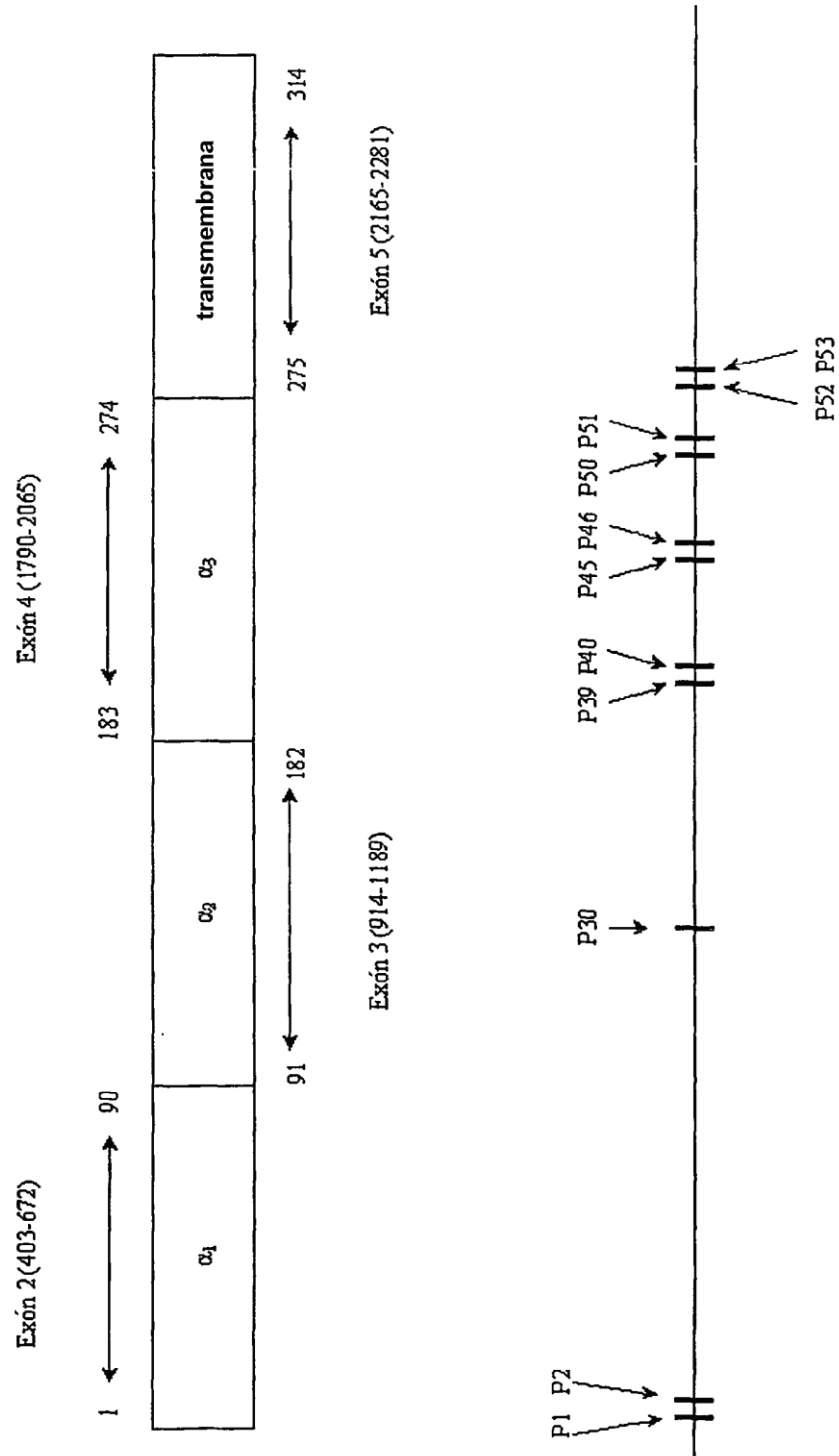


Figura 3

Péptidos	Nombre	PM	
p1	A2 3-17	1827,1	H
p2	A2 5-19	1789	M
p3	A2 10-24	1628,8	T
p4	A2 20-34	1726	P
p5	A2 23-37	1743,9	I
p6	A2 25-39	1761,9	V
p7	A2 31-45	1757,9	T
p8	A2 34-48	1763,9	V
p9	A2 42-57	1910,1	S
p10	A2 49-63	1804,9	A
p11	A2 57-71	1802	P
p12	A2 65-79	1731	R
p13	A2 74-88	1778	H
p14	A2 76-90	1684,8	V
p15	A2 79-93	1638,7	G
p16	A2 82-96	1695,8	R
p17	A2 93-107	1752,9	H
p18	A2 95-110	1931,2	V
p19	A2 101-115	1838	C
p20	A2 105-119	1976,1	S
p21	A2 107-121	1959,2	W
p22	A2 111-125	1819	R
p23	A2 114-128	1813	H
p24	A2 116-130	1776	Y
p25	A2 121-135	1808,1	K
p26	A2 124-138	1719	I
p27	A2 128-142	1664,8	E
p28	A2 131-145	1673,9	R
p29	A2 136-150	1657,9	A
p30	A2 145-159	1808	H

R E A V D D M P R R G E S L
 G G I F F S R P E G H L Q S A H Q W F Q
 P R F Q R D Q E Q D A D N Q C T S W Y A D Y L E W T A M T H A Y
 R G R T V F S M E W K V Y N Q A H G D G Y Y A K I A L R S A A T W L
 S P P D F R A R I Y V R Y N E S V S R Q Y A K I A L R S A A T W L
 V R E D Q V A Q W E K H G Y N Q S G D G L H Y A K I A L R S A A T W L
 S S G V T F D S A P P R T R G Y N Q A C V F Y Q D D I A L R S A A T W L
 T V R Y D Q S A A G P R T R G Y N Q S G D G L H Y A K I A L R S A A T W L
 F S G G D T D A R E E S T L R G Y N Q S G D G L H Y A K I A L R S A A T W L
 F T P V V D F D P Q G H L G Y N Q M G D L G Y A K I A L R S A A T W L
 Y F R A Y D R S E E D A L G T L R G Y N Q M G D L G Y A K I A L R S A A T W L
 R F S I A V V D F D M I E W K A L G T L R G Y N Q M G D L H A D I K R S A A T W L
 M Y V F I A V Y V D F F R W I Y K A L G T L R G Y N Q M G D L H A D I K R S A A T W L
 S R S R A G Q R R Q P E Y K R V D L L R Y V Q R V W F Y Y A D I K R S A A T W L
 H M T P I V T V S A P R Q P E Y K R V D L L R Y V Q R V W F Y Y A D I K R S A A T W L

Figura 3 continuación

p31	A2 150-164	1660	A	H	V	A	E	Q	L	R	A	A	Y	L	E	G	T	C
p32	A2 154-168	1809	E	Q	L	R	A	E	Q	L	R	E	G	T	C	V	E	L
p33	A2 157-171	1914	R	A	Y	L	E	G	T	C	V	E	L	E	N	G	R	Y
p34	A2 163-177	1895	T	C	V	E	W	L	R	R	Y	L	E	N	G	R	K	E
p35	A2 165-179	1905	V	E	W	L	R	R	Y	L	E	N	G	T	C	V	E	L
p36	A2 169-183	1878	R	R	Y	L	E	N	G	K	E	E	T	L	Q	R	T	D
p37	A2 177-191	1765	E	T	L	Q	R	T	D	A	P	K	T	H	M	T	H	
p38	A2 187-201	1686	T	H	M	T	H	A	V	S	D	H	E	A	T	L	L	
p39	A2 192-206	1708	H	A	V	S	D	H	E	A	T	L	R	C	W	A	L	
p40	A2 202-216	1770	R	C	W	A	L	S	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	
p41	A2 206-220	1839	L	S	F	Y	P	A	E	I	T	L	T	W	Q	R	D	
p42	A2 211-225	1762	A	E	I	T	L	T	W	Q	R	D	Q	T	G	E	D	
p43	A2 215-229	1821	L	T	W	Q	R	D	G	E	D	Q	T	Q	D	T	E	
p44	A2 228-242	1621	T	E	L	V	E	T	R	P	A	G	D	G	T	F	Q	
p45	A2 239-253	1574	G	T	F	Q	K	W	A	V	V	P	S	G	P	S	G	
p46	A2 241-256	1829	F	Q	K	W	A	A	V	V	P	S	G	Q	E	Q	Q	R
p47	A2 245-259	1607	A	A	V	V	V	P	S	G	Q	E	Q	R	Y	T	C	P
p48	A2 254-269	1921	E	Q	R	Y	T	C	H	V	Q	H	E	G	L	P	K	
p49	A2 264-278	1709	E	G	L	P	K	P	L	T	L	R	W	E	P	S	S	
p50	A2 268-282	1752	K	P	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	I	
p51	A2 270-284	1737	L	T	L	R	W	E	P	S	S	Q	P	T	I	P	I	
p52	A2 280-294	1522	P	T	I	P	I	V	G	I	A	G	L	V	L	F	F	
p53	A2 282-296	1452	I	P	L	V	G	I	I	A	G	L	V	L	F	G	A	

Figura 4

Péptidos	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
p1	2,7	26,8	0,5	6,5	0,1	2,4	11,5	>6202	12,1	0,5
p2	1,8	10,4	0,9	7,6	0,1	2,6	26,4	>6202	>3686	0,6
p3	529,2	>330	273,9	1234,4	70,5	>766	386,7	>6202	>3686	>12910
p4	768,8	38,1	>4524	131,2	275,2	>766	16,3	12,2	2263,3	97,5
p5	3570,7	1,2	1333,3	523,7	637,7	>766	67,2	3,7	>3686	103,1
p6	29250	2,2	4194,4	534,5	126,5	>766	36,7	15,2	5294,1	1186,7
p7	100	0,6	17,7	132,8	276,7	>766	4,6	28,3	96,6	200
p8	14720	5,1	169,6	828,1	2930,2	>766	>1786	166,4	>3686	461,9
p9	11402	>330	>4524	14907	700	539,9	>1786	>6202	>3686	8660,3
p10	13663	158,1	>4524	14142	2919,4	>766	1059,1	3797,8	>3686	9486,8
p11	4041,5	>330	2721,7	11212	28,9	>766	>1786	>6202	>3686	3146,4
p12	22804	>330	4303,3	82,2	>5456	2,5	>1786	>6202	227,5	1030,8
p13	115,5	>330	202	6546,5	557,7	>766	2	>6202	3321,1	1596,9
p14	170,7	>330	380,1	>18036	107,2	>766	1	>6202	>3686	1414,2
p15	372,4	>330	90,8	500	128,5	>766	0,7	>6202	>3686	79,1
p16	13,8	>330	24,7	22	219,6	>766	>1786	>6202	>3686	22,6
p17	28,9	17,6	106,1	293,9	325,7	>766	39	32,8	0,7	1602,8
p18	72,1	>330	92,2	736,8	124,7	>766	68,3	1,9	0,9	191,9
p19	10	5,5	27,2	57,6	2	769,2	13,5	>6202	1137,6	4,3
p20	0,9	94	1,4	8,9	0,1	6,5	0,4	82,9	1002,9	0,5

Figura 4 continuación

peptides	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
p21	0,6	62,3	4,6	534,5	0,9	3,1	0,3	237,4	278,7	2,2
p22	7746	31	3509,2	5957,5	121	>766	>1786	79,7	>3686	5164
p23	331,7	162,7	760,1	6733	47,3	>766	>1786	142,1	>3686	193,6
p24	28,5	>330	193,6	755,9	12,8	>766	>1786	>6202	>3686	469
p25	10,3	6	16,2	500	2,9	17,9	2,8	5304,2	1355,8	6,8
p26	123,3	16,8	195,6	139,4	317	422,1	10,6	>6202	>3686	183,8
p27	>103574	>330	>4524	>18036	>5456	>766	14,7	>6202	>3686	242,2
p28	54,8	>330	76,5	2288,7	725,5	>766	>1786	2511,5	>3686	129,1
p29	42164	>330	>4524	>18036	>5456	25,3	>1786	>6202	>3686	4,2
p30	24	52,5	5,9	67,9	26,2	>766	21,2	>6202	>3686	104,1
p31	513,8	>330	>4524	>18036	167,6	52,7	0,6	>6202	>5346	>12703
p32	51,4	5,8	74,5	26,5	28,5	>766	6,2	>6202	>5346	141,4
p33	20,3	110,9	458,3	107,7	60,3	120,7	107,4	>6202	626,2	1154,7
p34	>91287	>330	>4524	>18036	16,9	32,7	459,5	>6202	>5346	7261,8
p35	488,2	>330	>4524	>18036	17,4	52,7	5,5	>6202	>5346	>12703
p36	575	>330	1204,9	>18036	51	104,6	2017	>6202	>5346	606,2
p37	2108,2	>330	2582	557,8	>5694	>766	>2287	>6202	>5346	3446
p38	84327	>330	>4524	9561,8	>5456	>766	>2287	>6202	>5346	>12703
p39	11,3	>330	64,2	8837,2	1690,9	38,4	3,2	>6202	0,1	6495,2
p40	21,4	19,1	100	7,6	3396,8	>766	0,6	50,4	346,4	512,3
p41	40,8	>330	45,8	>18036	162,2	>766	>2287	>6202	>5346	>12703
p42	1095,4	>330	>4524	>18036	415	>766	1020,5	290,9	351,5	3750
p43	>91287	309,8	>4524	>18036	>5456	>766	>2287	254,2	>5346	>12703
p44	3651,5	>330	3027,7	385,4	605	>766	>2287	>6202	>5346	>12703

Figura 4 continuación

péptidos	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
p45	2,4	>330	4,9	4,5	23,5	>766	10,7	>6202	>5346	5,8
p46	178	26,8	16,3	118,3	43,3	>766	>2287	>6202	>5346	223,6
p47	1825,7	3,6	>4524	7521,4	4646,6	48,9	>2287	>6202	>5346	197,5
p48	1566,3	>330	2472,1	5255,4	47,9	>766	>2287	>6202	>5346	2561,7
p49	406,2	>330	24,9	12649	142,6	>766	1176,7	>6202	1500,3	605,5
p50	374,2	>330	5,8	16,5	788,7	>766	127,1	2842	264,6	458,3
p50	374,2	>330	5,8	16,5	788,7	>766	127,1	2842	264,6	458,3
p51	429	>330	24,9	12,2	>5456	>766	55,2	>6202	1150,4	3622,8
p52	15,5	>330	>4524	35,9	>5456	>766	>2287	>6202	>5346	>12703
p53	21,6	0,4	>4524	30,2	>5456	10,5	15,4	>6202	>5346	12703

Figura 5

Péptidos 39

Secuencias: 192-206

H A V S D H E A T L R C W A L

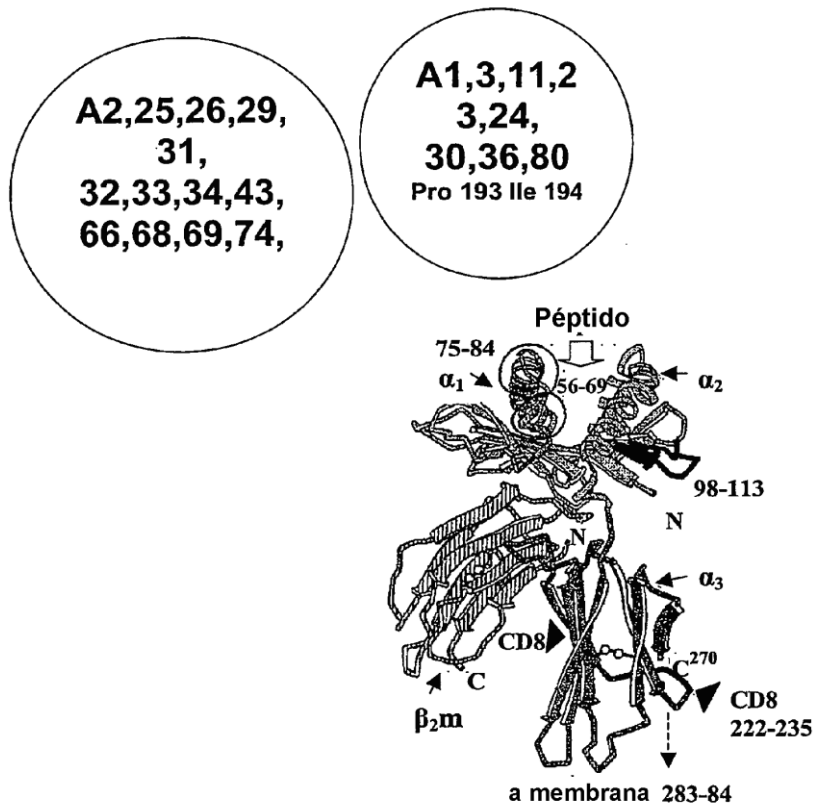


Figura 6

Péptidos 50 y 51

Secuencias: 268-282 & 270-284

K P L T L* R W* E P S S Q P T I*
L T L* R W* E P S S Q P T I* P I*

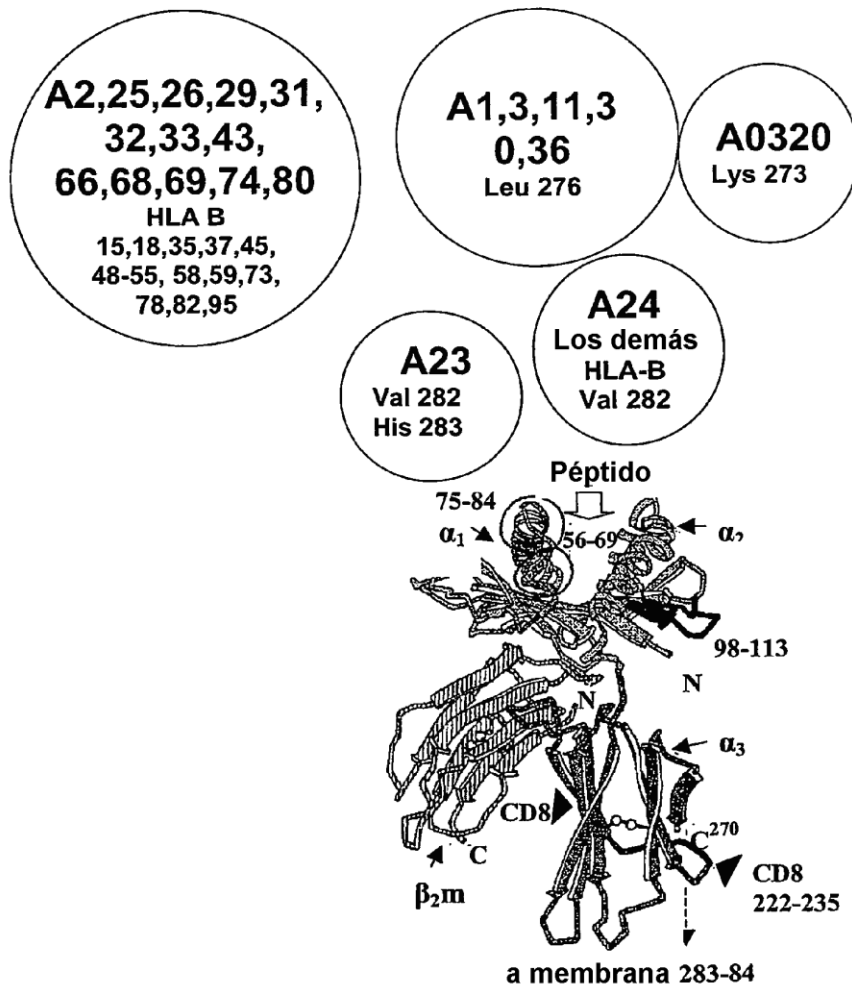


Figura 7

Péptidos 52 y 53

Secuencias: 280-294 & 282-296

P T I* P I* V* G I* I* A G L* V* L F*
I* P I* V* G I* I* A G L* V* L F* G A

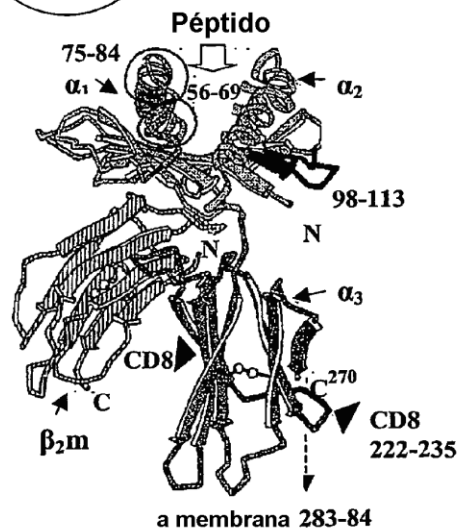
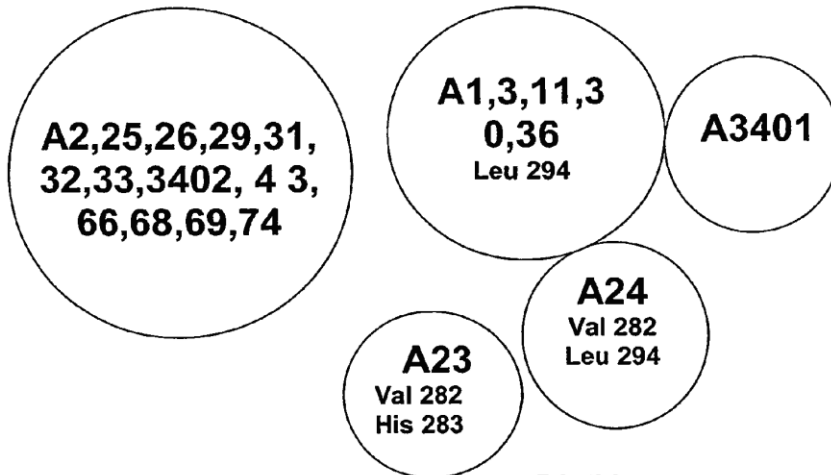


Figura 8

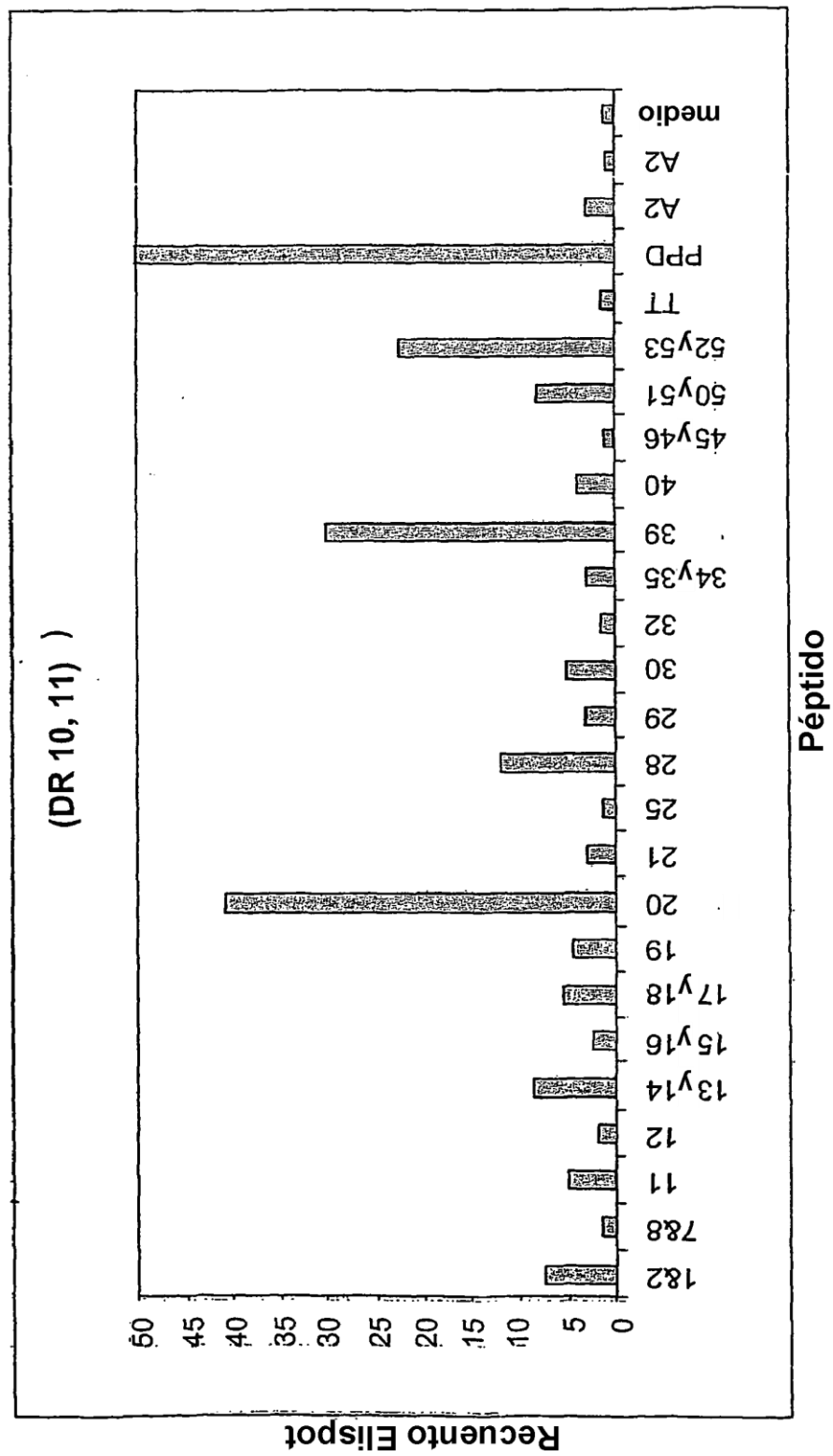


Figura 9

Alelo		DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
Peptido	Secuencia	C150									
p1*	3-17	3	7348	13	38	2	365	509	>100000	193	4
p2*	5-19	2	2837	18	45	3	399	1166	>100000	>100000	4
p3	10-24	648	>100000	5477	6928	1020	>100000	18708	>100000	>100000	>100000
p4	20-34	748	12000	>100000	850	5477	>100000	1342	196	45717	755
p5	23-37	2766	316	30984	3098	9220	>100000	2966	59	>100000	798
p6	25-39	27749	600	97468	3162	2797	>100000	1775	245	9000	9192
p7*	31-45	122	164	354	786	4000	>100000	374	456	2182	1549
p8*	34-48	13964	1396	3391	4648	58310	>100000	>100000	2683	>100000	3578
p9	42-57	10817	>100000	>100000	83666	15474	60000	33166	>100000	>100000	67082
p10	49-63	12961	49749	>100000	79373	58095	>100000	51235	75000	>100000	73485
p11	57-71	4950	>100000	63246	62929	418	>100000	>100000	>100000	>100000	24372
p12	65-79	21633	>100000	100000	486	>100000	385	>100000	>100000	2966	7984
p13*	74-88	89	>100000	4040	36742	8062	>100000	88	>100000	67082	12369
p14*	76-90	209	>100000	8832	>100000	1549	>100000	82	>100000	>100000	10954
p15*	79-93	406	>100000	1817	2958	1857	>100000	33	>100000	>100000	612
p16*	82-96	17	>100000	494	130	3175	>100000	>100000	>100000	>100000	175
p17*	93-107	35	5612	2121	1587	6481	>100000	2828	529	15	12021
p18*	95-110	88	>100000	1844	4775	1803	>100000	5612	30	19	1487
p19	101-115	9	1500	543	341	29	100000	598	>100000	51381	33
p20	105-119	1	29563	27	53	2	1000	19	1336	13077	4
p21	107-121	1	19596	92	3000	18	474	15	4709	3633	17
p22	111-125	9487	8485	81542	33437	1749	>100000	>100000	1285	>100000	40000
p23	114-128	406	51962	17664	37789	684	>100000	>100000	2291	>100000	1500
p24	116-130	35	>100000	3873	4472	184	>100000	>100000	>100000	>100000	3633
p25	121-135	10	1631	325	2958	42	2739	125	85528	27386	52
p26	124-138	151	4613	3912	825	4583	46904	469	>100000	>100000	1378

Figura 9 Continuación[illegible]

Figura 10

ID Paciente	Edad	Sexo	Trasplante previo	Transfusión previa	Tipo de HLA			Especificidades anti-HLA
					A	B	DR	
Grupo 1								
1.1	37	F	N	S	1,68	37,44	10,11	A2,3,9,11,29,33,34,66,69,74,B,C,DR
1.2	45	M	S (1)	S	23	7,72	11	A1,2,3,10,11,19,24,28,36,43,80,B,DR
1.3	42	F	S (1)	S	3,29	7,27	11,15	A1,2,9,10,11,28,32,36,43,80,B,C,DR,DQ
1.4	48	F	N	N	3,11	7,62	4,15	A2,9,28,32,B,C
1.5	42	F	S (1)	S	3,24	7,60	4,15	A1,2,10,11,19,28,36,43,B,C,DR
1.6	40	M	S (3)	S	1	8	17	A2,3,9,10,11,19,28,43,80,B,C,DR,DQ
1.7	38	M	S (1)	S	1,3	7,37	10,15	A2,B
1.8	45	F	S (1)	N	1,24	8,62	13,17	A2,3,10,11,28,30,31,32,33,74,B,C,DR,DQ
1.9	50	F	S (1)	N	33,74	18,45	1,11	A1,2,3,9,10,11,28,32,36,80,B,C,DR,DQ
1.10	50	M	S (1)	S	1,33	44,58	7,13	A2,9,28,B,C,DR
1.11	38	F	S (1)	S	11,26	18,45	15,17	A2,9,28,B,DR,DQ
1.12	47	F	N	S	1,24	37,52	15	A2,3,11,19,66,68,80,B,C
1.13	53	F	N	S	3,26	27,65	1,15	A2,9,28,B,C,DR
1.14	50	M	S (1)	N	1	8,18	17	A2,28,33,B,DR,DQ
1.15	42	M	N	S	29	7,27	8,15	A1,2,9,10,11,28,31,32,36,74,B,C
1.16	31	M	S (1)	S	11	12,44	5,11	A2,28,B
1.17	57	F	N	S	3,32	27,35	10,14	A2,9,28,B
1.18	27	M	S (2)		11,33	35,44	1,8	A1,2,9,10,19,68,B,C,DR,DQ
Grupo 2								
2.1	51	M	S (1)	S	1	57,63	13,17	A3,9,11,26,31,B,C
2.2	51	M	S (2)	S	3,68	64,57	7	A1,30,31,32,33,74,B,DR,DQ
2.3	48	F	N	N	1	8	15,17	A9,10,11,32,80,B,C,DR
2.4	37	M	S (1)	S	3,31	35,44	1,8	A1,9,10,11,28,29,36,43,80,B,C,DR,DQ
2.5	38	F	S (1)	S	1,24	55,60	7,14	A23,30,32,B,C,DR,DQ
2.6	37	M	S (1)	S	68,74	15,45	1,12	A9,B,DR
2.7	30	F	S (1)	S	23,74	35,72	11,15	A29,B
2.8	36	F	N	N	23,74	53	13,15	A26,66,B
Grupo 3								
3.1	25	M	N	S	1,11	7,55	4,15	
3.2	45	F	N	N	23	64,51	13	
3.3	34	M	N	S	1,3	7,8	3,4	
3.4	27	M	N	N	29	7,44	1,7	
3.5	33	M	N	N	24,30	57,60	4,7	
3.6	35	F	N	N	3,30	18,62	15,17	
3.7	22	M	N	N	1,3	44,51	1,8	

Figura 10 Cont.

3.8	23	F	N	N	24,26	35,51	4,11	
3.9	36	M	N	N	3,34	7,35	13,15	
3.10	18	F	N	N	11,26	13,58	15,17	
Grupo 4								
4.1	38	F	N	S	2,68	71,60	7, 17	A1,3,9,10,11,29,31,33,36,80,B
4.2	39	F	S(2)	S	2,3	39,56	11,13	A1,9,10,11,19,28,29,36,43,80,B,C,DR,DQ
4.3	45	F	S(1)	S	2,32	27,62	15	A10,11,30,31,33,36,74,80,B,C,DR,DQ
4.4	50	M	S(1)	S	2	60,44	13,15	A1,3,9,10,11,29,30,31,33,68,80,B,C,DR
4.5	50	F	S(1)	S	2,24	62,57	14,15	A1,3,10,11,19,36,43,68,74,80,C,DR,DQ
4.6	50	F	N	N	2	44	11,15	A1,32,34,66,B,DR
4.7	32	M	S(1)	S	2,30	18,60	4,17	A1,3,11,29,31,32,33,74,80,B,C,DR
4.8	30	F	S(1)	S	2,26	52,62	4	A1,3,9,11,19,35,74,80,B,C,DR,DQ
4.9	29	F	S(1)	S	2	50,37	10,17	A1,3,9,10,11,19,28,29,36,43,80,B,C,DR,DQ
Grupo 5								
5.1	41	M	N	N	1,2	8,39	4,8	
5.2	33	M	N	S	2,3	7,51	1,103	
5.3	34	M	S(1)	S	2	18,62	15,17	
5.4	49	M	N	N	2,3	37,40	10,15	
5.5	50	M	S(1)	S	2	18,57	1,7	
5.6	22	F	N	N	2,11		4	
5.7	27	M	N	N	2	18,60	1,17	
5.8	37	F	N	N	1,2	35,39	1,13	
5.9	40	M	N	N	2,68	7,27	8,15	
5.10	27	M	N	N	2	8,27	1,17	

Figura 11

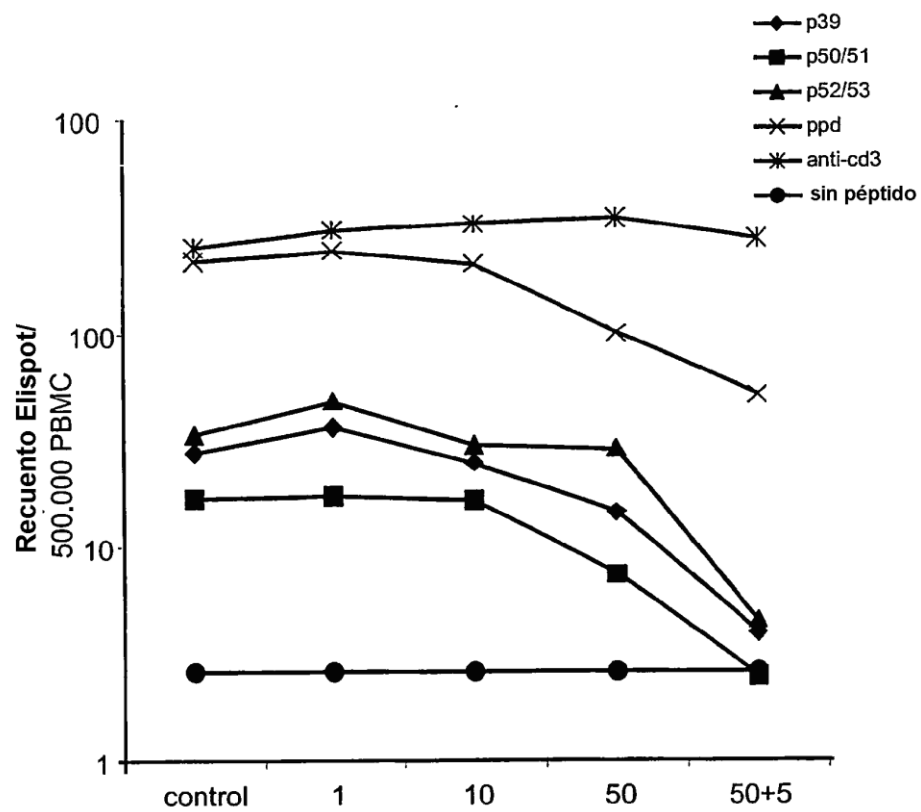


Figura 12

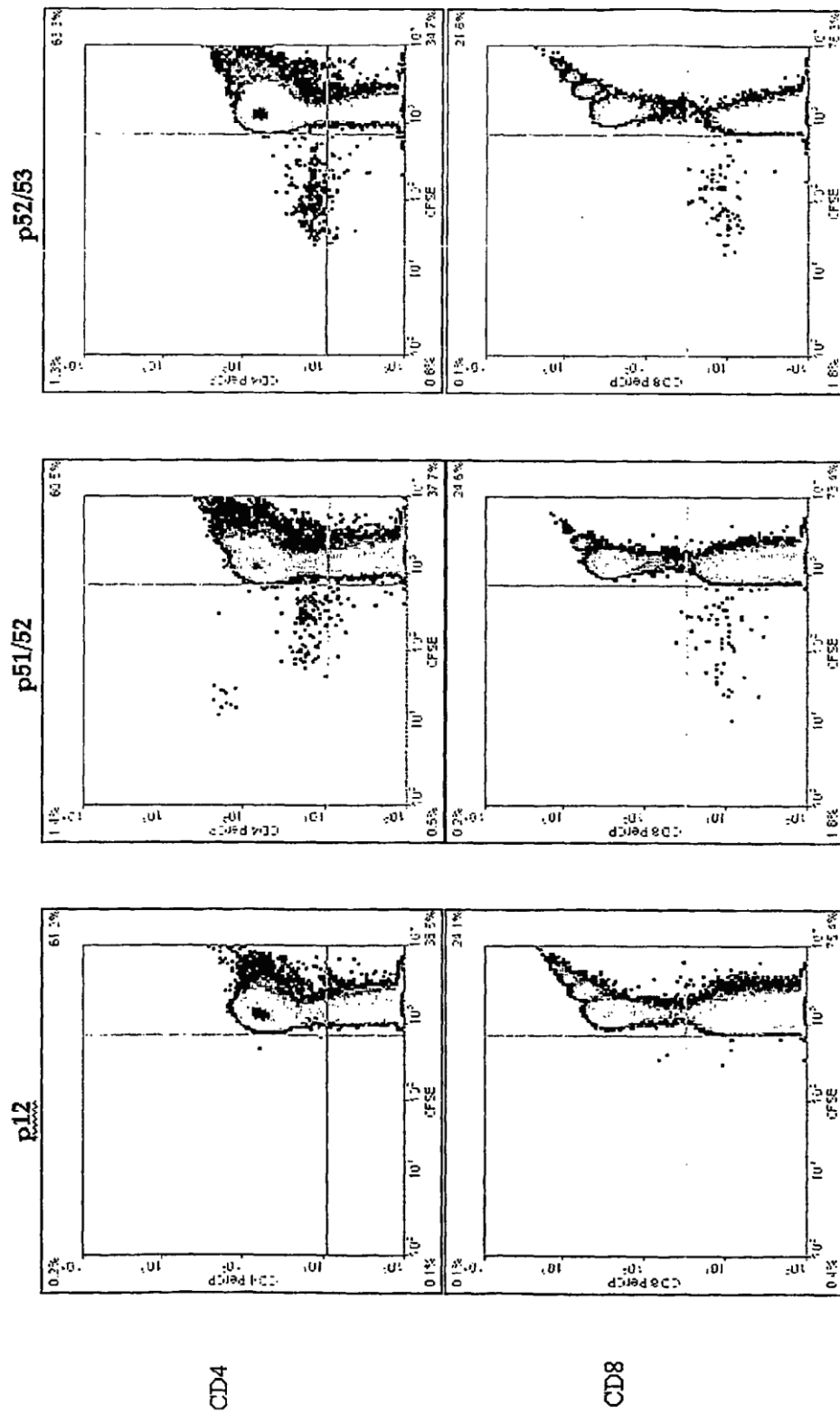


Figura 13

Péptidos 39

Secuencias: 192-206

H **A** V S D H E **A** T L R C W A L

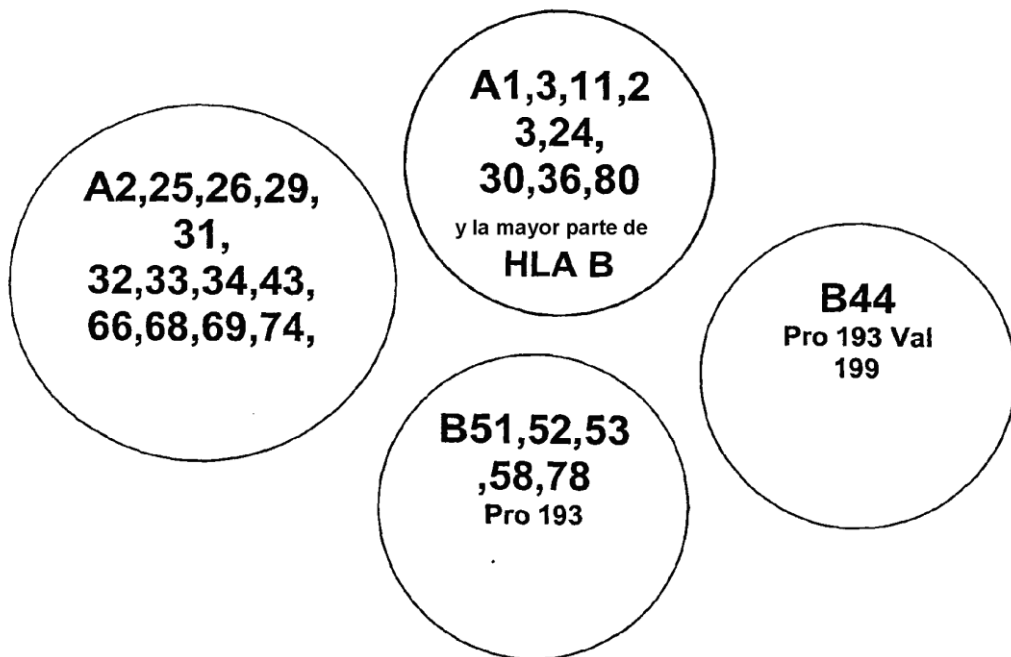


Figura 14

Péptidos 40

Secuencias: 202-216

R C W A L S F Y P A E I T L T

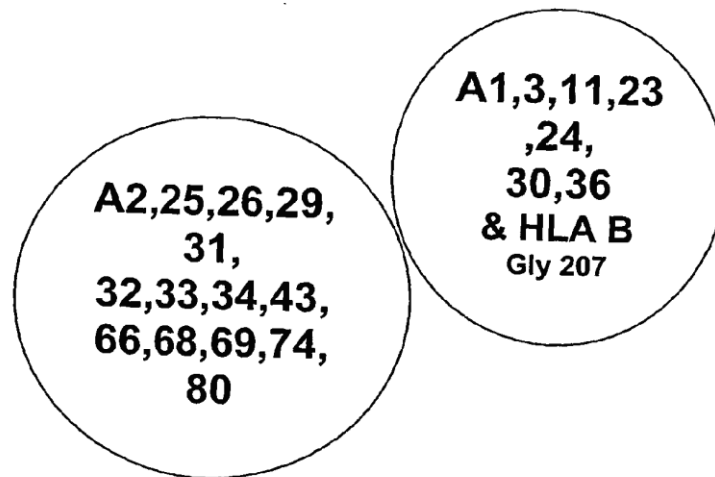


Figura 15

Péptidos 50 y 51

Secuencias: 268-282 & 270-284

K P L T L* R W* E P S S Q P T I*
L T L* R W* E P S S Q P T I* P I*

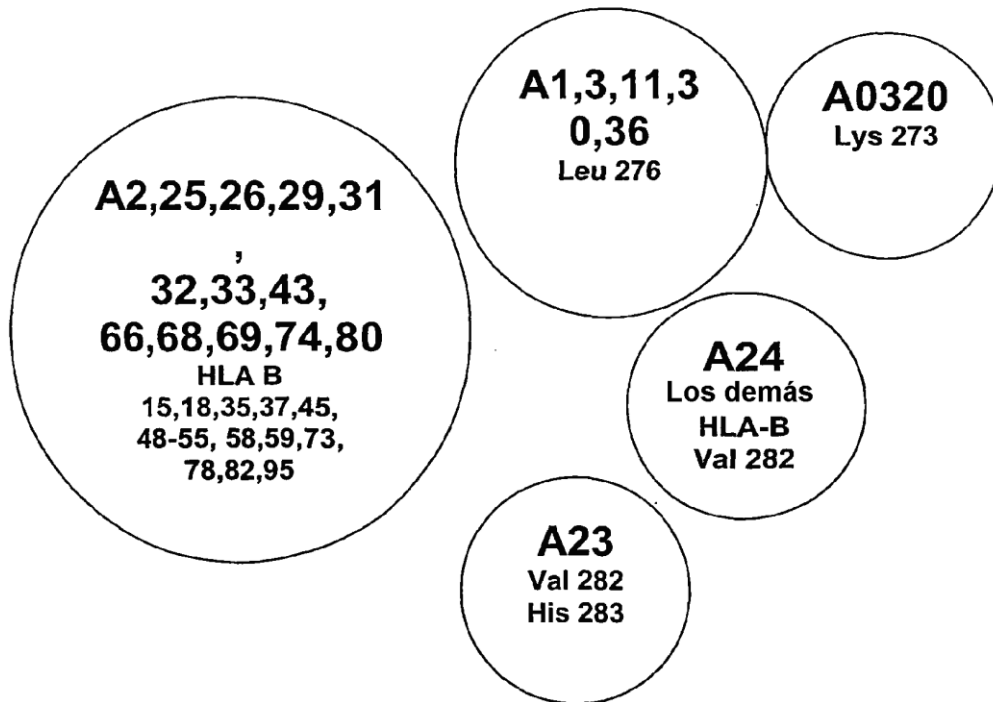


Figura 16

Péptidos 52 y 53

Secuencias: 280-294 y 282-296

P T I* P I* V* G I* I* A G L* V* L F*
I* P I* V* G I* I* A G L* V* L F* G A

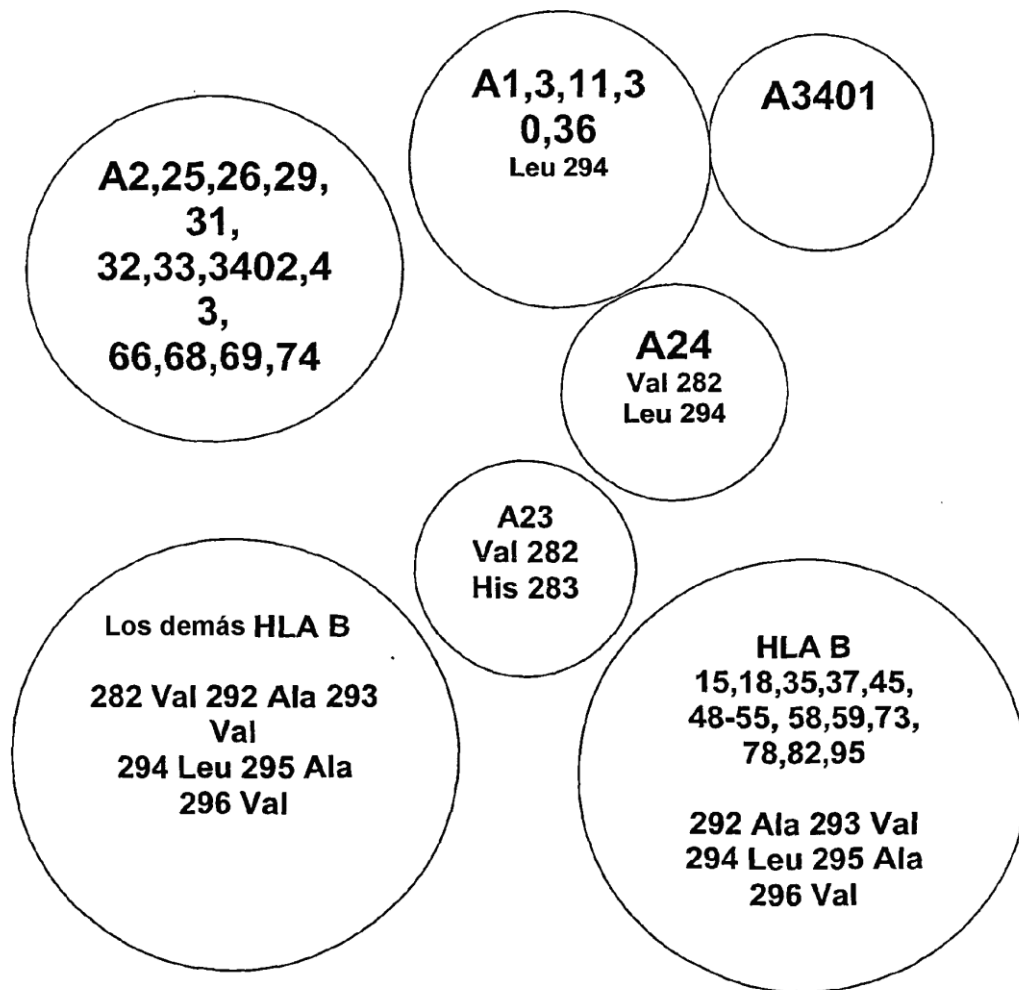


Figura 17

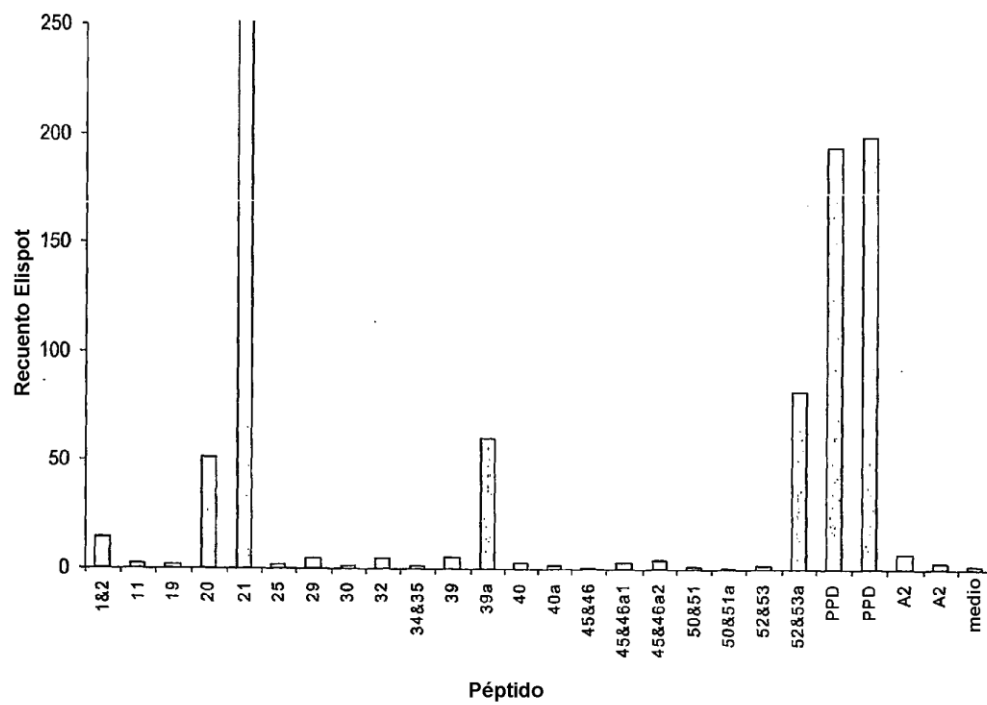


Figura 18

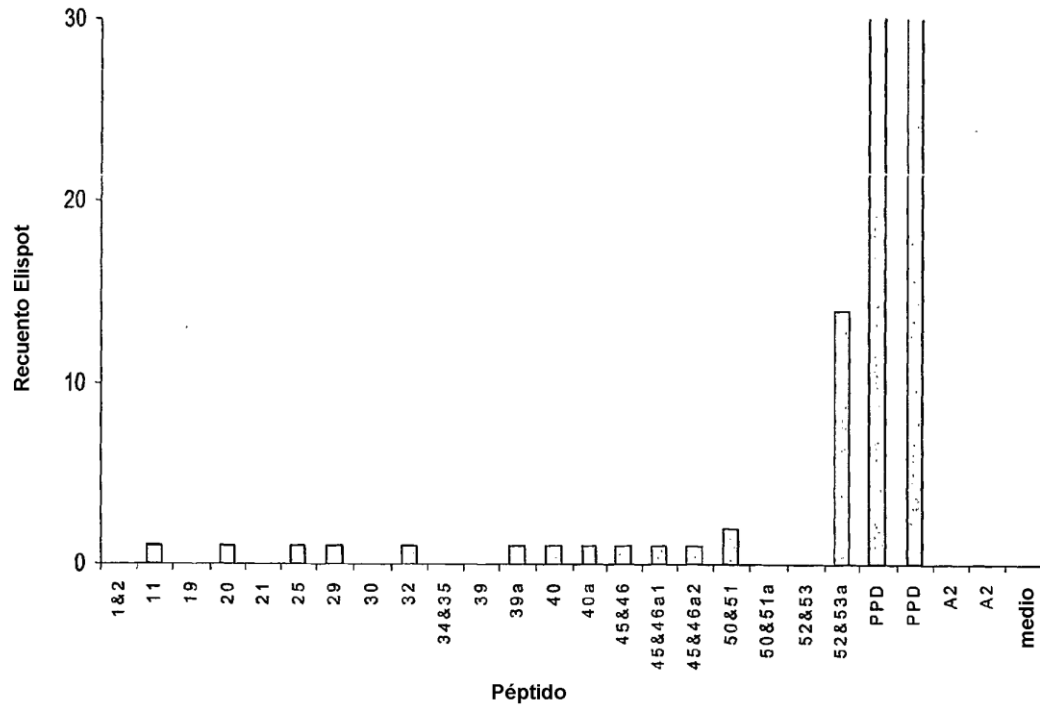


Figura 19

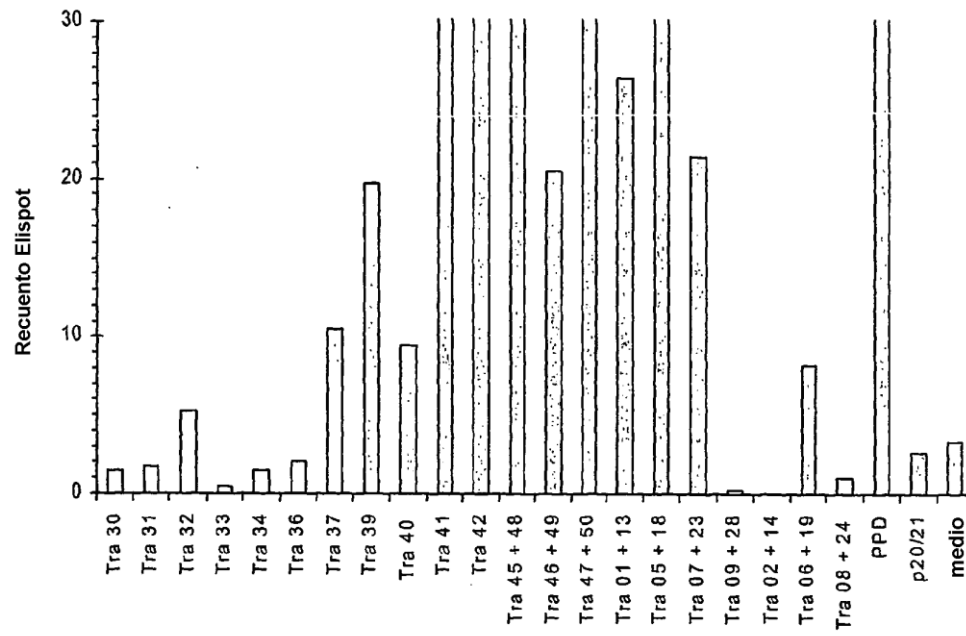


Figura 20

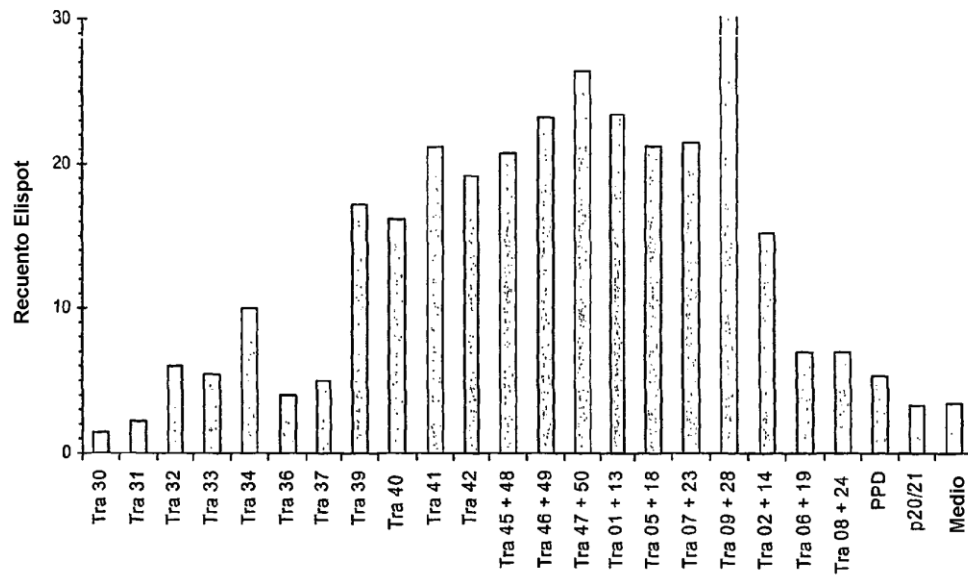


Figura 21

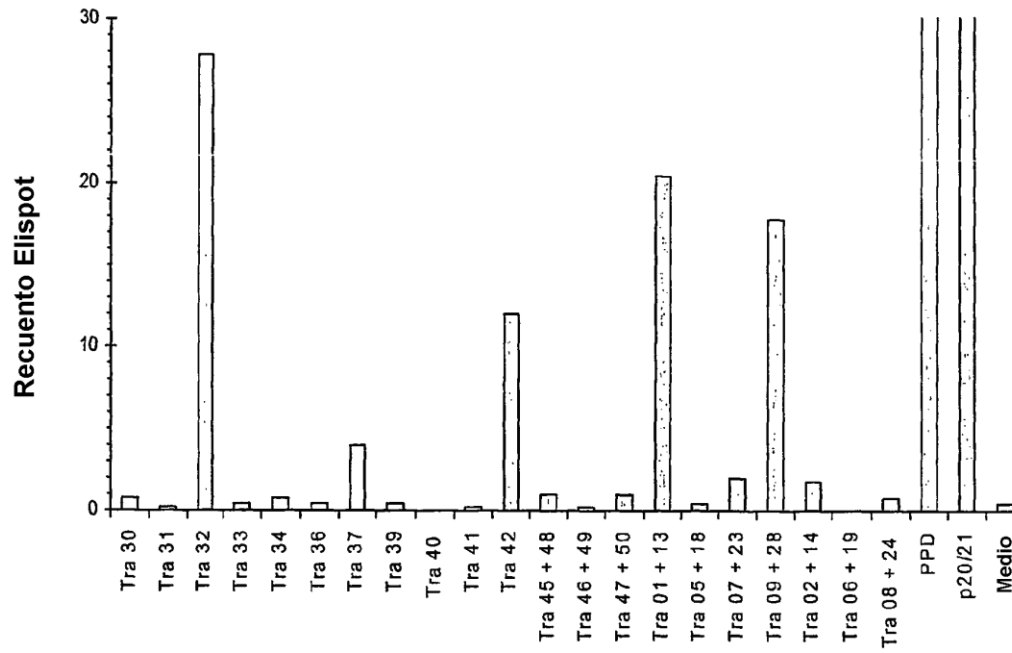


Figura 22A

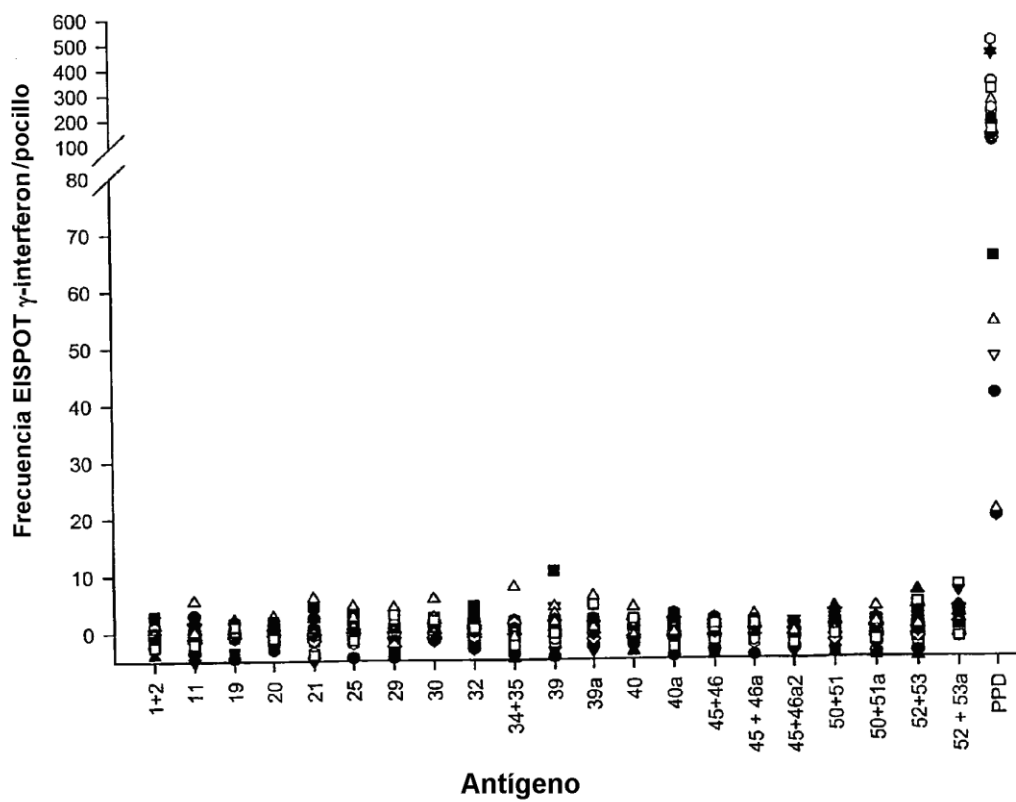


Figura 22B

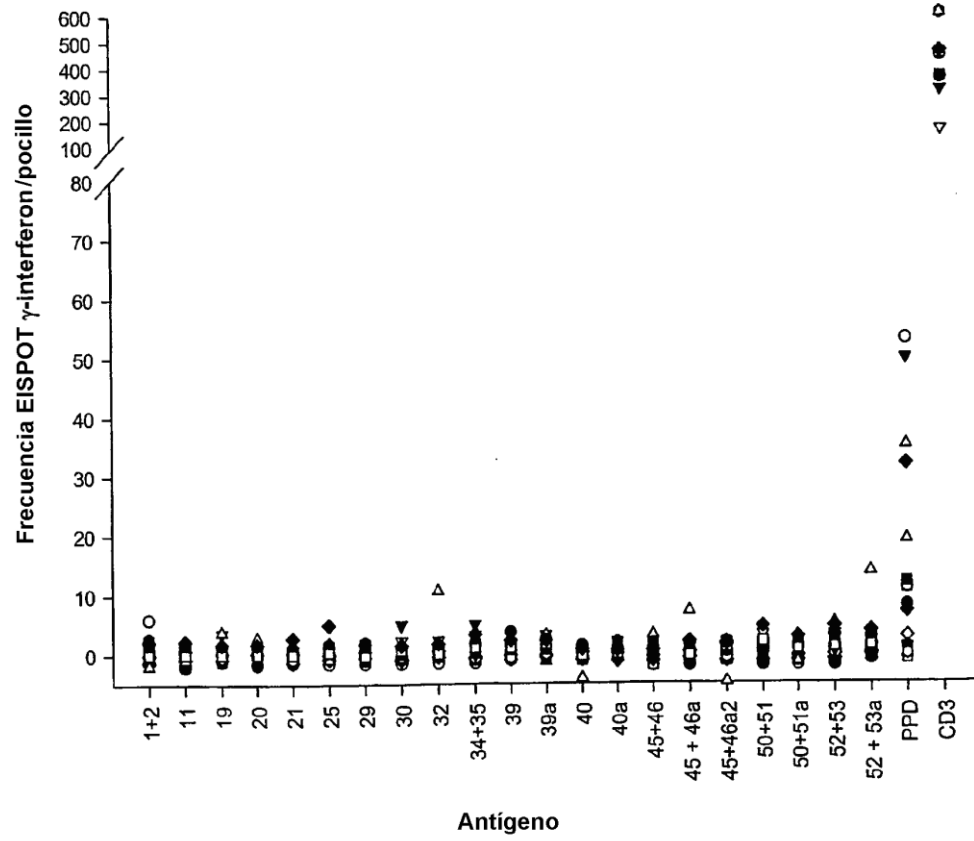


Figura 22C

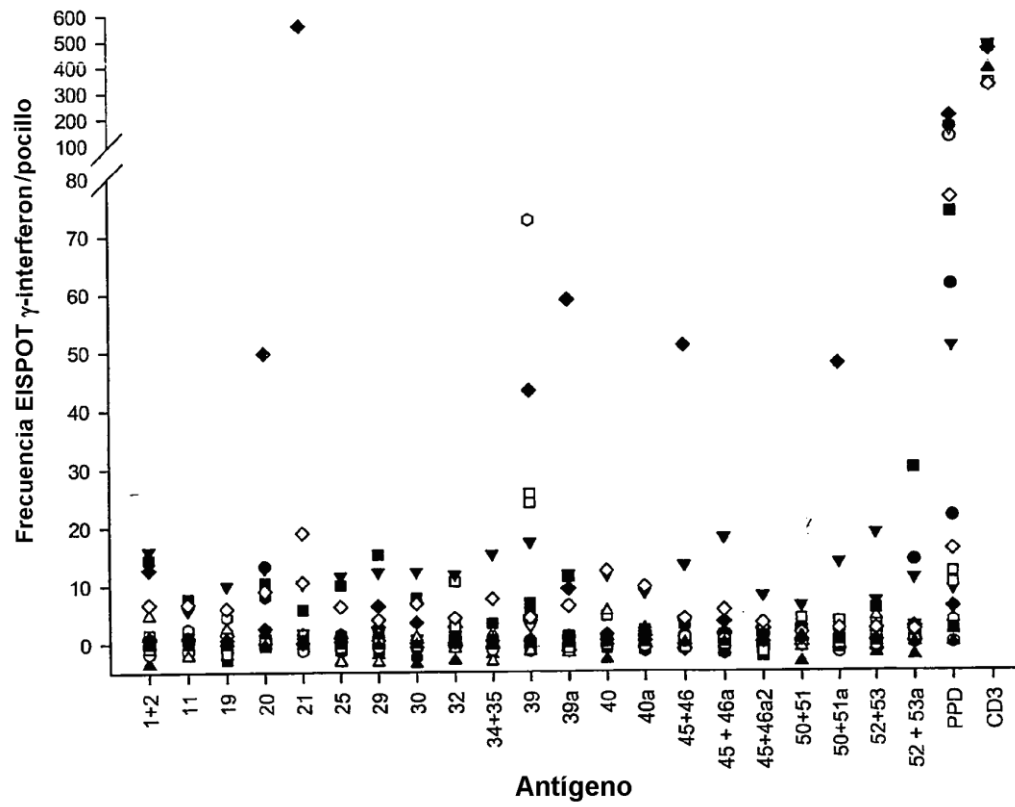


Figura 23A

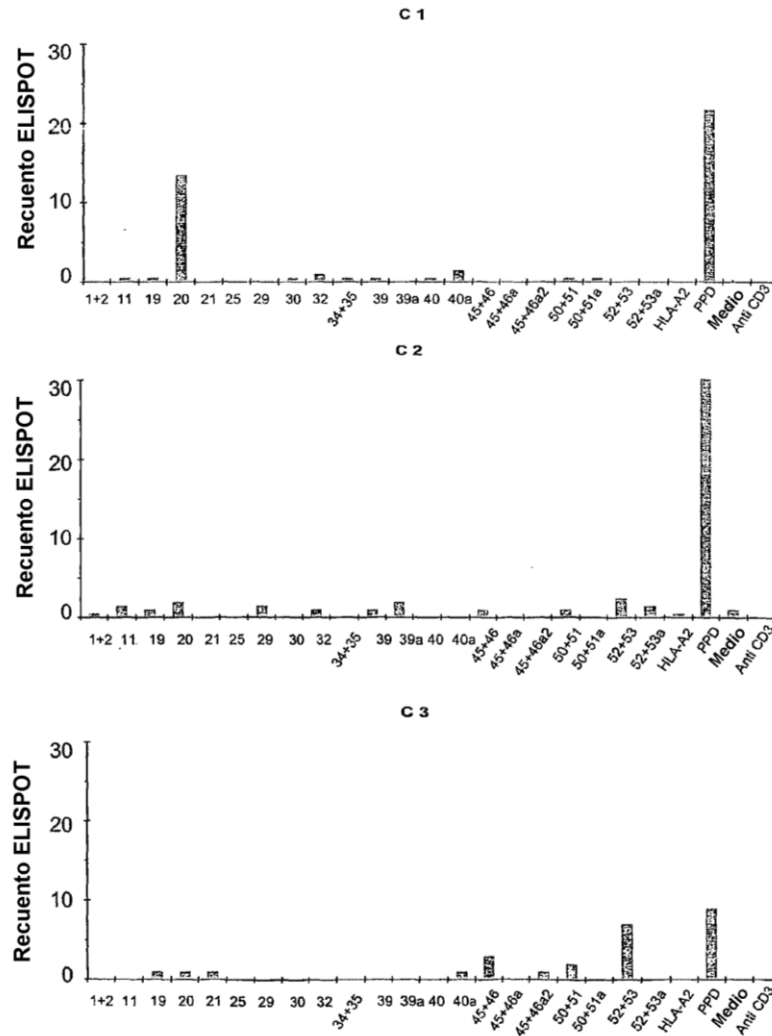


Figura 23B

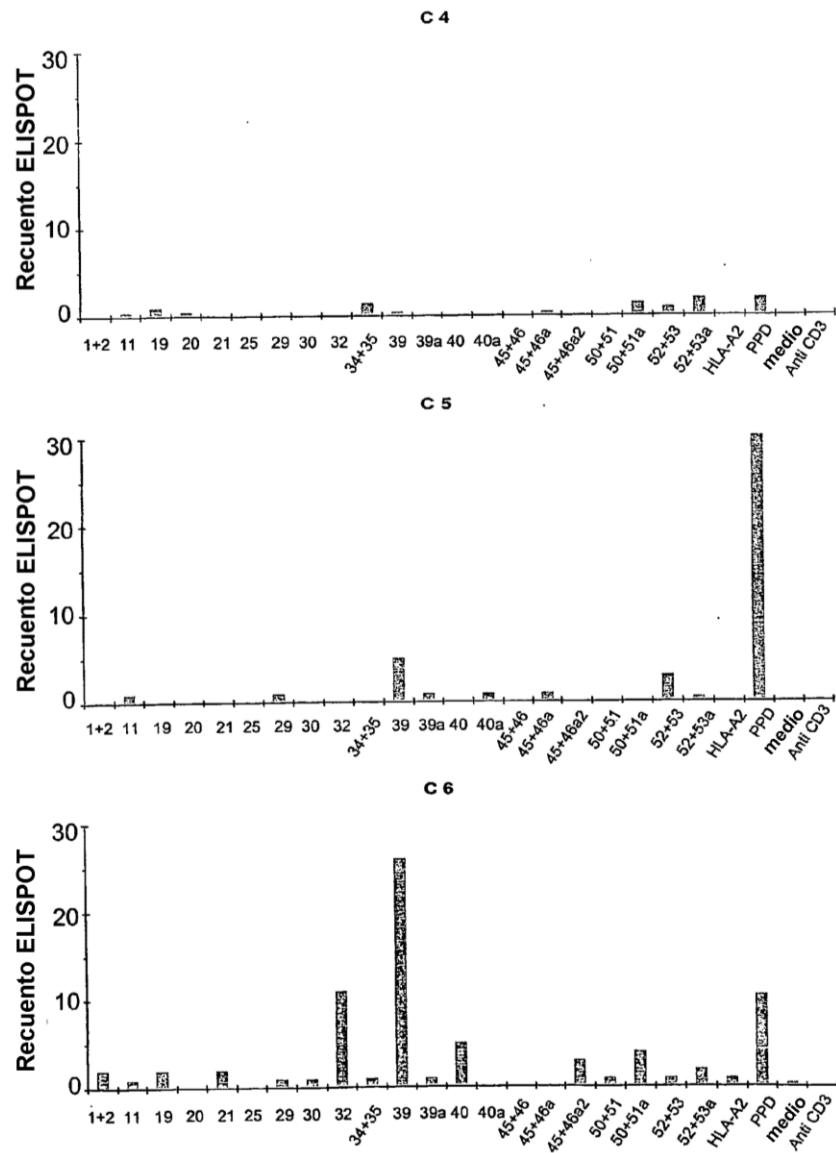


Figura 23C

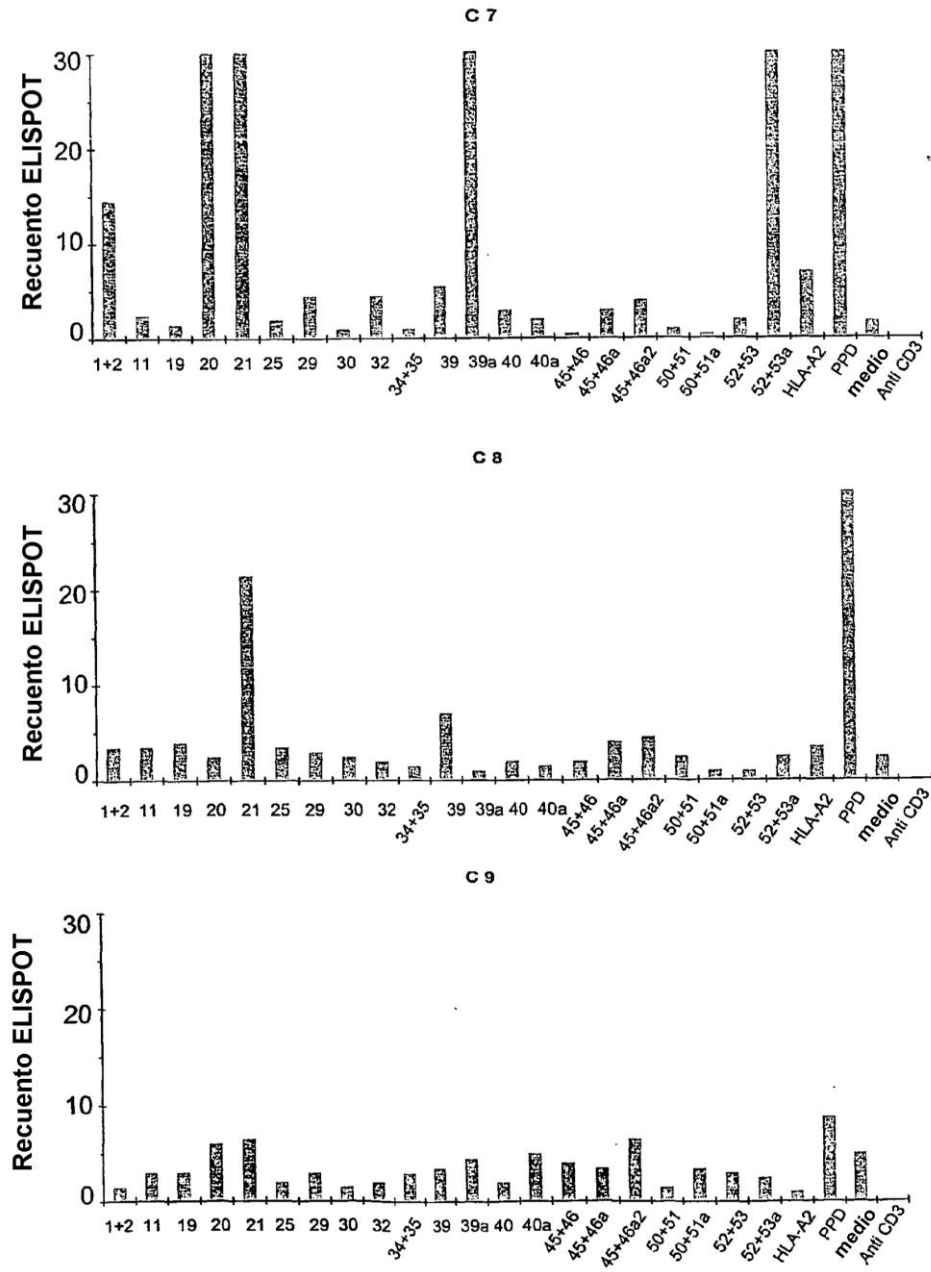


Figura 23D

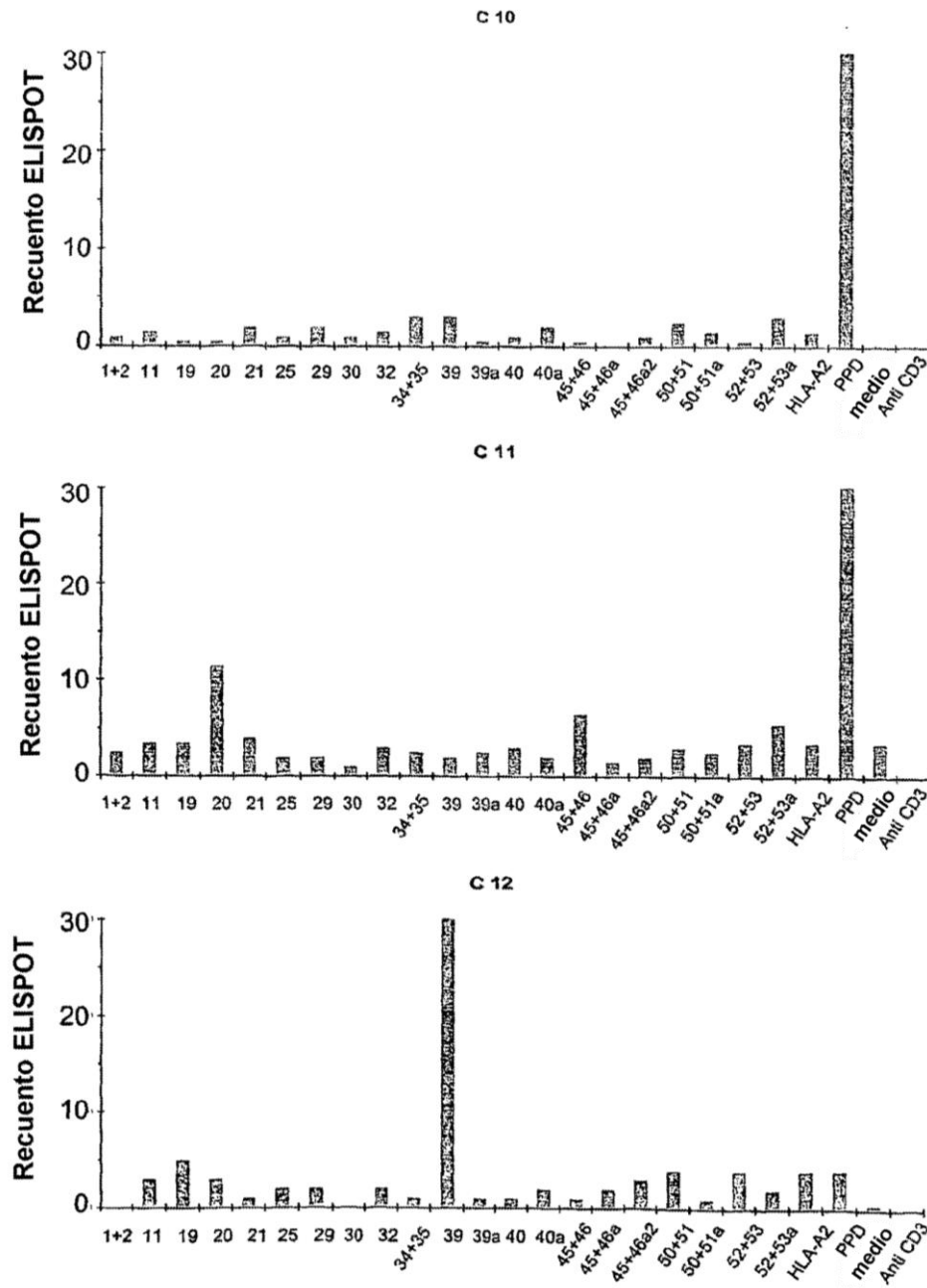
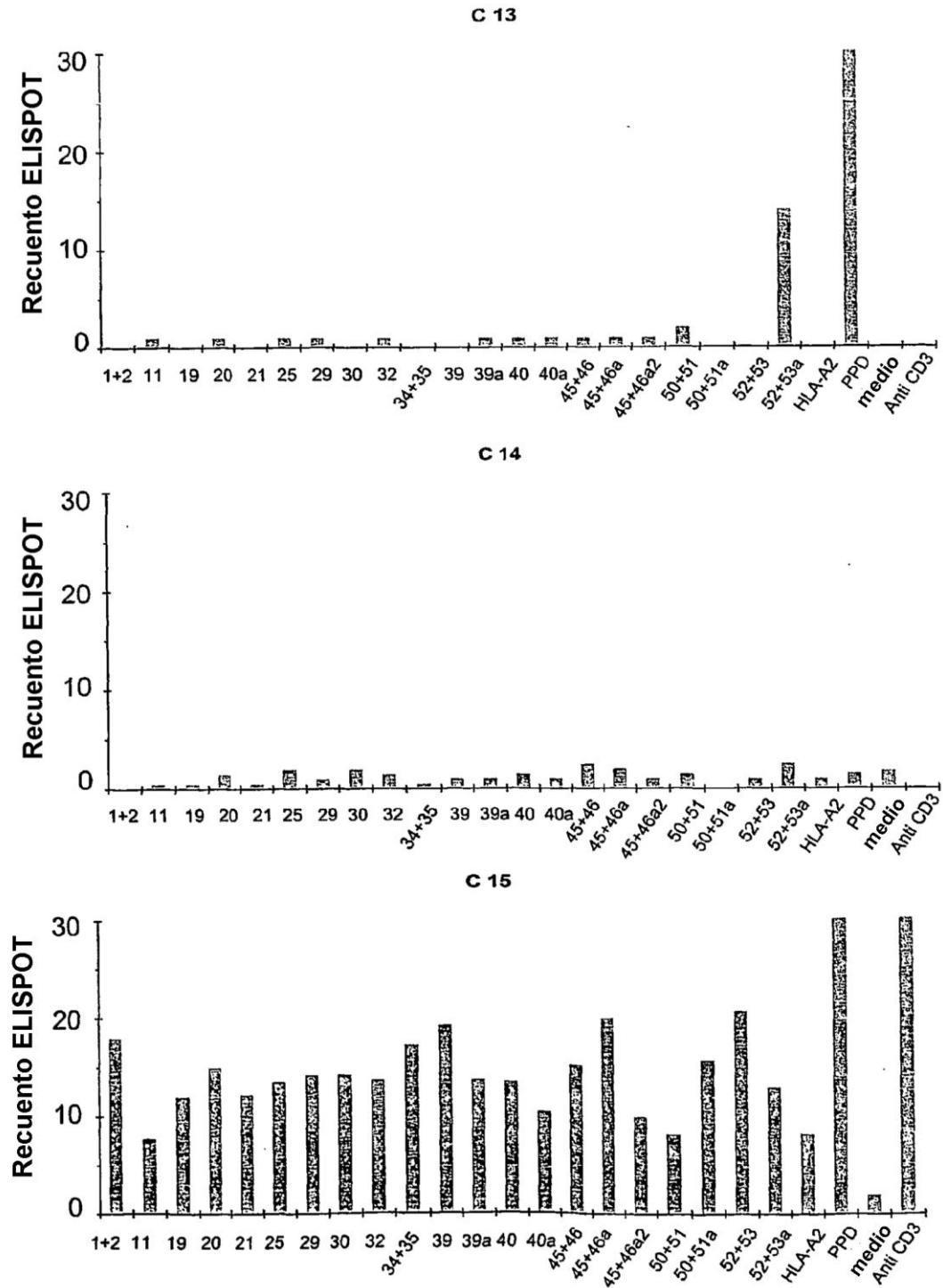
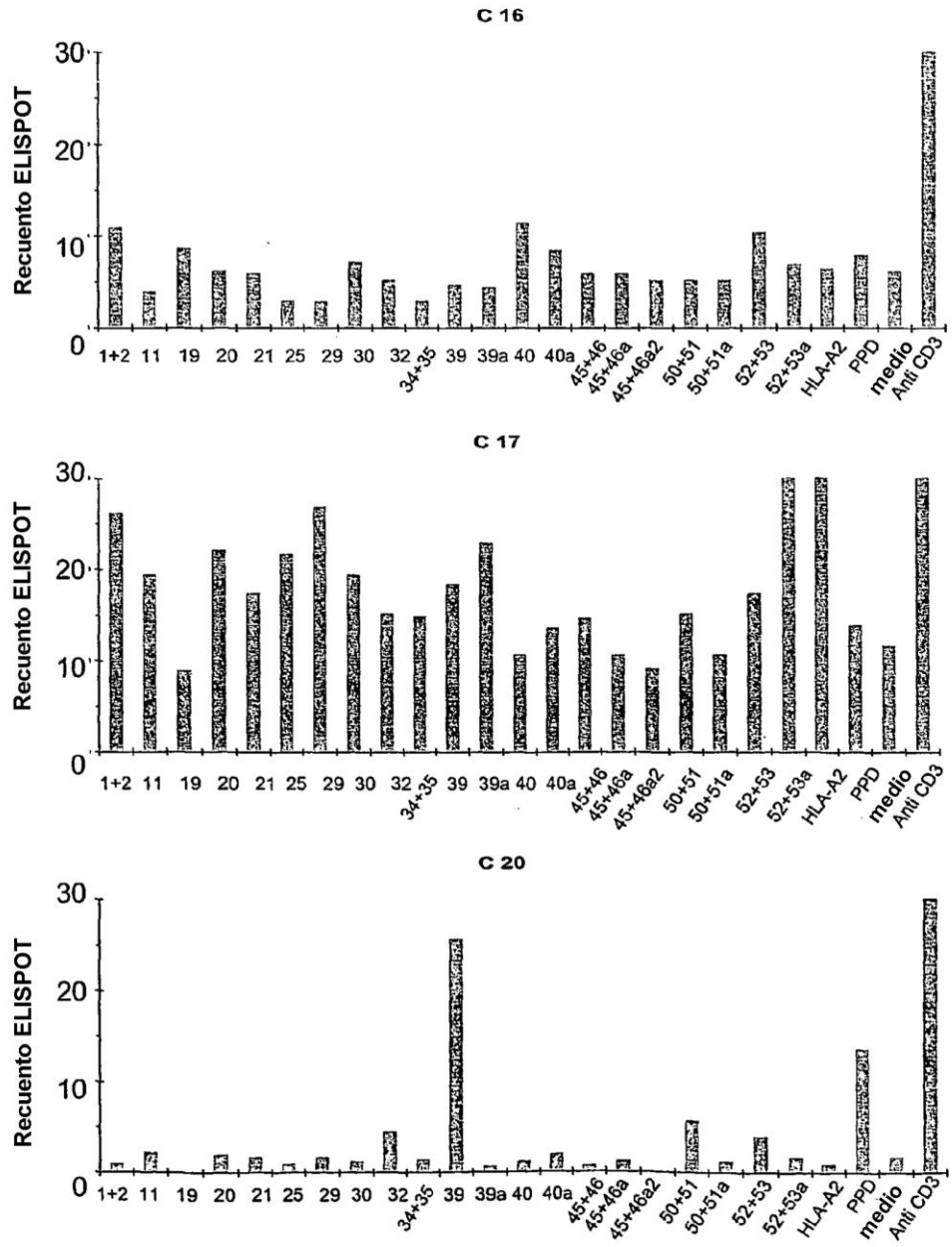


Figura 23E



Ejemplo 23F



Ejemplo 23G

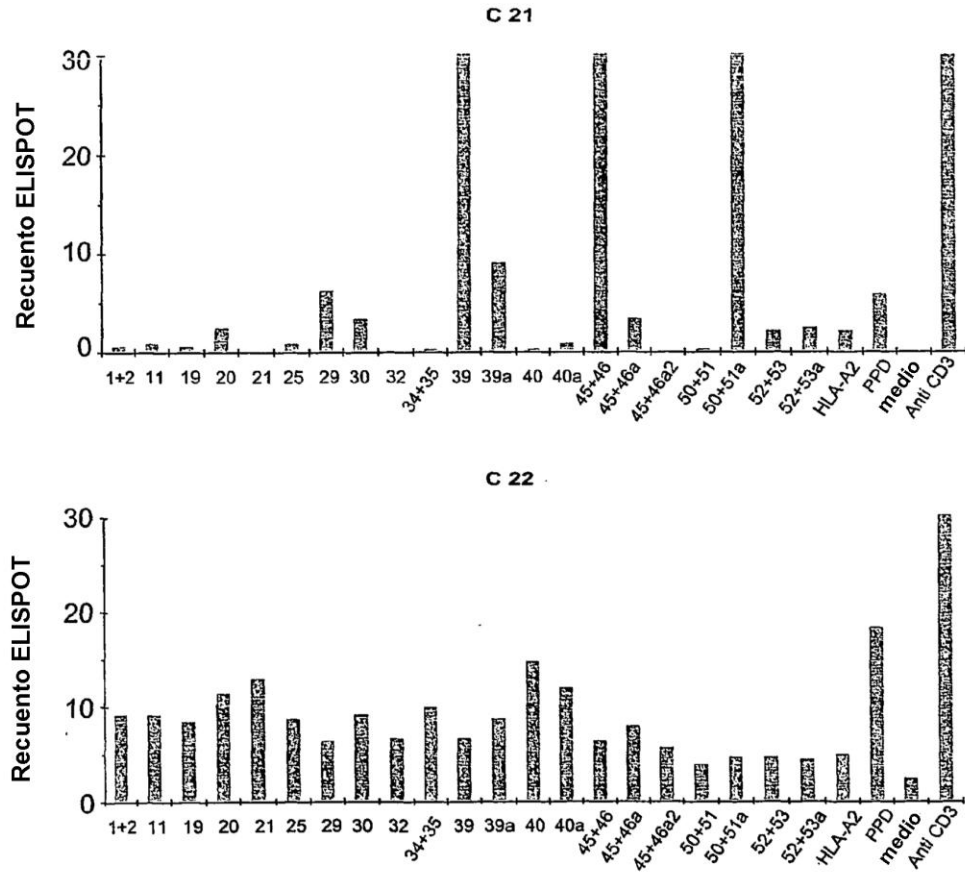


Figura 23H

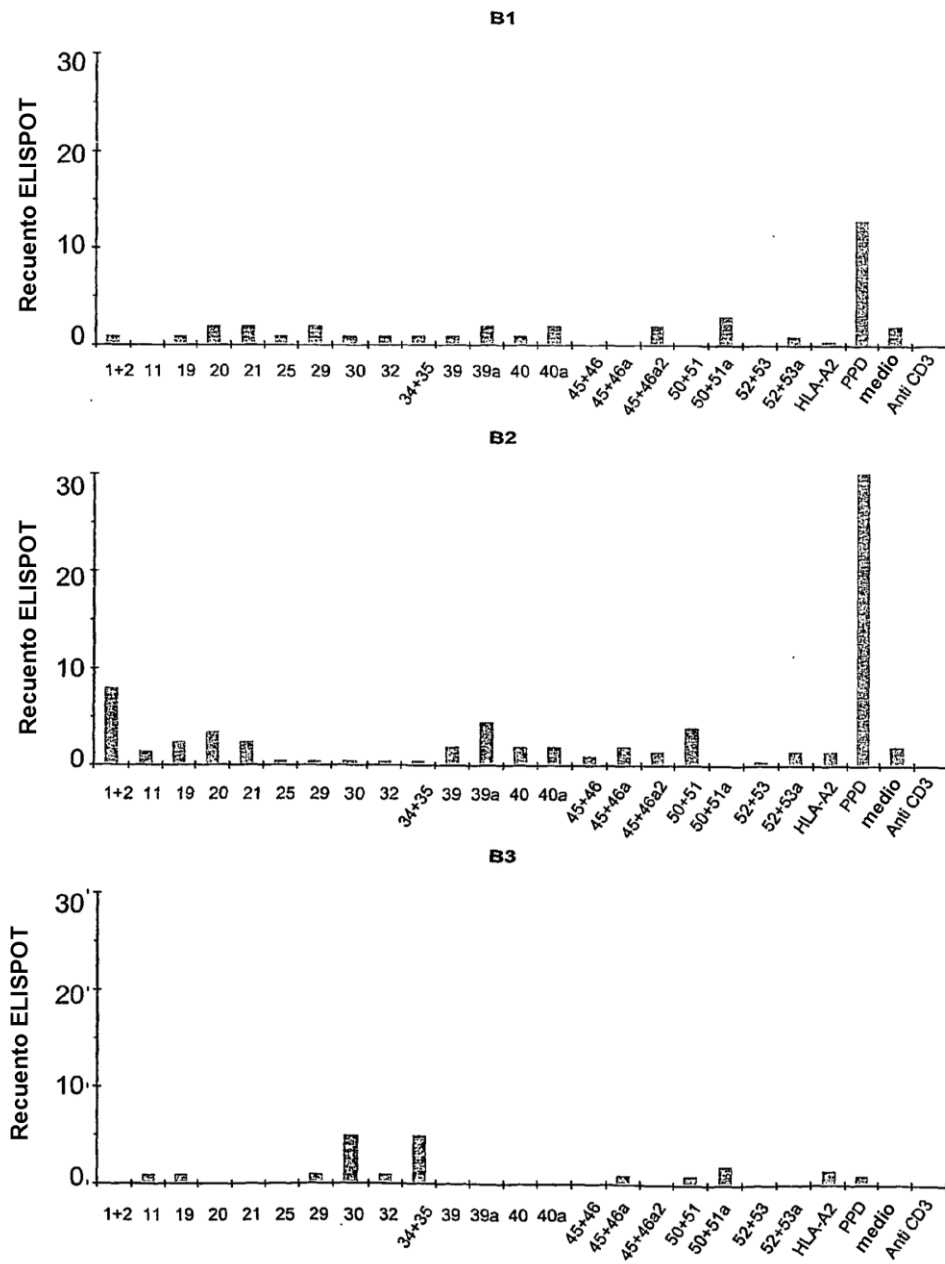


Figura 23I

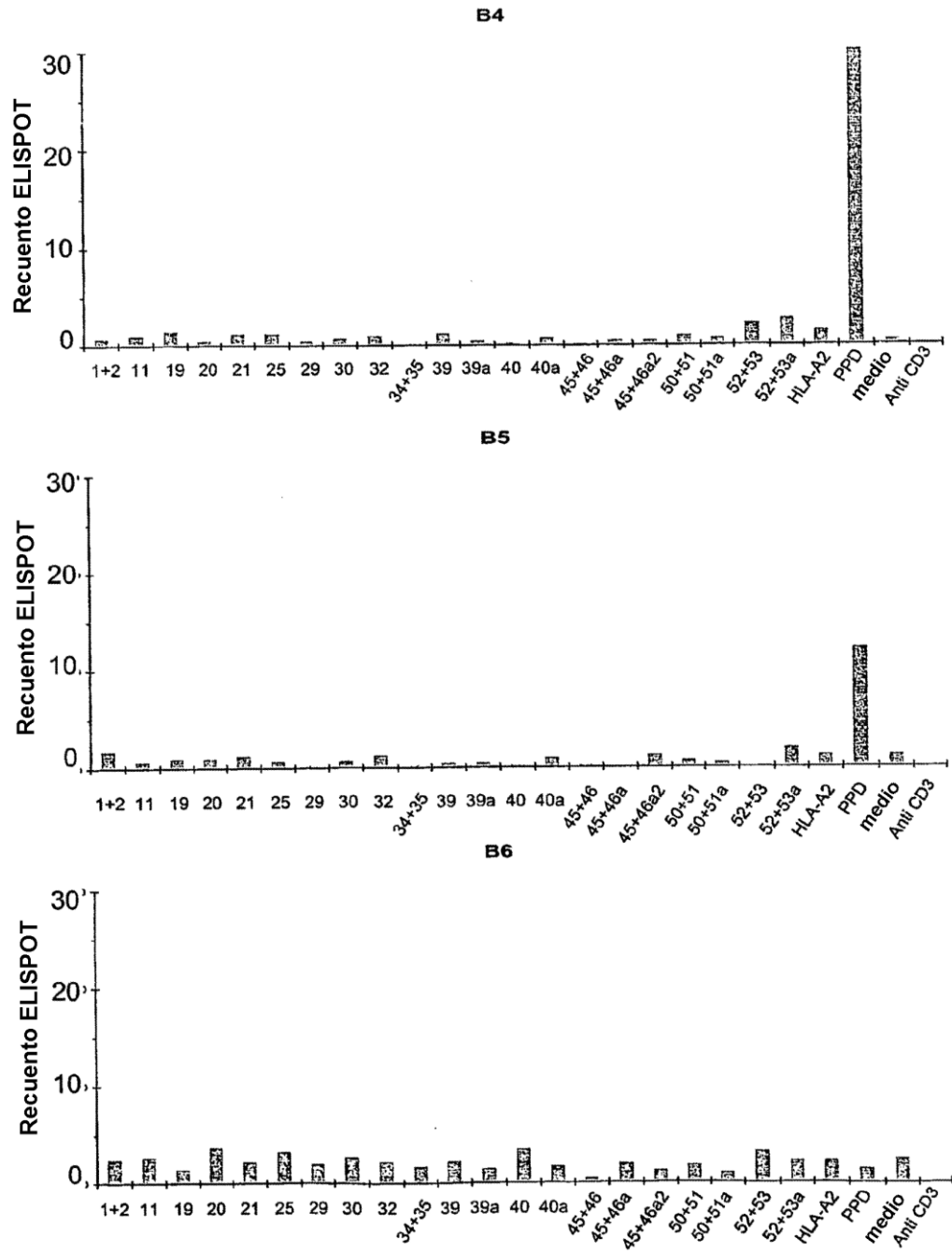
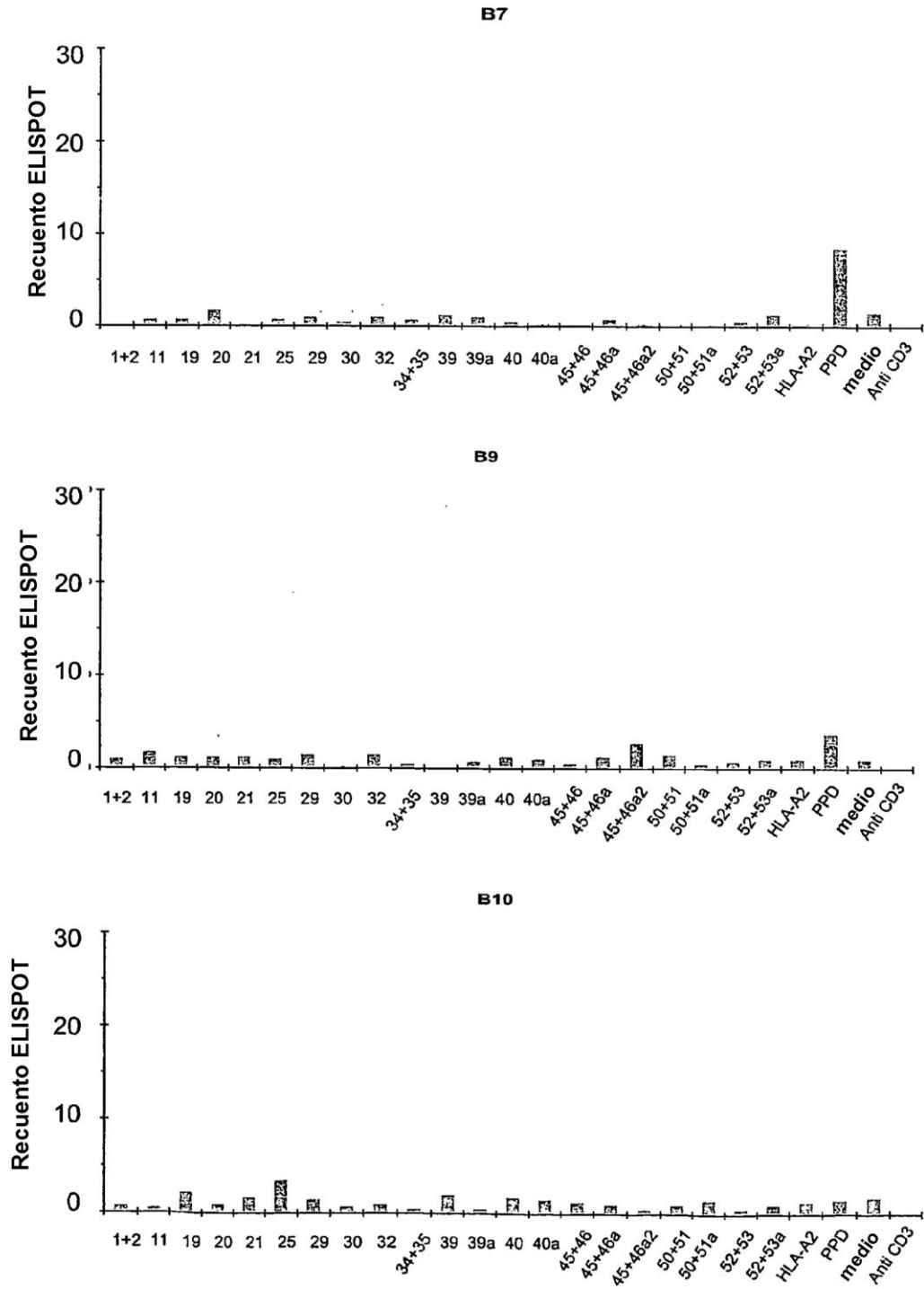
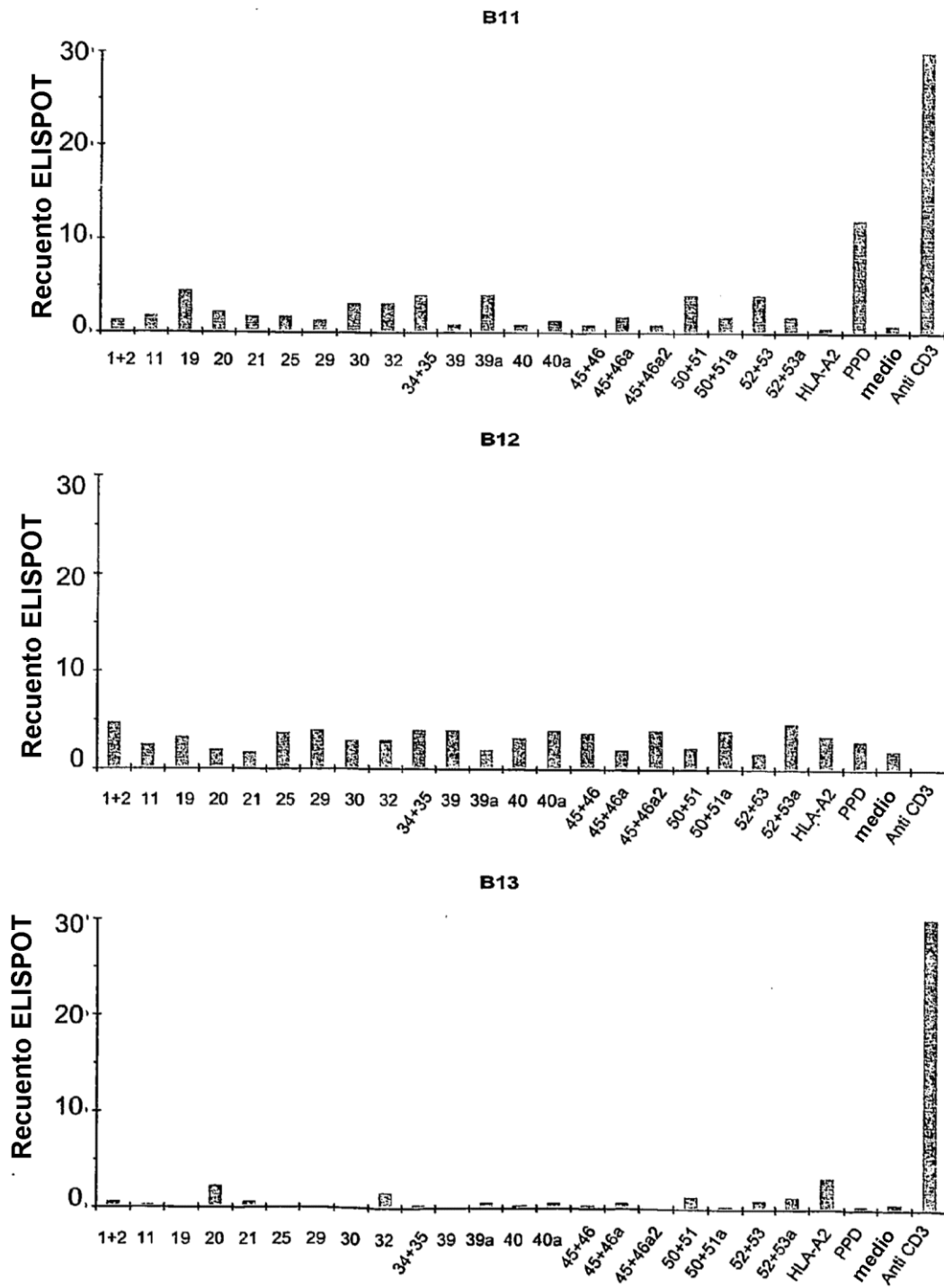


Figura 23J



Ejemplo 23K



Ejemplo 23L

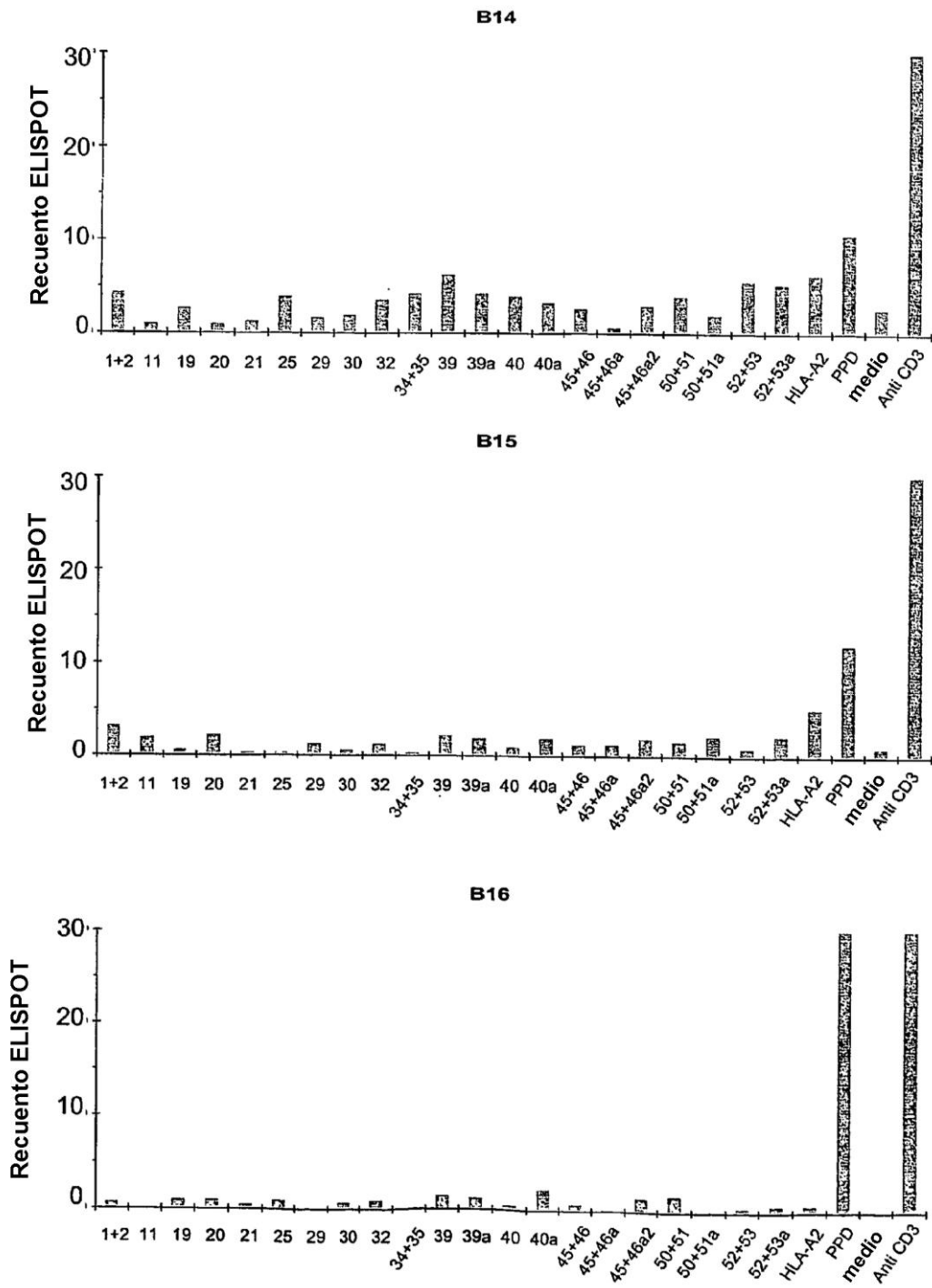


Figura 23M

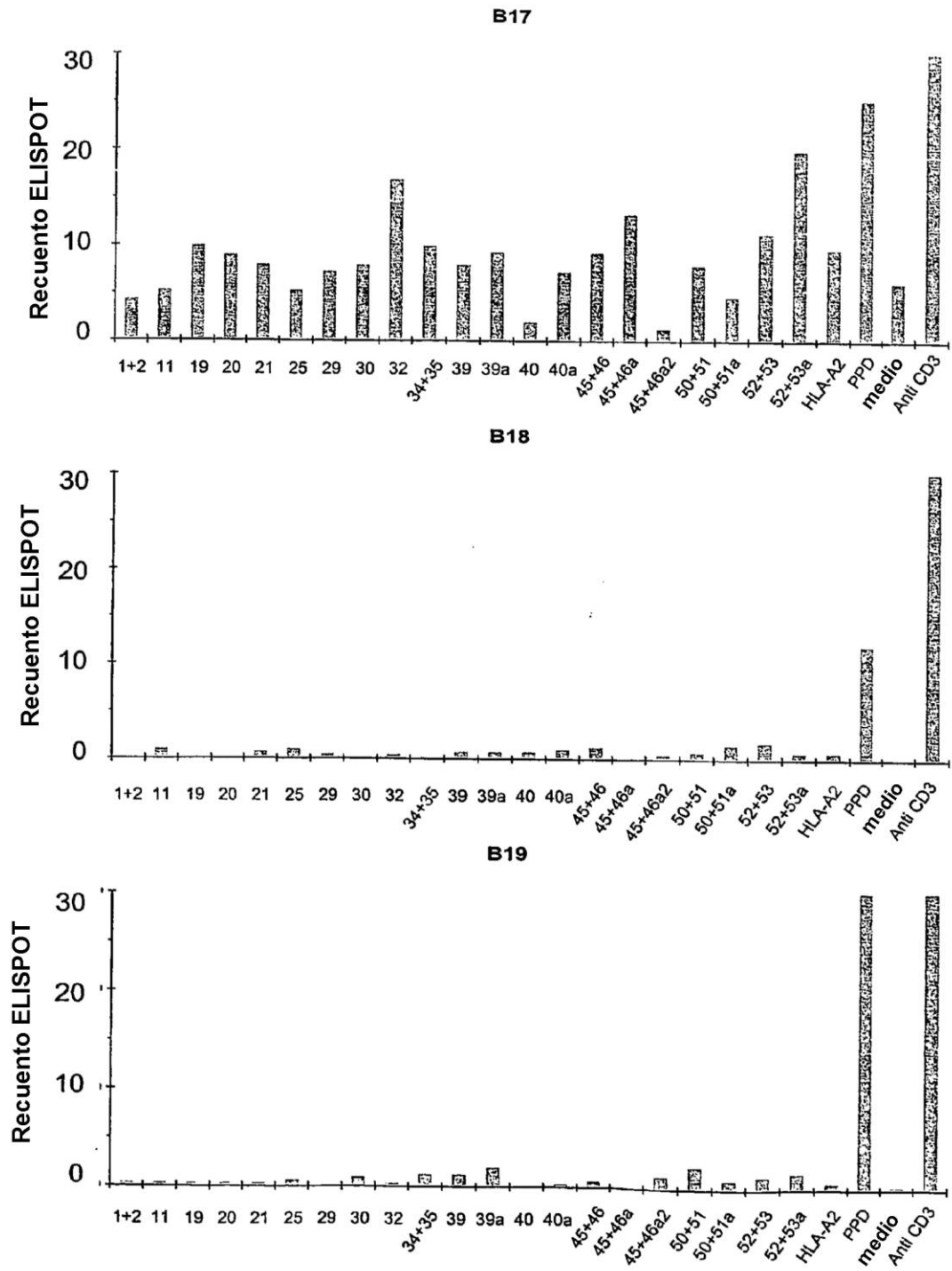


Figura 23N

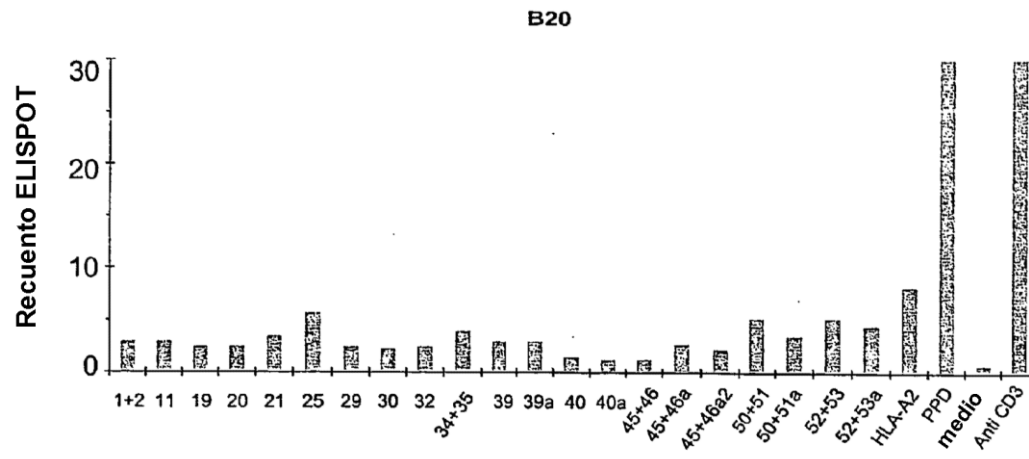


Figura 24A

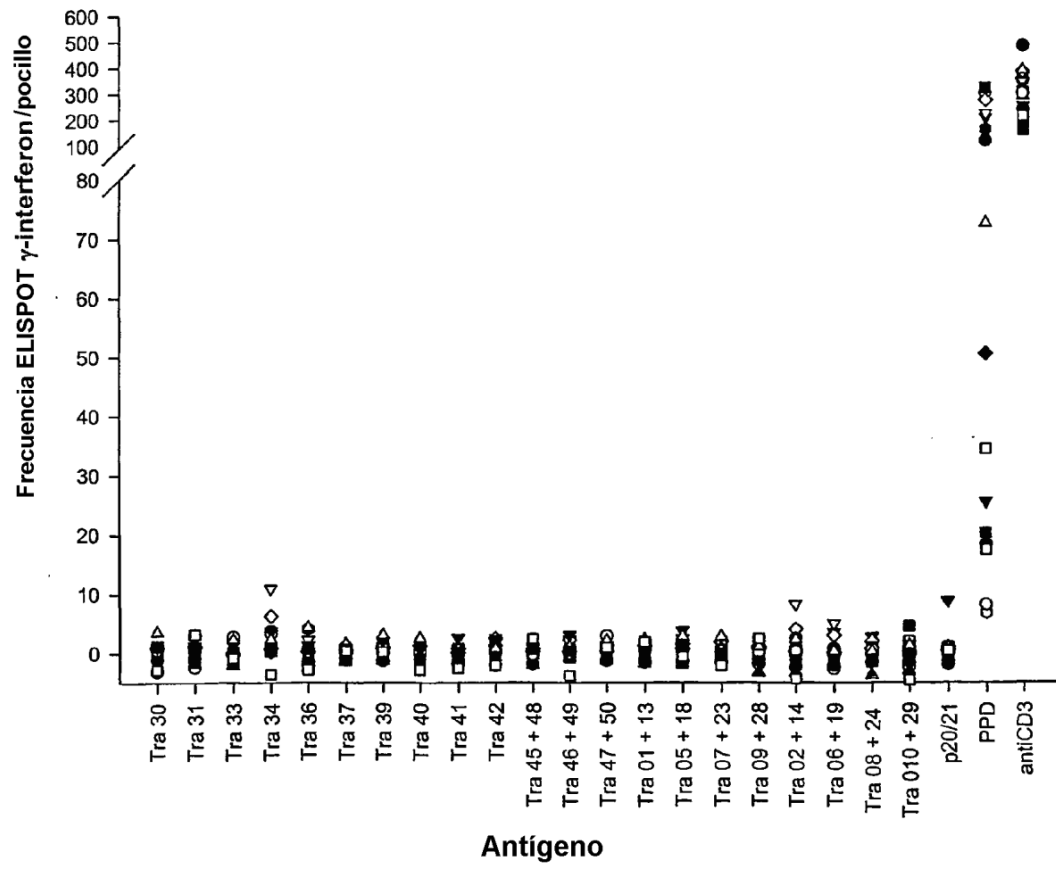


Figura 24A

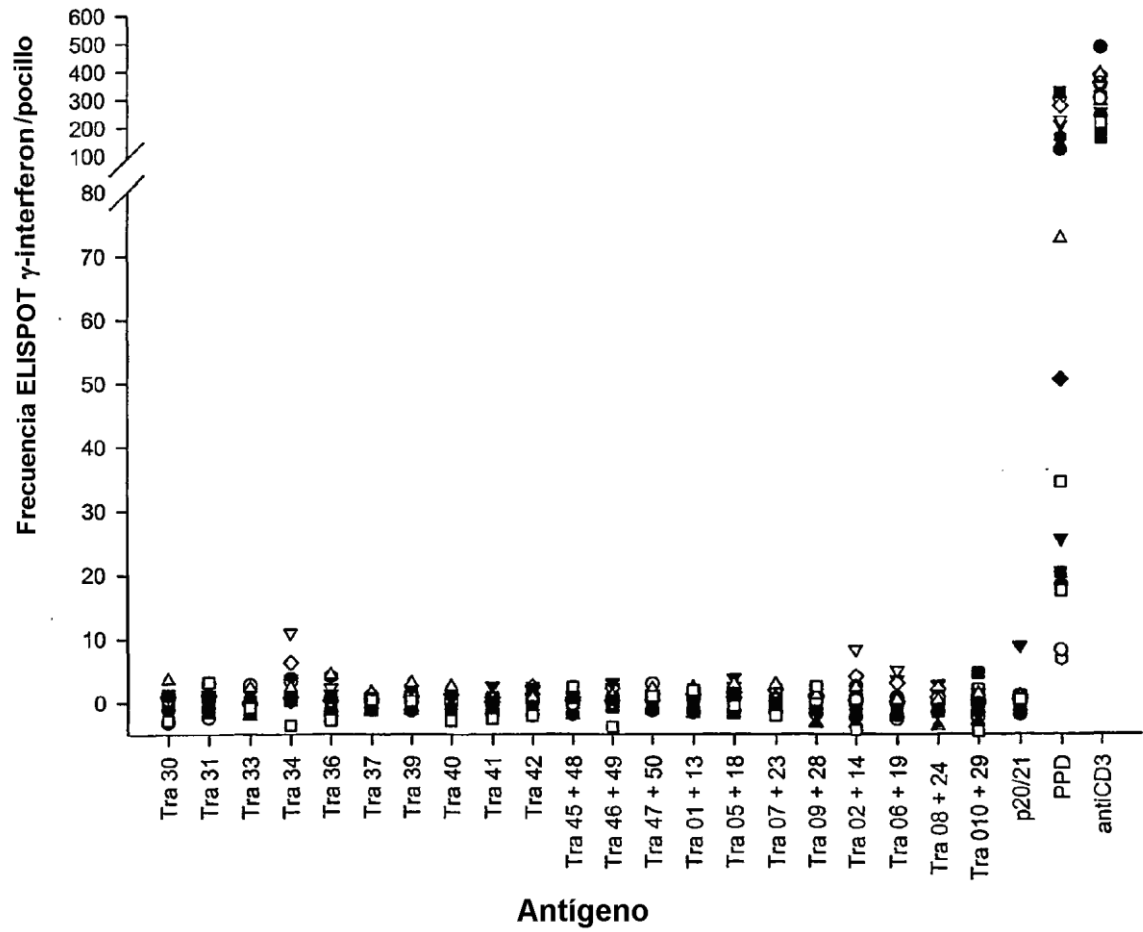


Figura 24B

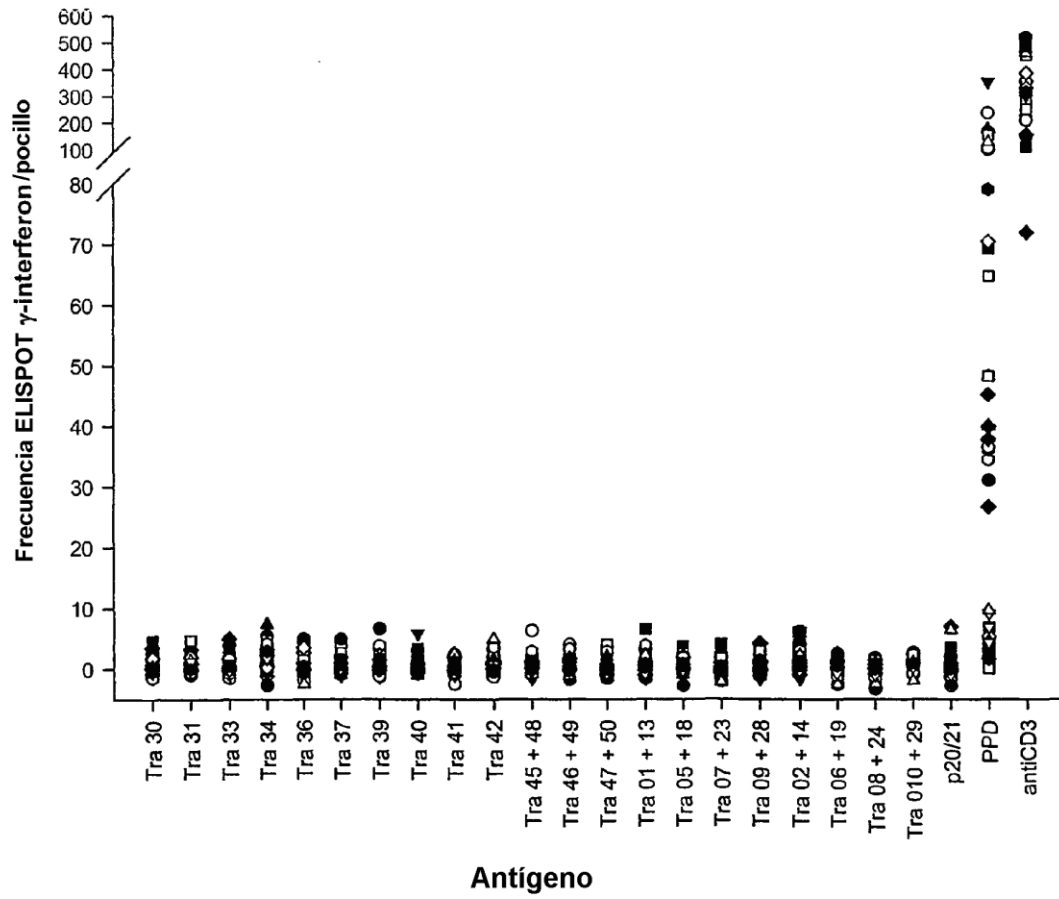


Figura 24C

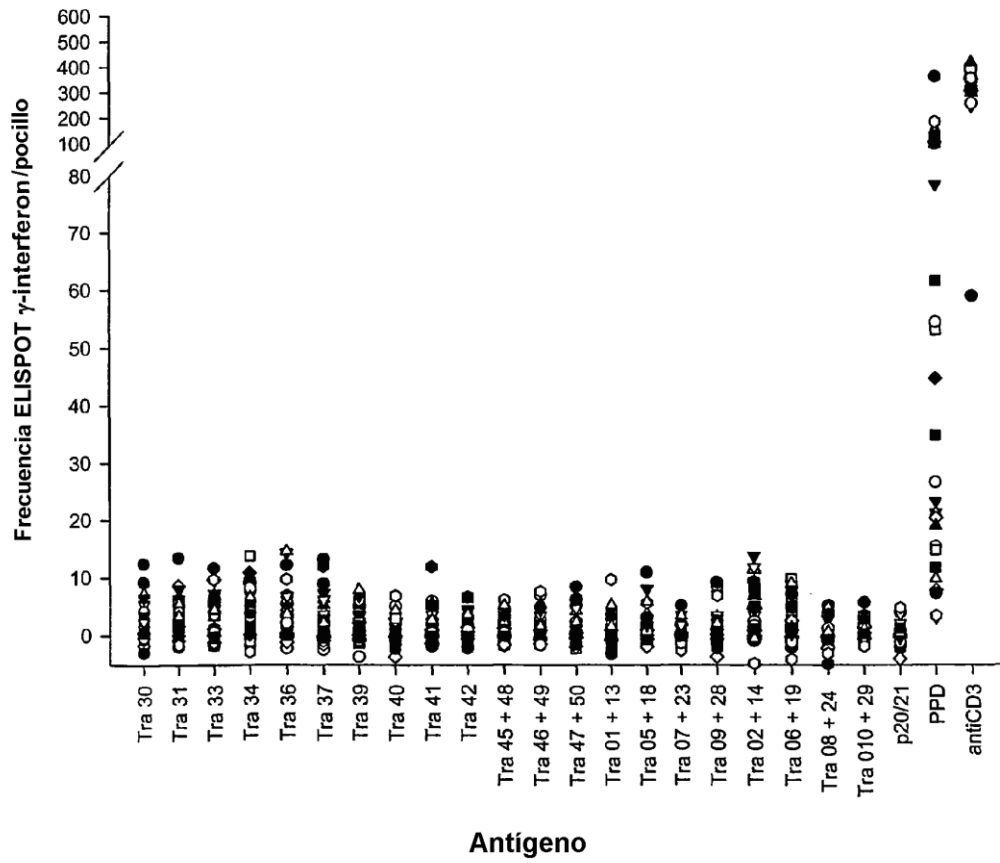


Figura 24D

