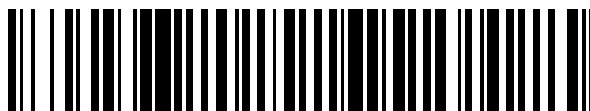


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 020**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2007 E 07732718 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2026836**

54 Título: **Terapia con péptidos**

30 Prioridad:

09.05.2006 GB 0609121

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2014

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (100.0%)
Edgbaston
Birmingham West Midlands B15 2TT, GB

72 Inventor/es:

BALL, SIMON y
MAILLERE, BERNARD

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 520 020 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

Terapia con péptidos**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la terapia con péptidos, y en particular a la utilización de la inmunoterapia con péptidos para tratar o prevenir el rechazo de aloinjertos. La invención se extiende a diversos constructos, y métodos de uso de tales constructos en el tratamiento de pacientes de trasplante, por ejemplo, pacientes que sufren de insuficiencia renal terminal (IRT) que requieren un trasplante de riñón.

Antecedentes de la invención

Los resultados del trasplante renal son buenos a corto y medio plazo. Sin embargo, a largo plazo, los riñones se pierden sistemáticamente como consecuencia de la nefropatía crónica del aloinjerto (trasplante). Esto es en gran medida una consecuencia de dos fenómenos en curso: - (i) el rechazo crónico; y (ii) la nefrotoxicidad por inhibidor de calcineurina. Ambos fenómenos interactúan con un determinante pre-existente del resultado, es decir, daño crónico del parénquima renal establecido antes y poco después del trasplante. Por otra parte, el requisito para la inmunosupresión a largo plazo en los receptores de trasplante tiene consecuencias adversas, tales como aumento de la susceptibilidad a la infección y a la malignidad. Los beneficios del trasplante como tratamiento para pacientes que sufren de IRT se manifiestan tanto en la calidad de vida como en la supervivencia mejorada. Sin embargo, una larga espera para ser trasplantado puede ser frustrante para el individuo y afectar materialmente a los resultados a largo plazo. Una variedad de factores determinan el tiempo de espera, pero particularmente importante es la presencia en el receptor del trasplante de anticuerpos que exhiben inmunoespecificidad contra moléculas polimórficas conocidas como antígenos leucocitarios humanos (HLA), presentes en los órganos de los donantes potenciales. Los anticuerpos anti-HLA producidos por el receptor del trasplante pueden causar un rechazo de comienzo muy rápido o "hiperagudo" del órgano trasplantado, y por lo tanto su presencia debe ser determinada antes del trasplante. El receptor potencial es excluido a continuación de recibir un trasplante que tiene HLA relevantes, y el paciente debe esperar un órgano que porta antígenos HLA para los que no se produzcan anticuerpos. Los anticuerpos anti-HLA pueden ser estimulados por el embarazo, transfusiones de sangre y trasplante. El uso de eritropoyetina ha reducido la transfusión, y una mejor compatibilidad de HLA a través del intercambio de órganos ha reducido la estimulación de la síntesis de anticuerpos por el trasplante.

Sin embargo, la producción de anticuerpos anti-HLA, es decir, la "sensibilización por HLA", sigue siendo un problema significativo para el trasplante. Esto es particularmente evidente en pacientes que tienen IRT permanente, a menudo desde una edad temprana, que tienen exposición acumulativa intensa a HLA alogénicos (es decir, foráneos). La formación de anticuerpos anti-HLA de conmutación de clase madurados por afinidad por los linfocitos B requiere la presencia de células T coadyuvantes. La presencia de células T coadyuvantes para la producción de anticuerpos implica la participación de HLA mediante receptores de células T a través de la ruta indirecta. Los linfocitos T CD4+ pueden reconocer los HLA alogénicos a través de mecanismos convencionales de captación por células presentadoras de antígenos autólogas, procesamiento de péptidos y presentación en el contexto del auto-MHC de clase II. Esto se denomina ruta indirecta de alorreconocimiento. Además de su papel en la formación de anticuerpos, también se cree que las células T juegan un papel particularmente importante en el rechazo crónico. La ruta directa de alorreconocimiento es la reacción cruzada del receptor de células T específico para el auto-MHC y el péptido exógeno nominal en el MHC alogénico (con el péptido asociado). Esto se cree que es particularmente importante en el rechazo agudo. Los autores de la presente invención consideran por lo tanto que el tratamiento para minimizar, prevenir o eliminar por completo la vía indirecta de alorreconocimiento podría tener un valor considerable, tanto antes como después de recibir un trasplante con el fin de reducir la probabilidad de rechazo y la síntesis de anticuerpos anti-HLA.

Un objetivo a largo plazo de la investigación inmunológica en el trasplante ha sido desarrollar modulación específica del antígeno de la respuesta inmunitaria que haría la inmunosupresión inespecífica innecesaria. Aunque una eliminación completa de la necesidad de la inmunosupresión puede ser poco realista, los autores de la presente invención se dieron cuenta de que cualquier aumento en la especificidad sería bienvenido.

La inmunosupresión no específica del antígeno parece tener valor limitado en la modulación del rechazo crónico y la síntesis de anticuerpos anti-HLA. Sin embargo, si bien los autores de la presente invención no desean vincularse a ninguna hipótesis, consideran que la reducción específica de antígeno o la inhibición de la presentación indirecta podrían disminuir el rechazo crónico y la síntesis de anticuerpos contra HLA. Por analogía con la evidencia en el campo de la alergia, los autores de la presente invención especulan que los tratamientos basados en fragmentos de antígeno, es decir, péptidos, podrían resultar beneficiosos.

Compendio de la invención

Por lo tanto, los autores de la presente invención propusieron desarrollar una técnica de inmunoterapia con péptidos que podría modular la vía indirecta de alorreconocimiento en los seres humanos. Consideran que esto tiene el potencial para la modulación específica de antígenos de las respuestas aloinmunes. Con el fin de probar su hipótesis, estudiaron el alorreconocimiento indirecto en pacientes en los que había evidencia de una respuesta alogénica indirecta específica. Por consiguiente, los autores de la presente invención decidieron investigar los pacientes que habían elaborado un anticuerpo anti-HLA de especificidad conocida, ya que esto implicaba la presencia de un alorrespuesta indirecta específica. Los autores de la presente invención basaron sus estudios en una molécula de antígeno de clase I del MHC común y problemática, HLA-A2, que se ilustra en la Figura 1.

Los autores de la presente invención querían comprender exactamente qué partes de esta molécula de antígeno estimulan los linfocitos T a través de la vía indirecta, y por lo tanto podrían ayudar a la síntesis de anticuerpos anti-HLA-A2 en estos pacientes. Por lo tanto, utilizando la bioinformática, se diseñó una serie de 60 péptidos de 15 unidades solapantes, que correspondía a diversas regiones de la molécula de HLA-A2, y que constituyó la base de un denominado "mapa epitópico". Se creía que este "mapa" de respuestas a HLA-A2 difería probablemente entre individuos, determinadas por elementos controlados genéticamente, tales como HLA-DR y la naturaleza de cualquier exposición previa a HLA-A2, es decir, sensibilización. Sorprendentemente, de los 60 péptidos solapantes que fueron diseñados, 7 péptidos no pudieron ser sintetizados por dificultades técnicas en el procedimiento de síntesis. Si bien los autores de la presente invención no desean vincularse a ninguna hipótesis, consideran que esto era una consecuencia del extremo carácter hidrófobo de los 7 péptidos no sintetizados.

Los autores de la presente invención estudiaron la bioquímica de los 53 péptidos, denominados p1-p53, que se sintetizaron a partir de HLA-A2, como se indica en la Figura 3 con el fin de observar cuáles eran más propensos a actuar como estimuladores a través de la ruta indirecta de alorreconocimiento mediante la unión a moléculas de clase II del MHC, en particular, HLA-DR. Utilizando un sistema basado en ELISA, los autores de la presente invención midieron la afinidad de unión de estos 53 péptidos solapantes a una serie de moléculas de clase II del MHC purificadas. Las diversas moléculas de clase II del MHC que se sometieron a ensayo fueron: DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DR51, DR52, DR53, DP0401, y DP0402. Los autores de la presente invención se sorprendieron al encontrar que los péptidos de varios lugares a lo largo de la molécula de HLA-A2 exhibieron unión promiscua al MHC de clase II. Los autores de la presente invención llevaron a cabo a continuación investigaciones *in vitro* utilizando 30 de los péptidos para estimular células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 27 pacientes inscritos para trasplante con historiales de sensibilización de anticuerpos conocidos. Algunos pacientes sometidos a ensayo habían sido previamente sensibilizados a HLA-A2, y por lo tanto produjeron anticuerpos anti-HLA-A2, otros pacientes no habían sido pre-sensibilizados a HLA-A2, sino a otros antígenos HLA, y otros no tenían anticuerpos anti-HLA-A2. Los sujetos también fueron estratificados de acuerdo con su propia expresión de HLA-A2. Por lo tanto, los autores de la presente invención esperaban determinar sistemáticamente los epitopos peptídicos para los que se había logrado una respuesta aloinmune indirecta. Estos formarían péptidos terapéuticos candidatos para el tratamiento de pacientes, para revertir y prevenir la sensibilización a HLA-A2. Con el fin de contar el número de células de los pacientes que elaboraron una respuesta, los autores de la presente invención utilizaron una técnica para detectar la producción de citoquinas a partir de una sola célula conocida como "elispot para interferón γ ".

Para su sorpresa, los autores de la presente invención encontraron que es probable que los péptidos que se derivaban de, y correspondían a ciertas regiones de la molécula de HLA-A2 tengan un efecto beneficioso en los pacientes de trasplante. Para su mayor sorpresa, los autores de la presente invención encontraron que es probable que los péptidos derivados del dominio $\alpha 3$ y/o los dominios transmembrana de HLA-A2 tengan un efecto beneficioso en los pacientes de trasplante. Por lo tanto, como resultado de estos datos, los autores de la presente invención consideran que son los primeros en descubrir y referir un primer uso médico para péptidos derivados de HLA-A2 o derivados o análogos de los mismos.

Los autores de la presente invención eligen HLA-A2 como antígeno diana para sus investigaciones, ya que éste es el tipo más común en el hombre (aproximadamente 50%). Plantean la hipótesis de que la inhibición de las células T coadyuvantes en la ruta de activación de células B específica de anti-HLA-A2 reduciría la síntesis de anticuerpos anti-HLA-A2. Por lo tanto, los autores de la presente invención consideran que el uso de un péptido derivado de HLA-A2 o un derivado o un análogo del mismo tendrá una muy amplia gama de usos terapéuticos. Por ejemplo, tales usos terapéuticos incluyen el tratamiento de afecciones médicas caracterizadas por alosensibilización, tal como en pacientes que requieren repetidas transfusiones de plaquetas.

Los autores de la presente invención también han demostrado que muchos de los polipéptidos derivados de HLA-A2 también se encuentran en otras proteínas de HLA del MHC de clase I, en particular HLA-B.

Por lo tanto, la invención proporciona:

- un polipéptido de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72; o un derivado o análogo de mismo que tiene menos de 30 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de más de 65% con dicha

secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72, y que se une a un HLA del MHC de clase II y activa una célula T específica para dicho polipéptido; para su uso en un método para tratar o prevenir el fracaso o el rechazo de aloinjertos;

- un polipéptido de entre 15 y 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72; o un derivado o análogo del mismo que tiene entre 15 y 30 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia mayor de 90% con dicha secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72, y que se une a un HLA del MHC de clase II y activa una célula T específica para dicho polipéptido.

La invención también proporciona:

- una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, derivado o análogo de acuerdo con la invención;
- una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, derivado o análogo de la invención o una molécula de ácido nucleico de la invención, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, derivado o análogo de la invención o una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- un método para estimular *in vitro* células T, comprendiendo el método poner en contacto las células T con:
 1. (a) un polipéptido, derivado o análogo de la invención; o
 2. (b) una molécula de ácido nucleico de la invención;

en condiciones que permitan la estimulación de las células T y estimulando de ese modo las células T.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra una representación de la estructura 3D de la porción extracelular de del MHC de clase I humano, HLA-A2, que muestra los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y transmembrana, y una microglobulina $\beta 2$ 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 estudios de afinidad de unión en el Ejemplo 1 de los 53 péptidos mostrados en la Figura 2 a una gama de moléculas del MHC II purificadas DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DR51-DRB5, DR52-DRB4, y DR53-DRB3

La Figura 5 muestra una representación esquemática de la porción extracelular del MHC de clase I humano, HLA-A2, y el péptido p39 (residuos 192-206 de HLA-A2).

La Figura 6 muestra una representación esquemática de la porción extracelular del MHC de clase I humano, HLA-A2, y los péptidos p50 (residuos 268 a 282 de HLA-A2) y p51 (residuos 270-284 de HLA-A2).

La Figura 7 muestra una representación esquemática de la porción extracelular del MHC de clase I humano, HLA-A2, y los péptidos p52 (residuos 280 a 294 de HLA-A2) y p53 (residuos 282-296 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 mostrados en la Figura 2 a una gama de moléculas de MHC II purificadas DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DR51-DRB5, DR52-DRB4 y DR53-DRB3. Las CI50 expresada en nM se evaluaron a partir de al menos tres experimentos independientes para cada uno de 53 péptidos diferentes. Los péptidos de referencia biotinilados fueron buenos aglutinantes para las moléculas HLA-DR y exhibieron la siguiente 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 (AAYAAAKAAALAA) 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: negativo para HLA-A2 con anticuerpos para HLA-A2; Grupo 2: negativo para HLA-A2 sin anticuerpos contra ningún HLA-A2; Grupo 3: negativo para HLA-A2 sin historial de formación de anticuerpos anti-HLA; Grupo 4: positivo para HLA-A2 sin anticuerpos contra ningún HLA-A2; Grupo 5: HLA-A2 positivo sin historial de formación de anticuerpos 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 anticuerpos contra el MHC de clase II (Tu39, Becton Dickinson, Oxford, Reino Unido). Se añadieron Anticuerpos contra HLA-DR (L243 Becton Dickinson) a $50 \mu\text{gml}^{-1}$ a la mayor concentración de 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 de elispot para interferón γ (Mabtech) o medio solo.

La Figura 12 muestra la proliferación de células T en respuesta a algunos de los péptidos en la Figura 2. Las frecuencias medias de elispot para interferón γ por 5×10^5 PBMC (eje y) para cada péptido o par de péptidos (eje x) se muestran para los individuos que elaboraron 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 para interferón γ (Mabtech). Los tipos de HLA-DR de los respondedores se muestran entre paréntesis.

La Figura 13 muestra una representación esquemática del péptido p39 (residuos 192-206 de HLA-A2). También muestra la diferencia o diferencias entre p39 y la secuencia correspondiente en diversos alelos de HLA-B.

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

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

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

Descripción de las secuencias

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

El SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno del MHC de clase I 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 2.

El SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de p2 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de p3 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de p4 en la figura 2.

El SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de p5 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de p6 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de p7 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de p8 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de p9 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de p10 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de p11 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de p12 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de p13 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de aminoácidos de p14 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos de p15 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de aminoácidos de p16 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de aminoácidos de p17 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de aminoácidos de p18 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de aminoácidos de p19 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de aminoácidos de p20 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia de aminoácidos de p21 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de aminoácidos de p22 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de aminoácidos de p23 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 27 muestra la secuencia de aminoácidos de p24 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de aminoácidos de p25 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de aminoácidos de p26 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 30 muestra la secuencia de aminoácidos de p27 en la Figura 2.

El SEQ ID NO: 31 muestra la secuencia de aminoácidos de p28 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 32 muestra la secuencia de aminoácidos de p29 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia de aminoácidos de p30 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 34 muestra la secuencia de aminoácidos de p31 en la Figura 2.
 5 El SEQ ID NO: 35 muestra la secuencia de aminoácidos de p32 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 36 muestra la secuencia de aminoácidos de p33 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 37 muestra la secuencia de aminoácidos de p34 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 38 muestra la secuencia de aminoácidos de p35 en la Figura 2.
 10 El SEQ ID NO: 39 muestra la secuencia de aminoácidos de p36 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 40 muestra la secuencia de aminoácidos de p37 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 41 muestra la secuencia de aminoácidos de p38 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de aminoácidos de p39 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 43 muestra la secuencia de aminoácidos de p40 en la Figura 2.
 15 El SEQ ID NO: 44 muestra la secuencia de aminoácidos de p41 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 45 muestra la secuencia de aminoácidos de p42 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 46 muestra la secuencia de aminoácidos de p43 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 47 muestra la secuencia de aminoácidos de p44 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 48 muestra la secuencia de aminoácidos de p45 en la Figura 2.
 20 El SEQ ID NO: 49 muestra la secuencia de aminoácidos de p46 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 50 muestra la secuencia de aminoácidos de p47 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 51 muestra la secuencia de aminoácidos de p48 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 52 muestra la secuencia de aminoácidos de p49 en la Figura 2.
 25 El SEQ ID NO: 53 muestra la secuencia de aminoácidos de p50 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 54 muestra la secuencia de aminoácidos de p51 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 55 muestra la secuencia de aminoácidos de p52 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 56 muestra la secuencia de aminoácidos de p53 en la Figura 2.
 El SEQ ID NO: 57 muestra la secuencia de aminoácidos de p50/51 (solapamiento de aminoácidos 268-282 y 270-284 del SEQ ID NO: 2).
 30 El SEQ ID NO: 58 muestra la secuencia de aminoácidos de p52/53 (solapamiento de 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 aminoácidos 239-253 y 241-256 del SEQ ID NO: 1).
 El SEQ ID NO: 60 muestra la secuencia de aminoácidos del análogo 1 de p39.
 35 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.
 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.
 40 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.
 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.
 45 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.
 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.
 50 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.
 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.
 55 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 p53.
 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.
 60 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
 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 análogo que codifica 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.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos

La invención proporciona un polipéptido que consiste en menos de 30 aminoácidos contiguos del dominio transmembrana de un antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o un derivado o análogo del mismo. La invención también se refiere al uso de dicho polipéptido, o un derivado o análogo del mismo, como medicamento.

Por medio del término "un HLA de clase I del MHC" utilizado en la presente memoria, los autores de la presente invención se refieren a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1), definido como un HLA de clase I del MHC en el 14^º International HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos una identidad de 50% con un producto génico codificado por un alelo del HLA de clase I del MHC humano (por ejemplo, identificado como SEQ ID NO: 3) y/u homólogos de HLA humanos de otras especies, o una variante o fragmento funcional del mismo. Más preferiblemente, el producto génico del HLA de clase I del MHC tiene al menos una identidad de 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% con los productos codificados por los alelos del HLA de clase I del MHC humano y/o homólogos del HLA de clase I del MHC humano de otras especies, o una variante o fragmento funcional del mismo. El HLA puede ser HLA-A, HLA-B o HLA-C.

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

Por ejemplo, la secuencia de proteína completa del antígeno de clase I del MHC humano, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101) se identifica como SEQ ID NO: 1. La secuencia madura de la proteína del antígeno de clase I del MHC 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 de clase I del MHC humano, HLA-A2, (es decir, el alelo HLA*020101) puede ser identificada como SEQ ID NO: 3.

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 bp; 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.

En realizaciones preferidas, el HLA es el HLA-A2. Por medio del término "HLA-A2" según se utiliza en la presente memoria, los autores de la presente invención se refieren a cualquier producto génico (por ejemplo, una proteína identificada como SEQ ID NO: 1 o 2), definida como HLA-A2 en el 14^º Internacional HLA & Immunogenetics Workshop, 2005. El producto génico puede comprender al menos una identidad de 50% 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 variante o fragmento funcional del mismo. Más preferiblemente, el producto génico de HLA-A2 tiene una identidad de al menos 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 80%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95%, y lo más preferiblemente 99% con los productos codificados por los alelos de HLA-A2 humanos y/o los homólogos de HLA-A2 humanos de otras especies, o una variante o fragmento funcional de los mismos.

En realizaciones preferidas, el HLA tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2.

Por medio del término "derivado de un HLA de clase I del MHC", los autores de la presente invención se refieren a un polipéptido, derivado o análogo, que comprende una secuencia de aminoácidos que forma un antígeno del clase I del MHC, HLA, y que es un derivado, análogo o modificación del mismo. En realizaciones preferidas, un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC es un fragmento o truncamiento de un HLA de clase I del MHC. Sorprendentemente, se ha demostrado que los péptidos o polipéptidos, o derivados o análogos derivados de HLA presentan actividad terapéutica y, en particular, se ha demostrado que son útiles para prevenir o minimizar el fracaso o rechazo de aloinjertos.

Por medio del término "derivado de HLA-A2", los autores de la presente invención se refieren a un polipéptido, derivado o análogo, que comprende una secuencia de aminoácidos que forma el antígeno de clase I del MHC, HLA-A2, y que es un derivado, análogo o modificación del mismo. En realizaciones preferidas, un polipéptido derivado de HLA-A2 es un fragmento o un truncamiento de HLA-A2. Sorprendentemente, se ha demostrado que los péptidos o polipéptidos, o derivados o análogos derivados de HLA-A2 presentan actividad terapéutica y, en particular, se ha demostrado que son útiles para prevenir o minimizar fracaso o rechazo de aloinjertos. Todos los SEQ ID NO: 1, 2 y 4 a 73 son polipéptidos que han sido obtenidos a partir de HLA-A2.

Por medio del término "derivado o análogo del mismo", los autores de la presente invención quieren significar que los residuos de aminoácidos del polipéptido derivado de la proteína HLA de clase I del MHC pueden ser remplazados por residuos (ya sean aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o miméticos de aminoácidos) con propiedades de las cadenas laterales o del esqueleto peptídico similares. Además, los extremos de tales péptidos pueden estar protegidos por grupos protectores N- o C-terminales con propiedades similares a los grupos acetilo o amida.

Del mismo modo, por medio del término "derivado o análogo del mismo", los autores de la presente invención quieren significar que los residuos de aminoácidos del polipéptido derivado de la proteína HLA-A2 pueden ser remplazados por residuos (ya sean aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o miméticos de aminoácidos) con propiedades de las cadenas laterales o del esqueleto peptídico similares. Adicionalmente, los extremos de tales péptidos pueden estar protegidos por grupos protectores N- o C-terminales con propiedades similares a los grupos acetilo o amida.

Los derivados y análogos pueden formarse realizando una o más mutaciones en la secuencia del polipéptido derivado de una proteína HLA de clase I del MHC (o HLA-A2). Las mutaciones pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Un derivado o análogo puede diferir del polipéptido en al menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de las secuencias mostradas en los SEQ ID NO: 1 o 2. Los ejemplos de los derivados y análogos incluyen todos los truncamientos, análogos, variantes, fragmentos y aloantígenos comentados con más detalle a continuación.

Un derivado o un análogo de un polipéptido, tal como un derivado o análogo de un polipéptido derivado de un antígeno de clase I del MHC o derivado de HLA-A2, se une a un HLA de clase II del MHC y activa una célula T específica para el polipéptido. En otras palabras, un derivado o un análogo de un polipéptido se unirán a un HLA de clase II del MHC y activarán una célula T que porta un receptor de células T que es específico para el polipéptido. Por ejemplo, un derivado o un análogo de un polipéptido derivado de HLA-A2 se unirán a un HLA de clase II del MHC y activarán una célula T que porta un receptor que es específico para el polipéptido derivado de HLA-A2. Una célula T es específica para un polipéptido o porta un receptor de células T que es específico para el polipéptido si se selecciona o clona mediante exposición al polipéptido. Los métodos para la selección o clonación de células T son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método adecuado lo describen Lamb et al., en J. Exp. Biol, 1983; 157: 1434-1447.

Un HLA de clase I del MHC 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 de HLA-A2, y que el dominio $\alpha 3$ y el dominio transmembrana definen una región sustancialmente no polimórfica de la molécula de 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 $\alpha 3$ por medio de interacciones no covalentes. En la Figura 1 no se muestra la presencia de un péptido corto 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 constituye el epítipo observado por las células T CD8+. Esta discusión sobre la estructura y función de los cinco dominios en HLA-A2 también se aplica a otros HLA de clase I del MHC, tales como HLA-B o HLA-C.

La molécula de proteína de HLA-A2 referida en la presente memoria se define por medio del SEQ ID NO: 1 o 2. La molécula de HLA-A2 comprende el dominio $\alpha 1$, el dominio $\alpha 2$, el dominio $\alpha 3$, el dominio transmembrana y el dominio citosólico. La molécula de HLA-A2 entera comprende 365 aminoácidos (SEQ ID NO: 1).

Los autores de la presente invención ha demostrado que los polipéptidos, o derivados o análogos derivados de la molécula de proteína HLA-A2 (es decir, menos de 365 aminoácidos) se pueden utilizar de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, el polipéptido, derivado o análogo del mismo utilizados de acuerdo con la invención comprenden un truncamiento del HLA de clase I del MHC entero. Preferiblemente, el polipéptido, derivado o análogo del mismo utilizados de acuerdo con la invención comprenden un truncamiento de la proteína entera de HLA-A2. La discusión de más abajo relativa a truncamientos se centra en truncamientos de HLA-A2. Sin embargo, tal discusión también se aplica a otros HLA de clase I del MHC, tales como HLA-B o HLA-C

Por medio del término "truncamiento", los autores de la presente invención quieren significar un polipéptido que corresponde a una región o fragmento de la proteína HLA-A2, pero que tiene un tamaño reducido mediante la eliminación de aminoácidos. La reducción de aminoácidos puede ser mediante la eliminación de residuos desde el extremo C o N del péptido, o puede ser mediante la delección de uno o más aminoácidos a partir del interior del núcleo de la molécula de HLA-A2 (es decir, aminoácidos 2-364 del SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, un péptido puede comprender una delección de 5, 10, 15, 20, o 25 residuos de aminoácidos de la molécula de HLA-A2 completa. Más preferiblemente, el péptido puede comprender una delección de 50, 75, 100, 125, 150, 200, 225, o 150 residuos de aminoácidos de la molécula de HLA-A2 completa.

Se prefiere que el polipéptido, derivado o análogo del mismo derivados de HLA-A2 comprendan menos de 30 aminoácidos, y más preferiblemente, menos de 20 aminoácidos, y lo más preferiblemente, aproximadamente 15 aminoácidos. Los autores de la presente invención consideran que la reducción del tamaño de HLA-A2 que todavía muestra un efecto terapéutico ayudaría al suministro terapéutico a un sujeto que esté siendo tratado.

Dado que los linfocitos T reconocen proteínas sobre la base de su secuencia primaria en forma de péptidos cortos unidos a moléculas del MHC, los autores de la presente invención consideran que los péptidos, derivados o análogos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para desensibilizar específicamente las respuestas de células T, sin el riesgo de exposición al "antígeno completo". Esto es particularmente ventajoso debido a que el antígeno completo o al menos una gran parte del antígeno con la estructura secundaria y/o terciaria puede a su vez causar sensibilización. Además, otro beneficio clínico observado en tal denominada terapia con péptidos es que los péptidos, derivados o análogos de los mismos que se obtienen de un HLA de clase I del MHC, tal como HLA-A2, pueden inducir las células T reguladoras que pueden ejercer un efecto negativo dominante, específico del antígeno sobre el sistema inmunitario. Otra ventaja significativa del uso de péptidos es que pueden ser liberados fácilmente sin la inducción de una señal de peligro, que podría promover la inmunidad productiva en el sujeto que esté siendo tratado.

Por lo tanto, el polipéptido o derivado o análogo del mismo derivado de la proteína HLA de clase I del MHC deriva del dominio transmembrana. Los polipéptidos, derivados o análogos de otros dominios se describen también en la presente memoria. Por ejemplo, un polipéptido o análogo descritos pueden derivar del dominio $\alpha 1$ y/o el dominio $\alpha 2$ de HLA-A2. Preferiblemente, un polipéptido o análogo descritos pueden derivar del dominio $\alpha 3$ y/o el dominio transmembrana de un HLA de clase I del MHC.

La invención proporciona específicamente un polipéptido que consiste en menos de 30 aminoácidos contiguos del dominio transmembrana de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo. En realizaciones preferidas, el polipéptido consiste en menos de 20 aminoácidos contiguos o aproximadamente 15 aminoácidos contiguos del dominio $\alpha 3$ y/o dominio transmembrana de un HLA de clase I del MHC. En otra realización preferida, el derivado o análogo tiene una identidad de secuencia mayor de 65% de identidad de secuencia con al menos 9 aminoácidos contiguos en el polipéptido. Las secuencias específicas descritas en la presente memoria (SEQ ID NOS: 42, 43, 48, 49 y 53 a 74) se comentan con más detalle a continuación.

También se describe un polipéptido o derivado o análogo del mismo derivados de la proteína HLA-A2 que deriva de un dominio seleccionado independientemente de un grupo de dominios de HLA-A2 que consisten en el dominio $\alpha 1$; el dominio $\alpha 2$; el dominio $\alpha 3$; el dominio transmembrana; el dominio citosólico; o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, un péptido o análogo descritos pueden derivar del dominio $\alpha 1$ y/o el dominio $\alpha 2$ de HLA-A2. Alternativamente, un péptido o análogo descritos pueden derivar del dominio $\alpha 3$ y/o el dominio transmembrana de HLA-A2.

En HLA-A2, el dominio $\alpha 1$ está codificado por el exón 2, es decir, nucleótidos 403 a 672 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, el polipéptido, derivado o análogo pueden comprender sustancialmente la secuencia de aminoácidos definida como residuos 1-90 del SEC ID NO: 2, y pueden ser codificados por los nucleótidos 403 a 672 del SEQ ID NO: 3. El dominio $\alpha 2$ está codificado por el exón 3, es decir, los nucleótidos 914 a 1189 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, el polipéptido, derivado o análogo pueden comprender sustancialmente la secuencia de aminoácidos definida como residuos 91-182 del SEQ ID NO: 2, y pueden ser codificados por los nucleótidos 914 a 1189 del SEQ ID NO: 3. El dominio $\alpha 3$ está codificado por el exón 4, es decir, los nucleótidos 1790 a 2065 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, el polipéptido, derivado o análogo pueden comprender sustancialmente la secuencia de aminoácidos definida como residuos 183 a 274 del SEQ ID NO: 2, y pueden ser codificados por los nucleótidos 1790 a 2065 del SEQ ID NO: 3. El dominio transmembrana está codificado por el exón 5, es decir, los nucleótidos 2165 a 2281 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, el polipéptido, derivado o análogo pueden comprender sustancialmente la secuencia de aminoácidos

definida como residuos 275 a 314 del SEQ ID NO: 2, y pueden ser codificados por los nucleótidos 2165 a 2281 del SEQ ID NO: 3.

Sorprendentemente, los resultados de los estudios de unión comentados los Ejemplos 1 y 2 revelaron un número significativo de polipéptidos que se unen de manera relativamente "promiscua" al 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 a un péptido de 17 aminoácidos que ha eluido de DR1. Los autores de la presente invención observaron una respuesta positiva en 10 de los 15 pacientes que habían elaborado anti-HLA-A2. Por lo tanto, un único péptido de 17 aminoácidos que se une de forma promiscua a moléculas de clase II del MHC es responsable de gran parte de la inmunogenicidad en esta región sea cual sea el MHC de clase II.

Por consiguiente, los autores de la presente invención consideran que se puede utilizar un único (o dos péptidos estrechamente solapados) en un régimen de tratamiento. Por lo tanto, en la presente memoria se describe un polipéptido, derivado o análogo que pueden derivar de una región sustancialmente polimórfica de una molécula de HLA de clase I de MHC, y más preferiblemente, de su dominio $\alpha 1$ y/o $\alpha 2$. Del mismo modo, el polipéptido, derivado o análogo descritos pueden derivar de una región sustancialmente polimórfica de la molécula HLA-A2, y más preferiblemente, de su dominio $\alpha 1$ y/o $\alpha 2$.

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 de 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 de 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 de HLA-A2. Este péptido se denomina p30 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1808.
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 de 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 de 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, los autores de la presente invención se sorprendieron al encontrar que un número significativo de individuos también responden a los péptidos derivados de cualquier 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. Los autores de la presente invención consideran que hasta la fecha no ha habido informes de respuestas inmunitarias a péptidos de las regiones al menos limitadas o sustancialmente no polimórficas de HLA-A2, y en particular, los dominios $\alpha 3$ y transmembrana de HLA-A2, o cualquier otra molécula de HLA, y, por consiguiente ningún informe o propuesta para su uso en terapias basadas en péptidos. Los autores de la presente invención también consideran que el uso de péptidos derivados de las regiones no polimórficas de HLA-A2 pueden tener una aplicabilidad más amplia que los derivados de las regiones polimórficas y por lo tanto únicas de HLA-A2. Debido a que tienen polimorfismo limitado, estos péptidos actúan como sitios de reactividad cruzada potencial entre diferentes moléculas de HLA.

Por lo tanto, los polipéptidos, derivados o análogos de los mismos preferidos de la invención derivan de una región sustancialmente limitada o no polimórfica de la molécula de HLA de clase I del MHC, tal como el dominio $\alpha 3$ y/o transmembrana: Se prefiere especialmente que los polipéptidos, derivados o análogos de los mismos utilizados de acuerdo con la invención deriven de una región sustancialmente limitada o no polimórfica de la molécula de HLA-A2. Preferiblemente, el polipéptido, derivado o análogo del mismo deriva del dominio $\alpha 3$ y/o transmembrana de HLA-A2.

Por lo tanto, algunos de los péptidos más preferidos utilizados de acuerdo con la invención comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

- (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 el dominio transmembrana de la molécula de 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 de HLA-A2. Este péptido se denomina p51 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1737.

(j) PTIPIVGIIAGLVLF (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 de transmembrana de la molécula de 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 de transmembrana de la molécula de HLA-A2. Este péptido se denomina p53 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1452.

Otros péptidos descritos en la presente memoria 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 de 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 de HLA-A2. Este péptido se denomina p40 cuando es referido en la presente memoria, y tiene un peso molecular de 1770.

(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 de 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 de 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. Los autores de la presente invención han encontrado que los péptidos que derivan de la región no polimórfica (es decir, dominios $\alpha 3$ y transmembrana) de HLA-A2 muestran una sorprendentemente alta frecuencia de respuesta en los pacientes que han elaborado anticuerpos contra HLA-A2 y respuestas significativas en algunos otros. Los autores de la presente invención consideran que estos no se han definido previamente como epítopos de células T, y son importantes porque tienen polimorfismo limitado.

Los autores de la presente invención también ha encontrado que el uso de polipéptidos, derivados o análogos, que comprenden regiones solapantes de cualquiera de los péptidos preferidos descritos en la presente memoria tienen un efecto terapéutico, y muestran una eficacia sorprendente para el tratamiento de afecciones caracterizadas por alo sensibilización, tales como, fracaso o rechazo del aloinjerto. Por lo tanto, se prefiere que los polipéptidos, derivados o análogos de los mismos deriven de las regiones no polimórficas de un HLA de clase I del MHC, tales como HLA-A2, comprendan secciones o regiones solapantes.

Por lo tanto, otros polipéptidos preferidos utilizados de acuerdo con la invención comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

(n) KPLTLRWEPSQPTIPI (SEQ ID NO: 57). Este péptido corresponde a los aminoácidos solapantes 268-282 y 270-284 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) PTIPIVGIIAGLVLFGA (SEQ ID NO: 58). Este péptido corresponde a los aminoácidos solapantes 280-294 y 282-296 de la proteína HLA-A2 (es decir SEQ ID NO: 2). Este péptido se denomina p52/53 cuando es referido en la presente memoria.

Otros péptidos descritos en la presente memoria comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

(p) GTFQKWAAVVPSGQEQR (SEQ ID NO: 59). Este péptido corresponde a los aminoácidos solapantes 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.

Por analogía con los anticuerpos anti-HLA, los autores de la presente invención consideran que los péptidos preferidos derivados de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana podrían ser referidos como epítopos 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 de los mismos que tienen potencial terapéutico.

A modo de ejemplo, como se muestra en las Figuras 5 y 13, la secuencia del péptido p39, es decir, 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, tras la administración de péptido p39 o un derivado o un análogo del mismo a un paciente, los autores de la presente invención consideran que éste es capaz de modular la

respuesta inmunitaria en un trasplante que porta *cualquiera* de estas moléculas de HLA, y no se limita solo a HLA-A2. Se apreciará que esto es una ventaja significativa de la utilización de dicho péptido, derivado o análogo en la terapia, debido a sus múltiples efectos, evitando así el rechazo o el fracaso de un aloinjerto que albergue una amplia gama de antígenos HLA.

Además, de manera similar, solo hay una única variante de la secuencia de p39 (SEQ ID NO: 42) expresada por todas las otras 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 el SEQ ID NO: 60. Por lo tanto, tras la administración del péptido p39 y un análogo del mismo que tiene la secuencia del SEQ ID NO: 60 (en la que la prolina reemplaza a la alanina en el residuo 193 y la isoleucina reemplaza a la valina en el residuo 194), los autores de la presente invención consideran que tal combinación tiene el potencial de modular la respuesta inmunitaria en un trasplante que porta todas las moléculas de HLA-A y la mayoría de las moléculas de HLA-B también.

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-B53, 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. En consecuencia, tras la administración del péptido p39 y un análogo del mismo que tiene la secuencia del SEQ ID NO: 61 (en la que la prolina reemplaza a la alanina en el residuo 193), los autores de la presente invención consideran que tal combinación tiene el potencial de modular la respuesta inmunitaria en un trasplante que porta una amplia gama de moléculas de HLA-A y algunas moléculas de HLA-B también.

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 el SEQ ID NO: 62. En consecuencia, tras la administración del péptido p39 y un análogo del mismo que tiene la secuencia del SEQ ID NO: 62 (en la que la prolina reemplaza a la alanina en el residuo 193 y la valina reemplaza a la alanina en el residuo 199), los autores de la presente invención consideran que tal combinación tiene el potencial de modular la respuesta inmunitaria en un trasplante que porta una amplia gama de moléculas de HLA-A, así como de HLA-B44.

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, tras la administración del péptido p40 o un derivado o un análogo del mismo a un paciente, los autores de la presente invención consideran que es capaz de modular la respuesta inmunitaria en un trasplante que porta *cualquiera* de estas moléculas HLA, y no se limita solo a HLA-A2. Se apreciará que esto es una ventaja significativa de la utilización de dicho péptido, derivado o análogo en la terapia, debido a sus múltiples efectos, evitando así el rechazo o el fracaso de un aloinjerto que albergue una amplia gama de antígenos 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 de HLA-B, como se indica en la Figura 14. Esta variante se denomina análogo de p40 y se muestra en el SEQ ID NO: 63. En consecuencia, tras la administración del péptido p40 y un análogo del mismo que tiene la secuencia del SEQ ID NO: 63 (en la que la glicina reemplaza a la serina en el residuo 207), los autores de la presente invención consideran que tal combinación tiene el potencial de modular la respuesta inmunitaria en un trasplante que porta una amplia gama de moléculas HLA-A y moléculas HLA-B también.

Además, 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 se compensan con solo 2 aminoácidos y por lo tanto 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 se compensan con solo 2 aminoácidos y por lo tanto abarcan un tramo de 17 aminoácidos. En ambos casos, los péptidos identificados no solo 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 sustituida por una prolina en el residuo 276 (para el tramo de 17 unidades 268-284; SEQ ID NO: 64) o una leucina es sustituida por una fenilalanina en 294 (para el tramo de 17 unidades 280-296; SEQ ID NO: 65), proporcionarían secuencias de péptidos que serían expresadas 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.

Otros análogos de p50/51 y p52/53 se describen en la Tabla 1 a continuación.

5

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 los 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,
		Valina en 293	45, 48-55, 58, 59, 73, 78, 82, 95
		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 en 293	
		Leucina en 294	
		Alanina en 295	
		Valina en 296	

10 Por lo tanto, tras la administración de una combinación de polipéptidos p50, p51, 52, y p53, o derivados o análogos de los mismos a un paciente, los autores de la presente invención consideran que ésta es capaz de modular la respuesta inmunitaria a un trasplante que porte cualquiera de estas moléculas de HLA.

15 Como resultará evidente, las combinaciones específicas de p39, p40, p50, p51, p50/51, p52, p53 y/o p52/53 y uno o más de sus análogos comentadas anteriormente tienen el potencial de modular la respuesta inmunitaria a un trasplante que porte todas las moléculas de HLA-A, así como todas las moléculas de HLA-B. Esto tiene la ventaja de utilizar el menor número posible de polipéptidos para modular la respuesta inmunitaria a un trasplante que porte cualquier molécula de HLA-A o HLA-B.

20 Por lo tanto, se apreciará a partir de lo anterior que los polipéptidos, derivados 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 solo HLA-A2, actuando como sitios de potencial reactividad cruzada entre diferentes moléculas HLA. Por lo tanto, sorprendentemente, los autores de la presente invención consideran que los beneficios de la utilización de dichos péptidos en los métodos de acuerdo con la invención, y en particular para usos en el tratamiento o la prevención de afecciones caracterizadas por alosensibilización, y en particular, el rechazo de aloinjertos, y la síntesis de aloanticuerpos, pueden ser mucho más amplios que para el antígeno HLA-A2 solo. Por consiguiente, los autores de la presente invención consideran que las implicaciones de sus hallazgos son mucho más amplias que solo ayudar a la producción de anticuerpos, sino que se refieren a mecanismos inmunológicos de rechazo del injerto *per se*, y son más amplios que HLA-A2 diana, extendiéndose a las respuestas a los antígenos de trasplante en general. Los polipéptidos utilizados de acuerdo con la invención pueden ser un aloantígeno, o un polipéptido derivado de allí, o un derivado o análogo del mismo. Preferiblemente, el aloantígeno, o polipéptido derivado de allí, o un derivado o

análogo del mismo se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en 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, y HLA-A23, o cualquier combinación de los mismos.

Los polipéptidos preferidos derivados del aloantígeno 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 derivados o análogos de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Se apreciará que estos polipéptidos derivan todos de HLA-A2. Además, los derivados o análogos eficaces de cualquiera de los polipéptidos definidos en la presente memoria también pueden ser utilizados de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar polipéptidos correspondientes de otros antígenos de la clase I del MCH, tales como HLA-B y HLA-C.

Los autores de la presente invención también consideran que varios análogos de cualquiera de los polipéptidos preferidos también pueden mostrar eficacia en la prevención o minimización de fracaso o el rechazo de aloinjertos, como se muestra en los alineamientos siguientes:

p39 (SEQ ID NO: 42)	HA V SDHEATLRCWAL
(q) análogo 1 de p39 (SEQ ID NO: 60)	HPISDHEATLRCWAL
p50 (SEQ ID NO: 53)	KPLTLRWE P SSQPTI
p51 (SEQ ID NO: 54)	LTLRWE P SSQPTIPI
(r) tramo de 17 unidades del análogo 1 (SEQ ID NO: 64)	KPLTLRWELSSQPTIPI
p52 (SEQ ID NO: 55)	PTIPIVGIIAGLVL F
p53 (SEQ ID NO: 56)	IPIVGIIAGLVLFGA
(s) tramo de 17 unidades del análogo 1 (SEQ ID NO: 65)	PTIPIVGIIAGLVLLGA
p40 (SEQ ID NO: 43)	RCWALSFYPAEITLT
(t) análogo p40 (SEQ ID NO: 63)	RCWALGFYPAEITLT
p45/46 (SEQ ID NO: 59)	GTFQKWA A VVVPSGQEQR
(u) análogo 1 de p45/46 (SEQ ID NO: 73)	GTFQKWA A VVVPSGEEQR
(v) análogo 2 de p45/46 (SEQ ID NO: 74)	GTFQKWASVVVPSGQEQR

Por lo tanto, los análogos preferidos utilizados de acuerdo con la invención comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

(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.

(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 de 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.

Otros análogos descritos en la presente memoria comprenden sustancialmente la secuencia de aminoácidos:

(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.

(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.

(u) GTFQKWA~~A~~VVVPSGEEQR (SEQ ID NO: 73). Este análogo deriva de 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 sustituye un residuo de ácido glutámico. Este análogo se denomina "análogo 1 de p45/p46" cuando es referido en la presente memoria.

(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 de p45/46" cuando es referido en la presente memoria.

Se apreciará que la invención se extiende al uso de cualquier polipéptido, derivado o análogo del mismo derivados de un HLA de clase I del MHC, que comprenden sustancialmente las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las secuencias referidas en la presente memoria, incluyendo las variantes funcionales, o sus fragmentos. También se apreciará que la invención se extiende al uso de cualquier polipéptido, derivado o análogo del mismo derivados de HLA-A2, que comprenden sustancialmente las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las secuencias referidas en la presente memoria, incluyendo las variantes funcionales, o sus fragmentos. Por medio de los términos "sustancialmente la secuencia de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos", "variante funcional" y "fragmento funcional", los autores de la presente invención quieren significar que la secuencia tiene al menos 40% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos de una cualquiera de las secuencias referidas en la presente memoria, por ejemplo, 40% de identidad con el gen *hla-a2* identificado como SEQ ID NO: 2, o 40% de identidad con la proteína HLA-A2 identificada como SEQ ID NO: 1 o 2. También se prevén secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos con una identidad de secuencia que es mayor que una identidad de secuencia de 65%, más preferiblemente, mayor de 70%, incluso más preferiblemente, mayor de 75%, y aún más preferiblemente, mayor de 80% con respecto a cualquiera de las secuencias referidas. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos tiene una identidad de 85% con cualquiera de las secuencias mencionadas, más preferiblemente 90% de identidad, incluso más preferiblemente 92% de identidad, incluso más preferiblemente 95% de identidad, incluso más preferiblemente 97% de identidad, incluso más preferiblemente 98% de identidad y, más preferiblemente, 99% de identidad con cualquiera de las secuencias referidas.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos se puede medir a lo largo de cualquier longitud de las secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos. Por ejemplo, la identidad se puede medir sobre la longitud completa de las secuencias. Alternativamente, la identidad se puede medir a lo largo de porciones de las secuencias. Tales porciones pueden ser al menos 350, al menos 300, al menos 250, al menos 200, al menos 150, al menos 100, al menos 50, al menos 30, al menos 20, al menos 15, al menos 10 o al menos 9 aminoácidos/nucleótidos contiguos de longitud.

El experto en la técnica apreciará cómo calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos, por ejemplo, como se describe en http://wikiomics.org/wiki/Percentage_identity. Con el fin de calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos, se debe preparar primero un alineamiento de las dos secuencias, seguido del cálculo del valor de identidad de secuencia.

El porcentaje de identidad de dos secuencias puede adoptar diferentes valores dependiendo de: - (i) el método utilizado para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementado en diferentes programas), o el alineamiento estructural de la comparación 3D; y (ii) los parámetros utilizados por el método de alineamiento, por ejemplo, alineamiento local vs global, la matriz de puntuación de pares utilizada (p. ej., BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.), y la penalización por hueco, p. ej., la forma y las constantes funcionales.

Después de haber realizado el alineamiento, hay muchas maneras diferentes de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, se puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud del alineamiento; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones sin hueco; o (iv) el número de posiciones de equivalencia excluidos los salientes. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende fuertemente de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto es un par de secuencias, mayor será la identidad de secuencia que se puede esperar que ocurra por casualidad.

Por lo tanto, se apreciará que el alineamiento exacto de proteínas o secuencias de ADN es un procedimiento complejo. El programa de alineamiento múltiple popular ClustalW (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) es una forma preferida para la generación de múltiples alineamientos de proteínas o de ADN de acuerdo con la invención. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineamientos de ADN: Penalización por apertura de huecos = 15,0, Penalización por extensión de huecos = 6,66, y Matriz = Identidad. Para alineamientos de proteínas: Penalización por apertura de huecos = 10,0, Penalización por extensión de huecos = 0,2, y Matriz = Gonnet. Para alineamientos de ADN y de proteínas: ENDGAP = -1, y GAPDIST = 4. Los expertos en la técnica serán conscientes de que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para el alineamiento de secuencia óptimo.

Preferiblemente, el cálculo de las identidades porcentuales entre dos secuencias de

aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos se calcula a continuación a partir de un alineamiento tal como $(N/T)*100$, donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas incluyendo los huecos, pero excluyendo los salientes. Por lo tanto, un método más preferido para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias comprende (i) preparar un alineamiento de secuencia utilizando el programa ClustalW utilizando un conjunto adecuado de parámetros, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente; y (ii) insertando los valores de N y T en la fórmula siguiente: Identidad de Secuencia = $(N/T)*100$.

Los derivados y análogos también pueden incluir sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas se pueden realizar de acuerdo con la Tabla 2. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse unos por otros:

Tabla 2 - Sustituciones conservativas que se pueden realizar de acuerdo con la invención

ALIFÁTICAS	No polares	GAP
		ILV
	Polares - no cargadas	CSTM
		NQ
	Polares - cargadas	DE
		KR
AROMÁTICAS		HFYW

Se pueden realizar modificaciones de los aminoácidos en el polipéptido derivado de un HLA de la clase I del MHC o derivado o análogo del mismo. También se apreciará que los aminoácidos modificados pueden ser sustituidos en péptidos derivados de HLA-A2, o derivados o análogos de los mismos con un número de variantes de aminoácidos que pueden ser conocidas por los expertos en la técnica para formar los derivados o análogos más preferidos de acuerdo con la invención. Tales péptidos derivados o análogos tendrán actividad anti-rechazo de aloinjerto siempre que la modificación no altere significativamente sus características químicas. Por ejemplo, los hidrógenos en las aminas de cadena lateral de R o K pueden ser sustituidos por grupos metileno ($-NH_2 \rightarrow NH(Me)$ o $N(Me)_2$). Además, el grupo amino N-terminal de los péptidos puede ser protegido mediante reacción con un ácido carboxílico y el grupo carboxilo C-terminal del péptido puede ser protegido mediante reacción con una amina. Otros ejemplos incluyen la glicosilación y la fosforilación.

Los análogos de los 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 la invención incluyen análogos peptoides de los péptidos, derivados de D-aminoácidos de los péptidos, e híbridos de péptido-peptoides.

Los polipéptidos utilizados de acuerdo con la invención pueden estar sujetos a degradación por una serie de medios (tales como actividad proteasa en sistemas biológicos). Tal degradación puede limitar la biodisponibilidad de los polipéptidos, y por lo tanto la capacidad de los polipéptidos para lograr su función biológica. Hay amplias gamas de técnicas bien establecidas por medio de las cuales se pueden diseñar o producir los análogos de polipéptidos o derivados que han mejorado la estabilidad en contextos biológicos. Tales derivados de polipéptidos pueden tener biodisponibilidad mejorada como resultado de una mayor resistencia a la degradación mediada por proteasas. Preferiblemente, un derivado de polipéptido o análogo adecuado para su uso de acuerdo con la invención es más resistente a proteasas que el polipéptido del que deriva. La resistencia a las proteasas de un derivado de polipéptido y el polipéptido del que deriva pueden evaluarse por medio de análisis de degradación de proteínas bien conocidos. A continuación se pueden comparar los valores relativos de resistencia a las proteasas para el derivado peptídico y el péptido.

Los análogos peptoides o derivados de los polipéptidos usados de acuerdo con la invención se pueden diseñar fácilmente a partir del conocimiento de la estructura del polipéptido. Se puede utilizar el soporte lógico disponible comercialmente para desarrollar derivados peptoides de acuerdo con protocolos bien establecidos.

Los retropeptoides, (en los que todos los aminoácidos se sustituyen por residuos peptoides en orden inverso), también son capaces de imitar péptidos derivados de HLA de la clase I del MHC o péptidos derivados de HLA-A2, o derivados o análogos de los mismos. Se espera que un retropeptido se una en la dirección opuesta en la ranura de unión al ligando, en comparación con un polipéptido o híbrido de peptido-péptido que contiene un residuo peptido. Como resultado, las cadenas laterales de los residuos peptoides son capaces de apuntar en la misma dirección que las cadenas laterales en el péptido original.

Una realización adicional de un análogo de un polipéptido utilizado de acuerdo con la invención comprende formas de D-aminoácidos del polipéptido. La preparación de polipéptidos usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos disminuye enormemente cualquier rotura no deseada de tal agente por procedimientos metabólicos normales, disminuyendo las cantidades de agente que se necesita administrar, junto con la frecuencia de su administración.

Los polipéptidos, derivados o análogos utilizados de acuerdo con la invención se pueden preparar sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, se puede producir un polipéptido recombinante mediante la transfección de células en cultivo con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido conectado operablemente a secuencias de control adecuadas, cultivar las células, extraer y purificar el polipéptido producido por las células. Los métodos para la producción recombinante de polipéptidos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook et al, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Harbour Laboratory Press).

Moléculas de ácido nucleico

Las prioridades de la invención proporcionan ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, derivado o análogo comentados anteriormente.

Se describen moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido, cuyo polipéptido forma un dominio HLA de la clase I del MHC que se selecciona independientemente de un grupo de dominios HLA de la clase I del MHC que consisten en el dominio $\alpha 1$; el dominio $\alpha 2$; el dominio $\alpha 3$; el dominio transmembrana; el dominio citosólico; o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede codificar el dominio $\alpha 1$ y/o el dominio $\alpha 2$ de un HLA de clase I del MHC. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico puede codificar el dominio $\alpha 3$ y/o el dominio transmembrana de un HLA de clase I del MHC.

Una molécula de ácido nucleico descrita puede codificar un polipéptido, cuyo polipéptido forma un dominio HLA-A2, que se selecciona independientemente de un grupo de dominios HLA-A2 que consisten en el dominio $\alpha 1$; el dominio $\alpha 2$; el dominio $\alpha 3$; el dominio transmembrana; el dominio citosólico; o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede codificar el dominio $\alpha 1$ y/o el dominio $\alpha 2$ de HLA-A2. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico puede codificar el dominio $\alpha 3$ y/o el dominio transmembrana de HLA-A2.

La secuencia de ácido nucleico del gen de HLA-A2 se identifica como SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, preferiblemente la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia sustancialmente como se representa mediante el SEQ ID NO: 3 (es decir, codifica toda la proteína HLA-A2 identificada por el SEQ ID NO: 1 o HLA-A2 madura mostrada en el SEQ ID NO: 2). La secuencia de ácido nucleico del dominio $\alpha 1$ está representada por los nucleótidos 403 a 672 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia sustancialmente como se representa mediante los nucleótidos 403 a 672 del SEQ ID NO: 3. La secuencia de ácido nucleico del dominio $\alpha 2$ está representada por los nucleótidos 914 a 1189 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia sustancialmente como se representa mediante los nucleótidos 914-1189 del SEQ ID NO: 3. La secuencia de ácido nucleico del dominio $\alpha 3$ está representada por los nucleótidos 1790 a 2065 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia representada por los nucleótidos 1790-2065 del SEC ID NO: 3. La secuencia de ácido nucleico del dominio transmembrana está representada por los nucleótidos 2165 - 2281 del SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico puede ser identificada mediante los nucleótidos 2165-2281 del SEC ID NO: 3.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidos codifican un péptido seleccionado independientemente entre un grupo de péptidos que consisten en: p50; p51; p52; p53; p50/51 y p52/53.

Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden sustancialmente la secuencia de nucleótidos:

(f) 5'-AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG GAG CCG TCT TCC CAG CCC ACC ATC-3' (SEQ ID NO: 80). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p50.

(g) 5'-CTC ACC CTG AGA TGG GAG CCG TCT TCC CAG CCC ACC ATC CCC ATC-3' (SEQ ID NO: 81). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p51.

(h) 5'-CCC ACC ATC CCC ATC GTG GGC ATC ATT GCT GGC CTG GTT CTC TTT-3' (SEQ ID NO: 82). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p52.

(i) 5'-ATC CCC ATC GTG GGC ATC ATT GCT GGC CTG GTT CTC TTT GGA GCT-3' (SEQ ID NO: 83). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p53.

(l) 5'-AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG GAG CCG TCT TCC CAG CCC ACC ATC CCC ATC-3' (SEQ ID NO: 86). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p50/51.

5'-CCC ACC ATC CCC ATC GTG GGC ATC ATT GCT GGC CTG GTT CTC TTT GGA GCT-3' (SEQ ID NO: 87). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p52/53.

Otras moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria comprenden sustancialmente la secuencia:

(a) 5'-CAC TCC ATG AGG TAT TTC TTC ACA TCC GTG TCC CGG CCC CGC GGC-3' (SEQ ID NO: 75).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p1.

(b) 5'-ATG AGG TAT TTC TTC ACA TCC GTG TCC CGG CCC GGC CGC GGG GAG-3' (SEQ ID NO: 76).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p2.

(c) 5'-CAC AAG TGG GAG GCG GCC CAT GTG GCG GAG CAG TTG AGA GCC TAC-3' (SEQ ID NO: 77).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p30.

(d) 5'-CAC GCT GTC TCT GAC CAT GAA GCC ACC CTG AGG TGC TGG GCC CTG-3' (SEQ ID NO: 78).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p39.

(e) 5'-AGG TGC TGG GCC CTG AGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ACA CTG ACC-3' (SEQ ID NO: 79).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p40.

(j) 5'-GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCG GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA CAG-3' (SEQ ID NO: 84).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p45.

(k) 5'-TTC CAG AAG TGG GCG GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA CAG GAG CAG AGA-3' (SEQ ID NO: 85). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p46.

(n) 5'-GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCG GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA CAG GAG CAG AGA-3' (SEQ ID NO: 88). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p45/46.

(o) 5'-TCG GAC TGG CGC TTC CTC CGC GGG TAC CAC CAG TAC GCC TAC GAC-3' (SEQ ID NO: 89). Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p20.

(p) 5'-TGG CGC TTC CTC CGC GGG TAC CAC CAG TAC GCC TAC GAC GGC AAG-3' (SEQ ID NO: 90).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el péptido p21.

Además, otras moléculas de ácido nucleico descritas codifican análogos de péptidos: análogo 1 de p39; análogo de p50/51; análogo 1 de p52/53; análogo de p40; análogo 1 de p45/P46; o análogo 2 de p45/46. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico preferidas utilizadas comprenden sustancialmente la secuencia de nucleótidos:

(r) 5'-AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG GAG CCT TCT TCC CAG CCC ACC ATC CCC ATC-3' (SEQ ID NO: 92). Esta molécula de ácido nucleico codifica el análogo peptídico, análogo 1 de p50/51.

5'-CCC ACC ATC CCC ATC GTG GGC ATC ATT GCT GGC CTG GTT CTC CTT GGA GCT-3' (SEQ ID NO: 93). Esta molécula de ácido nucleico codifica el análogo peptídico, análogo 1 de p52/53.

Otras moléculas de ácido nucleico descritas comprenden sustancialmente la secuencia:

(q) 5'-CAC CCC ATC TCT GAC CAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG GCC CTG-3' (SEQ ID NO: 91).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el análogo peptídico, análogo 1 de p39.

(t) 5'-AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ACA CTG ACC-3' (SEQ ID NO: 94).

Esta molécula de ácido nucleico codifica el análogo peptídico, análogo de p40.

(u) 5'-GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCG GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA GAG GAG CAG AGA-3' (SEQ ID NO: 95). Esta molécula de ácido nucleico codifica el análogo peptídico, análogo 1 de p45/46.

(v) 5'-GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCG TCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA CAG GAG CAG AGA-3' (SEQ ID NO: 96). Esta molécula de ácido nucleico codifica el análogo peptídico, análogo 2 de p45/46.

La molécula de ácido nucleico puede comprender una molécula de ácido nucleico aislada o purificada. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ADN. La molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente elementos capaces de controlar y/o mejorar su expresión. La molécula de ácido nucleico puede estar contenida dentro de un vector adecuado para formar un vector recombinante. El vector puede ser por ejemplo un plásmido, cósmido o fago.

Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional a este respecto los autores de la presente invención se refieren a Sambrook et al, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Harbour Laboratory Press.

Tales vectores recombinantes son altamente útiles en los sistemas de liberación para transformar células con la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, la invención proporciona una célula anfitriona que comprende un vector que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la invención proporciona una célula anfitriona que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo.

Los vectores recombinantes también pueden incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, los vectores recombinantes pueden ser diseñados de tal manera que el vector se replicará autónomamente en una célula. En este caso, en el vector recombinante se pueden requerir los elementos que inducen la replicación del ácido nucleico. Alternativamente, el vector recombinante se puede diseñar de tal manera que el vector y la molécula de ácido nucleico recombinante se integren en el genoma de una célula. En este caso, son deseables las secuencias de ácidos nucleicos, que favorecen la integración dirigida (p. ej., mediante recombinación homóloga). Los vectores recombinantes también pueden comprender ADN que codifica los genes que se pueden utilizar como marcadores seleccionables en el procedimiento de clonación. El vector recombinante también puede comprender adicionalmente un promotor o regulador para controlar la expresión del gen según sea necesario.

La molécula de ácido nucleico puede (pero no necesariamente) ser una, que se incorpora en el ADN de las células del sujeto que está siendo tratado. Las células no diferenciadas pueden ser transformadas de forma estable conduciendo a la producción de células hijas genéticamente modificadas (en cuyo caso se puede requerir la regulación de la expresión en el sujeto por ejemplo con factores de transcripción específicos o activadores de genes). Alternativamente, el sistema de liberación se puede diseñar para favorecer la transformación inestable o transitoria de células diferenciadas en el sujeto que está siendo tratado. Cuando este es el caso, la regulación de la expresión puede ser menos importante debido a que la expresión de la molécula de ADN se detendrá cuando las células transformadas mueran o dejen de expresar la proteína (idealmente cuando se haya logrado el efecto terapéutico requerido).

El sistema de liberación puede proporcionar la molécula de ácido nucleico al sujeto sin que se incorpore en un vector. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede ser incorporada dentro de un liposoma o partícula de virus. Alternativamente, una molécula de ácido nucleico "desnudo" se puede insertar en células de un sujeto por un medio adecuado, p. ej. captación por medio de endocitosis. La molécula de ácido nucleico se puede transferir a las células de un sujeto que se vaya a tratar mediante transfección, infección, microinyección, fusión celular, fusión de protoplastos o bombardeo balístico. Por ejemplo, la transferencia puede ser por transfección balística con partículas recubiertas de oro, liposomas que contienen la molécula de ácido nucleico, vectores virales (por ejemplo adenovirus) y medios para proporcionar la captación directa de ácido nucleico (por ejemplo, endocitosis) mediante aplicación de la molécula de ácido nucleico directamente.

Los métodos alternativos para identificar secuencias similares serán conocidos por los expertos en la técnica. En la presente memoria se describe una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo, o su complemento. También se describe una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo, o su complemento. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar será codificada por una secuencia que hibrida con las secuencias mostradas en el SEQ ID NO: 3 o sus complementos en condiciones rigurosas. Por condiciones rigurosas, los autores de la presente invención quieren significar que los nucleótidos hibridan con ADN o ARN unido a un filtro en 3x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de al menos un lavado en 0,2 X SSC/SDS al 0,1% a aproximadamente 20-65°C.

Debido a la degeneración del código genético, resulta evidente que se podría variar o cambiar cualquier secuencia de ácido nucleico sin afectar sustancialmente a la secuencia de la proteína codificada por el mismo, para proporcionar una variante funcional del mismo. Las variantes de nucleótidos adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprenden toda, o porciones de, la secuencia, que son alteradas por la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido que sustituye, para producir un cambio conservativo. Por ejemplo los aminoácidos hidrófobos no polares pequeños incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos hidrófobos no polares grandes, incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (alcalinos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por lo tanto, se apreciará que los aminoácidos pueden ser remplazados por un aminoácido que tiene propiedades biofísicas similares, y el experto en la técnica conoce las secuencias de nucleótidos que codifican estos aminoácidos. También se hace referencia a la Tabla 2 anterior.

Terapia

La invención también se refiere al uso de los polipéptidos, derivados, análogos y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria en terapia. En particular, la invención proporciona un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo, para uso como medicamento. La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, derivado o análogo de la invención para su uso como medicamento. La invención proporciona adicionalmente el uso de:

1. (a) al menos un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo; o
2. (b) al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, derivado o análogo de (a);

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección caracterizada por alosensibilización. Se puede utilizar cualquiera de los polipéptidos, derivados, análogos y ácidos nucleicos de la invención descritos anteriormente.

La invención también proporciona un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo para uso como medicamento. La invención también proporciona el uso de un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o

análogo del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una condición caracterizada por alosensibilización. La invención proporciona adicionalmente un método de tratamiento o prevención de una afección caracterizada por alosensibilización, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo.

Por consiguiente, en una realización más preferida, se proporciona un polipéptido derivado del dominio transmembrana de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo, para uso como un medicamento. Además, en otra realización más preferida, se proporciona el uso de un polipéptido derivado del dominio transmembrana de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección caracterizada por alosensibilización. Se prefiere especialmente que el medicamento sea para el tratamiento o la prevención del rechazo de aloinjertos.

Se apreciará que un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo, que se utiliza de acuerdo con la invención también representa agentes favorables susceptibles de ser administrados mediante técnicas de expresión celular de secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales moléculas. Tales métodos de expresión celular son particularmente adecuados para uso médico en el que los efectos terapéuticos de los péptidos derivados de HLA-A2 o derivados o análogos derivados de los mismos son requeridos durante un período prolongado. Por lo tanto, la invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo para uso como medicamento.

Además, la invención también proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por alosensibilización. Preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento de la prevención del fracaso o rechazo de aloinjerto.

Por medio del término "alosensibilización", los autores de la presente invención quieren significar el desarrollo de anticuerpos contra antígenos foráneos, lo que da como resultado diversas afecciones. A menudo los pacientes que sufren de tales afecciones requieren transfusiones de sangre repetidas. Sin embargo, la alosensibilización a menudo puede hacer casi imposible transfundir a los pacientes, y puede ser potencialmente mortal. Por lo tanto, las afecciones que se caracterizan por alosensibilización incluyen la talasemia, y las transfusiones de sangre

El HLA-A2 es conocido por ser un factor importante en el rechazo de trasplante de órganos, un problema médico en el que los autores de la presente invención estaban particularmente interesados, y, en consecuencia, los autores de la presente invención han encontrado que los péptidos derivados de HLA-A2 o los derivados o análogos de los mismos son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención del rechazo de aloinjertos.

Por medio del término "aloinjerto", los autores de la presente invención se refieren a un procedimiento de trasplante en el que un órgano o tejido se toma de un individuo (es decir, un donante) y se colocan en otro individuo genéticamente no idéntico (es decir, un receptor). Tanto el donante como el receptor son miembros de la misma especie. El término aloinjerto también puede ser usado para describir el tejido u órgano trasplantado.

Por medio del término "tejido", los autores de la presente invención quieren significar un grupo de células similares especializadas para realizar funciones similares, por ejemplo, músculo, nervio, hueso, cartílago, piel, o tejido conectivo.

Por medio del término "órgano", los autores de la presente invención quieren significar una estructura corporal que contiene diferentes tejidos que se organizan para llevar a cabo una función específica del organismo, por ejemplo, corazón, pulmones, cerebro, piel, hígado, etc.

Aunque los autores de la presente invención no desean vincularse a ninguna hipótesis, consideran que el uso de un polipéptido derivado de HLA-A2 u otros HLA de clase I del MHC, tales como HLA-B o HLA-C, o un derivado o un análogo del mismo, tendrá efectos beneficiosos sobre el resultado del trasplante, no solo mediante la inhibición de la formación de anticuerpos anti-HLA, sino también mediante la inhibición de otras vías reconocidas de rechazo de aloinjertos. Esto puede ocurrir no solo inhibiendo directamente la activación de ciertas células efectoras, que dañan el aloinjerto o los trasplantes de órganos, sino también mediante la activación de las células reguladoras que inhiben estas células efectoras. Por consiguiente, los autores de la presente invención consideran que los hallazgos sorprendentes referentes al patrón de reactividad con un péptido derivado de HL-A2 o un derivado o un análogo del mismo sugieren que tales péptidos o análogos pueden ser aprovechados en un método de tratamiento o terapia para prevenir afecciones caracterizadas por alosensibilización, por ejemplo, transfusión.

Los autores de la presente invención consideran que los hallazgos sorprendentes referentes al patrón de reactividad con un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo también sugieren que tales péptidos o análogos derivados de los mismos pueden ser aprovechados en un método para tratar o prevenir el rechazo de

aloinjertos en pacientes de trasplante, no solo cuando hay un órgano incompatible para HLA-A2, sino también en la mayoría de los casos de trasplante. Lo mismo se verifica para los polipéptidos derivados de otros HLA de clase I del MHC o derivados o análogos de los mismos. Por lo tanto, se prefiere especialmente que el método se utilice para tratar el rechazo de aloinjertos.

Los autores de la presente invención consideran que la identificación de tales epítomos basados en péptidos permite el desarrollo de una terapia basada en péptidos, que comprende administrar a un sujeto una mezcla de péptidos que podría ser utilizada en una variedad de individuos con diferentes epítomos del MHC de clase II.

Por consiguiente, se prefiere que el método de la invención comprenda administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polipéptido, o derivado o análogo del mismo, y preferiblemente, una pluralidad de polipéptidos, derivados o análogos de los mismos, que derivan de un HLA de clase I del MHC. Se pueden administrar al sujeto una combinación o mezcla de polipéptidos derivados de un HLA de clase I del MHC, o derivados o análogos de los mismos. Se pueden administrar una combinación o mezcla de cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente.

En consecuencia, se prefiere especialmente que el método de la invención comprenda administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polipéptido, o derivado o análogo del mismo, y preferiblemente, una pluralidad de polipéptidos, derivados o análogos de los mismos, que derivan de HLA-A2. Se puede administrar al sujeto una combinación o mezcla de polipéptidos derivados de HLA-A2, o derivados o análogos de los mismos.

El al menos un polipéptido, derivado o análogo, o una pluralidad de los mismos, se puede administrar a un paciente sensibilizado, es decir, uno que ha elaborado anticuerpos anti-HLA. Alternativamente, el al menos un polipéptido, derivado o análogo, o mezcla de los mismos, se pueden administrar a un individuo antes del trasplante o transfusión con el fin de anular la sensibilización a HLA. Al considerar la desensibilización, se puede esperar que los péptidos p39 (SEQ ID NO: 42), p50/51 (SEQ ID NO: 57) y p52/53 (SEQ ID NO: 58) beneficien a los individuos que no expresan estas secuencias por sí mismos, es decir, un sujeto que exprese HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A30 o HLA-A36, y que con posterioridad reciba (o que haya recibido previamente) trasplantes (o transfusiones) incompatibles que expresen 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.

Por lo tanto, se apreciará a partir de lo anterior que los polipéptidos, derivados 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 solo HLA-A2, actuando como sitios de potencial reactividad cruzada entre diferentes moléculas de HLA. Por lo tanto, sorprendentemente, los autores de la presente invención consideran que los beneficios de la utilización de dichos péptidos en los métodos de acuerdo con la invención, y en particular para usos en el tratamiento o la prevención de afecciones caracterizadas por alosensibilización, y en particular, el rechazo de aloinjertos, y la síntesis de aloanticuerpos, pueden ser mucho más amplios que los del antígeno HLA-A2 solo. Por consiguiente, los autores de la presente invención consideran que las implicaciones de sus hallazgos son mucho más amplias que solo como ayuda para la producción de anticuerpos, sino que se refieren a los mecanismos inmunológicos de rechazo del injerto *per se*, y son más amplias que el HLA-A2 diana, extendiéndose a las respuestas a los antígenos de trasplante en general.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, se proporciona el uso de un aloantígeno, o un polipéptido derivado del mismo, o un derivado o análogo del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección caracterizada por alosensibilización. Preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento del rechazo de aloinjertos. Preferiblemente, el aloantígeno, o polipéptido derivado de allí, o el derivado o análogo del mismo se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en 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, y HLA-A23, o cualquier combinación de los mismos. Los polipéptidos preferidos derivados del aloantígeno se han comentado anteriormente.

La cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido derivado del HLA de clase I del MHC, tal como HLA-A2, o un análogo o derivado del mismo, se puede administrar al sujeto después de que el sujeto haya recibido un aloinjerto, o un trasplante o una transfusión. Sin embargo, es más preferida su administración al sujeto antes de que el sujeto haya recibido un aloinjerto, o trasplante, o transfusión. Por lo tanto, preferiblemente, el medicamento se administra a un sujeto antes de la exposición al antígeno, por ejemplo en el momento de la inclusión del trasplante o la transfusión. Por lo tanto, el método comprende eficazmente la administración de una vacuna o la llamada "vacuna negativa" que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo. El método también comprende la administración eficaz de una vacuna o la llamada "vacuna negativa" que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo.

Por lo tanto, se proporciona una vacuna que comprende un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo. También se proporciona una vacuna que comprende un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo.

5 Los autores de la presente invención consideran que un curso de tratamiento se llevaría a cabo con dosis progresivamente más altas de la "vacuna negativa", a intervalos aproximadamente semanales (pero se puede administrar diariamente, o cada dos días, por ejemplo), en el transcurso de aproximadamente 1 a 6 meses. La cantidad de polipéptido, derivado o análogo administrada puede estar en la región de aproximadamente 1 µg a 1 mg.

10 Se apreciará que la invención está destinada a la prevención o el tratamiento de una afección caracterizada por alosensibilización, rechazo de un aloinjerto, o aloinmunización secundaria a la transfusión. Es práctica común trasplantar tejidos u órganos de un sujeto donante a un sujeto receptor. Por lo tanto, la invención se extiende al tratamiento o prevención de la insuficiencia o el rechazo de cualquier tejido, tal como músculo, nervio, hueso, médula ósea, cartílago, piel, o tejido conectivo, o cualquier órgano como corazón, pulmones, cerebro, piel, hígado, etc., o aloinmunización secundaria a la transfusión.

15 Sin embargo, los autores de la presente invención centraron su investigación en pacientes que sufren de insuficiencia renal en fase terminal. Por lo tanto, se prefiere especialmente que el medicamento pueda ser utilizado para el tratamiento o la prevención del rechazo de un trasplante de riñón, o aloinmunización secundaria a tal trasplante de riñón, o antes de la transfusión. Además, el sujeto que está siendo tratado en el método de la invención puede estar sufriendo de rechazo del riñón trasplantado. Por consiguiente, se prefiere que el aloinjerto o el trasplante comprendan un riñón o una porción del mismo.

20 La siguiente discusión referente a la monoterapia, la terapia combinada, el momento de la administración, las composiciones, las rutas de administración, los dispositivos de liberación y las dosificaciones se refiere a polipéptidos derivados de HLA-A2, o derivados o análogos de los mismos. Sin embargo, también se aplica a polipéptidos derivados de otros HLA de clase I del MHC, tales como HLA-B o HLA-C, derivados o análogos de los mismos, y los ácidos nucleicos que los codifican.

25 Se apreciará que el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o molécula de ácido nucleico que codifica HLA-A2 o un polipéptido, derivado o análogo del mismo, se pueden utilizar en una monoterapia (es decir, uso de un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o una molécula de ácido nucleico que lo codifica solo para prevenir y/o tratar un fracaso o rechazo de aloinjerto). Alternativamente, un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico que lo codifica se pueden utilizar como complemento, o combinados con terapias conocidas para el tratamiento de una afección caracterizada por alosensibilización, tal como, el rechazo de aloinjertos, o la prevención de alosensibilización, tal como inmunosupresión convencional con inhibidores de calcineurina, inhibidores de TOR o anticuerpos dirigidos a antígenos linfocitarios.

30 Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo se puede administrar al sujeto después de que el sujeto haya recibido un aloinjerto o trasplante. Alternativamente, el al menos un péptido o mezcla de los mismos se pueden administrar a un sujeto profilácticamente, es decir, para atenuar las respuestas a HLA.

35 Aunque los autores de la presente invención no desean vincularse a ninguna hipótesis, consideran que si el mecanismo de atenuación implica la regulación negativa dominante, esto puede también disminuir la respuesta a otros antígenos incompatibles, por ejemplo, cuando se implanta un trasplante incompatible de HLA-A2. Por lo tanto, se prefiere que una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo se administre al sujeto antes de que el sujeto haya recibido un aloinjerto o trasplante, es decir, similar a una vacunación.

40 Los autores de la presente invención contemplan la administración a un sujeto de al menos uno, y preferiblemente una pluralidad de péptidos derivados de HLA-A2 o derivados o análogos de los mismos. Los autores de la presente invención consideran que el péptido o cada péptido, derivado o análogo del mismo se pueden utilizar para regular a la baja la respuesta a aloantígenos, y por lo tanto mejorar el resultado del trasplante y/o permitir la desensibilización de los pacientes que han elaborados anticuerpos anti-HLA.

45 El polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo se pueden combinar en composiciones que tienen varias formas diferentes dependiendo, en particular, en la manera en la que se vaya a utilizar la composición.

Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un polvo, comprimido, cápsula, líquido, pomada, crema, gel,

hidrogel, aerosol, pulverización, micela, parche transdérmico, liposoma o cualquier otra forma adecuada que se pueda administrar a un sujeto que necesite tratamiento. Se apreciará que el vehículo de la composición de la invención debe ser uno que sea bien tolerado por el sujeto al que se administra, y preferiblemente permita la liberación del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo al sistema inmunológico. El vehículo de la composición de la invención debe ser uno que sea bien tolerado por el sujeto al que se administra, y preferiblemente permita la liberación del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo al sistema inmunológico.

Las composiciones que comprenden un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo utilizado de acuerdo con la invención se pueden utilizar de varias maneras. Por ejemplo, puede ser necesaria la administración oral en cuyo caso el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico pueden estar contenidos dentro de una composición que puede, por ejemplo, ser ingerida oralmente en forma de un comprimido, cápsula o líquido. La composición que comprende el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico se puede administrar mediante inhalación (por ejemplo, por vía intranasal). Las composiciones se pueden formular para uso tópico. Por ejemplo, las pomadas pueden ser aplicadas a la piel.

El polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico también se pueden incorporar dentro de un dispositivo de liberación lenta o retardada. Tales dispositivos se pueden, por ejemplo, insertar en o bajo la piel, y la composición puede ser liberada durante semanas o incluso meses. Tales dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiere el tratamiento a largo plazo con polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico utilizados de acuerdo con la invención y que normalmente requeriría la administración frecuente (p. ej. al menos una inyección diaria).

Sin embargo, en una realización más preferida, la composición que comprende un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico se administra a un sujeto que necesite tal tratamiento mediante inyección en el torrente sanguíneo. Las inyecciones pueden ser intravenosa (bolo o infusión) o subcutánea (bolo o infusión), o intradérmica (bolo o infusión).

Se apreciará que la cantidad requerida de polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico está determinada por su actividad biológica y biodisponibilidad que a su vez depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico empleados y de qué polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico esté siendo utilizando como una monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también se verá influida por los factores mencionados anteriormente y particularmente la vida media del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico dentro del sujeto que esté siendo tratado.

Las dosificaciones óptimas que se van a administrar pueden ser determinadas por los expertos en la técnica, y variarán con el polipéptido concreto derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico en uso, la fuerza de la preparación, el modo de administración, y el avance de la afección. Los factores adicionales dependiendo del sujeto particular que esté siendo tratado darán como resultado una necesidad de ajustar las dosificaciones, incluyendo la edad del sujeto, el peso, el sexo, la dieta y el tiempo de administración.

Se puede utilizar procedimientos conocidos, tales como los empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (p. ej., experimentación *in vivo*, pruebas clínicas, etc.), para establecer formulaciones específicas de polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico utilizados de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (tales como dosis diarias del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico y la frecuencia de administración).

Generalmente, se puede utilizar una dosis diaria de entre 0,001 µg/kg de peso corporal y 100 µg/kg de peso corporal del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico para la prevención y/o tratamiento del fracaso o el rechazo de aloinjertos, dependiendo de qué polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo específico del mismo o molécula de ácido nucleico se utilice. Más preferiblemente, la dosis diaria se encuentra entre 0,01 µg/kg de peso corporal y 10 µg/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente, entre aproximadamente 0,01 µg/kg y 1 µg/kg.

Las dosis diarias se pueden administrar en forma de una sola administración (p. ej., una sola inyección diaria). Alternativamente, el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico utilizados pueden requerir la administración dos veces o más veces durante un día. Como ejemplo, el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico se pueden

administrar en forma de dos (o más dependiendo de la gravedad de la afección) dosis diarias de entre 0,07 µg y 7000 µg (es decir, suponiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis al despertar y luego una segunda dosis por la noche (si es un régimen de dos dosis) o a intervalos de 3 o 4 horas después de eso. Alternativamente, se puede utilizar un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas a un paciente sin la necesidad de administrar dosis repetidas.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, derivado o análogo de la invención o una molécula de ácido nucleico de la invención, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona preferiblemente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, o la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, y opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender uno o más de cualquiera de los polipéptidos, derivados, análogos o ácidos nucleicos comentados anteriormente.

La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, derivado o análogo de la invención o una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona preferiblemente un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La siguiente discusión concerniente a las cantidades, los vehículos y las rutas de administración se refiere a polipéptidos derivados de HLA-A2, o derivados o análogos de los mismos. Sin embargo, también se aplica a los polipéptidos derivados de otros HLA de clase I del MHC, tales como HLA-B o HLA-C, derivados o análogos de los mismos, y ácidos nucleicos que los codifican.

La cantidad del polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico puede ser de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 800 µg y preferiblemente, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 µg. Se prefiere que la cantidad de polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico sea una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg, más preferiblemente, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg, y más preferiblemente, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad de polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico que, cuando se administra a un sujeto proporciona la prevención y/o el tratamiento de una afección caracterizada por alo sensibilización, tal como, fracaso o rechazo de aloinjertos. Un "sujeto" puede ser un vertebrado, mamífero, o un animal doméstico, y es preferiblemente, un ser humano.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se denomina en la presente memoria es cualquier vehículo fisiológico conocido por los expertos normales en la técnica útil en la formulación de composiciones farmacéuticas. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido y la composición puede estar en forma de un polvo o un comprimido. Un vehículo sólido farmacéuticamente aceptable puede incluir una o más sustancias que pueden actuar también como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, antiapelmazantes, coadyuvantes de compresión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material de encapsulación. En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está mezclado con el polipéptido activo finamente dividido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico. En los comprimidos, el polipéptido activo derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico se mezcla con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente hasta 99% del polipéptido activo derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidona, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico. En otra realización, el vehículo farmacéutico puede ser un gel y la composición puede estar en forma de una crema o similares.

Sin embargo, en una realización preferida, el vehículo farmacéutico es un líquido y la composición farmacéutica está en forma de una solución. Los vehículos líquidos se utilizan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El polipéptido activo derivado de HLA-A2 o derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico pueden ser disueltos o suspendidos en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmo-reguladores. Los

ejemplos adecuados de vehículos líquidos para la administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos como los anteriores, p. ej., derivados de celulosa, preferiblemente solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohidroxilados y alcoholes polihidroxilados, p. ej. glicoles) y sus derivados, y aceites (p. ej., aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para la administración parenteral, el vehículo también puede ser un éster oleoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones estériles en forma líquida para la administración parenteral. El vehículo líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intravenosa y particularmente subcutánea, intracerebral o intracerebroventricular. El polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico se pueden preparar en forma de una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse en el momento de la administración utilizando agua estéril, solución salina, u otro medio inyectable estéril apropiado. Se pretende que los vehículos incluyan aglutinantes necesarios e inertes, agentes de suspensión, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes, conservantes, colorantes, y recubrimientos.

El polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico pueden ser administrados oralmente en forma de una solución o suspensión estéril que contiene otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, suficiente solución salina o glucosa para hacer la solución isotónica), sales biliares, acacia, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares.

El polipéptido derivado de HLA-A2 o un derivado o análogo del mismo o molécula de ácido nucleico utilizados de acuerdo con la invención también se pueden administrar por vía oral en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos, y formas líquidas, tales como soluciones, jarabes, elixires, y suspensiones. Las formas útiles para administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones y suspensiones estériles.

Agentes que incrementan la actividad de HLA

Se apreciará que los efectos terapéuticos de polipéptidos derivados de HLA-A2 o derivados o análogos de los mismos pueden estar mediados "indirectamente" por agentes que incrementan la actividad de dichos péptidos o análogos. Por lo tanto, se describe también el primer uso médico de tales agentes.

Por lo tanto, también se describe un agente capaz de incrementar la actividad biológica de un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo, para su uso como un medicamento.

Los agentes capaces de incrementar la actividad biológica de los péptidos derivados de HLA-A2 o derivados o análogos de los mismos pueden lograr su efecto mediante diferentes medios. Por ejemplo, dichos agentes pueden incrementar la expresión de los péptidos derivados de HLA-A2, o derivados o análogos de los mismos. Alternativamente, o adicionalmente, dichos agentes pueden incrementar la vida media de un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo en un sistema biológico, por ejemplo, mediante la disminución del recambio de los péptidos derivados de HLA-A2 o derivados o análogos de los mismos. Debido a su aumento de actividad biológica, un polipéptido derivado de HLA-A2, o un derivado o análogo del mismo tienen utilidad como agentes anti-rechazo de aloinjertos.

Métodos in vitro

La invención también proporciona un método *in vitro* de estimulación de células T, comprendiendo el método poner en contacto las células T con:

1. (a) un polipéptido derivado de un HLA de clase I del MHC, o un derivado o análogo del mismo; o
2. (b) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, derivado o análogo de (a);

en condiciones que permitan la estimulación de las células T y estimulando de este modo las células T.

Cualquiera de los polipéptidos, derivados, análogos o ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden utilizarse en este método. Las condiciones adecuadas para la estimulación de células T son conocidas en la técnica.

Este método de la invención tiene diversos usos. Por ejemplo, el método podría llevarse a cabo sobre una muestra de células T de los pacientes de trasplante que experimenten un rechazo crónico del injerto. Una respuesta positiva de las células T del paciente a los polipéptidos derivados de HLA podría sugerir que el rechazo crónico implica un componente del sistema inmunitario. Una respuesta negativa de las células T del paciente a los polipéptidos

derivados de HLA podría sugerir que el rechazo crónico es debido a un mecanismo no basado en el sistema inmunitario, tal como nefrotoxicidad por ciclosporina.

Todas las características descritas en la presente memoria (incluyendo reivindicación, resumen y dibujos adjuntos cualesquiera), y/o todas las etapas de cualquier método o procedimiento así descritos, se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de tales características y/o pasos sean mutuamente excluyentes.

Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo se pueden llevar a efecto las realizaciones de la misma, se hará ahora referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Información general

Los autores de la presente invención comprendieron que la presencia de anticuerpos anti-HLA contraindica el trasplante renal, y el post-trasplante está asociado con fracaso del aloinjerto. Además, la adquisición de anticuerpo específico contra HLA implica a las células T coadyuvantes a través de alorreconocimiento indirecto, y esta ruta también juega un papel en el rechazo independiente a la síntesis de aloanticuerpos. Los autores de la presente invención estudiaron sistemáticamente por lo tanto las respuestas a una sola molécula de MHC de clase I, HLA-A2, que es un antígeno diana común en pacientes sensibilizados en la lista de espera de trasplante de órganos, es decir, pacientes que han elaborado anticuerpos HLA-A2.

En ambos Ejemplos 1 y 2, los autores de la presente invención diseñaron una serie de 60 péptidos de 15 unidades solapantes que abarcaban la secuencia primaria de HLA*020101. Sin embargo, solo 53 (p1-p53) se pudo sintetizar utilizando la tecnología F-moc. La afinidad de unión de estos 53 péptidos a 13 diferentes moléculas de MHC de clase II se estudió a continuación mediante ELISA. Los autores de la presente invención encontraron que los péptidos de varias localizaciones a lo largo de la molécula de HLA-A2 mostraron unión promiscua al MHC.

Los 30 péptidos que se unían al MHC de clase II se utilizaron a continuación para estimular las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 40 pacientes inscritos para trasplante con historiales de sensibilización de anticuerpos conocidos. Las respuestas fueron evaluadas mediante elispot para interferón γ , y los resultados se resumen a continuación.

En el Ejemplo 3, los autores de la presente invención compararon la secuencia de algunos de los péptidos de 15 unidades de HLA-A2 con secuencias en otros polipéptidos de HLA para encontrar las secuencias adicionales de relevancia.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

1) Predicción de epítipo in silico

Con el fin de minimizar el número de péptidos que se van a escrutar en ensayos de unión directa de MHC-péptido y para maximizar la discriminación en las zonas que probablemente puedan ser de interés, se adoptó un enfoque sistemático que implica una evaluación computarizada inicial de la secuencia de aminoácidos primaria de la molécula de HLA-A*0201, es decir HLA-A2. La secuencia de ADN de HLA-A2 se identifica como SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos se identifica como los SEQ ID NO: 1 y 2.

Haciendo referencia 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 anchas (apuntando del extremo N al C). Las regiones de la 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 $\alpha 3$ solo por interacciones no covalentes. No se muestra en la Figura 1 la presencia de un péptido corto unido de forma no covalente en la ranura entre las hélices alfa de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. La combinación de péptido y porciones adyacentes de hélices alfa constituye el epítipo observado por las células T CD8+. No se muestran la porción transmembrana ni citosólica de la molécula de HLA-A2, pero se apreciará que la porción transmembrana se extiende desde aproximadamente el residuo de aminoácido 283 en adelante.

Se realizó el análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de la molécula de HLA-A2 utilizando el algoritmo TEPITOPE ampliamente disponible (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). El

programa se utilizó para identificar secuencias que compartían motivos de unión a HLA con epítomos previamente identificados y caracterizados. Sin embargo, debido a que tales enfoques *in silico* pueden omitir epítomos que no se ajustan a los motivos convencionales, los autores de la presente invención realizaron búsquedas adicionales en la bibliografía y las base de datos con el fin de identificar todas las secuencias de unión al MHC de clase II previamente referidas de la molécula de HLA-A2.

2) Análisis de solubilidad

Se evaluaron las secuencias pronosticadas para unirse a moléculas de clase II del MHC para determinar la solubilidad utilizando algoritmos predictivos basados en ordenador, tales como el de EXPASY (www.expasy.org/). Los autores de la presente invención consideran que este tipo de análisis de solubilidad fue un importante precursor de los análisis de unión física ya que permitió la identificación de cualquier secuencia de péptidos que contuviera motivos núcleo de unión a MHC importantes, procesados de forma natural, pero nominalmente insolubles. Con frecuencia, tales epítomos se pueden volver solubles mediante la adición de diversos residuos flanqueantes que se producen naturalmente en la proteína de origen (HLA-A*0201 en este caso). Este enfoque evitó la síntesis de péptidos que consume tiempo y es costosa que no generaría datos en ensayos de unión al MHC, y por lo tanto sería en última instancia de poca utilidad 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. Sin embargo, solo se pudo sintetizar 53 (p1-p53). Por lo tanto, se generó una serie de 53 tramos de 15 unidades solapantes sintéticos compensados por 2 a 5 residuos, correspondiente a motivos de unión al MHC de clase II solubles, en forma de sales de HCl mediante química Fmoc convencional y se suministró en forma de un polvo liofilizado (NeoMPS SA, Estrasburgo, Francia). Los péptidos se reconstituyeron en HCl 10^{-4} M.

Haciendo referencia a la Figura 2, se muestran detalles de todos los 53 péptidos, denominados 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 ensayo competitivo en el que los péptidos "problema" se titulan en pocillos que contienen moléculas del MHC purificadas, inmovilizadas, y concentraciones conocidas de péptidos biotinilados de referencia que se sabe que se unen a la molécula en cuestión con alta afinidad.

Las moléculas del MHC para los estudios fueron: 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 (DRB%); HLA-DPA1*0103/DPB1*0401 (DP401) y HLA-DPA1*0103/DPB1*0402 (DP402). Estos se llevaron a cabo en el CEA-Saclay utilizando técnicas que están bien establecidas en su laboratorio 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 distintas para ajustar los resultados. Los resultados se expresaron como CI50 nm y como la razón de unión de cada péptido en comparación con un péptido de referencia (también escrutado en el análisis) de unión de alta afinidad conocida para cada alelo del MHC concreto.

Razones de unión de menos de 20 se consideran ligadores de alta afinidad y aquellos con una proporción de 21-100, ligadores moderados. Los datos anteriores indican que importantes epítomos de células T solo en raras ocasiones tienen afinidades de unión fuera de estas ventanas, aunque hay excepciones.

Haciendo referencia a la Figura 4, se muestran los datos generados por los estudios de unión. 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 bajo 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 se unieron a al menos una molécula del MHC de clase II, aunque un número limitado mostró unión promiscua. Sobre la base de estos estudios, el número de péptidos para estudios futuros se redujo de 53 a 30. Veintitrés péptidos que mostraron poca o ninguna unión significativa al MHC de clase II, que es la razón a la que su afinidad de unión con respecto a la del péptido de control fue >100 , no se estudiaron adicionalmente. Esto se llevó a cabo con el fin de limitar la cantidad de sangre que se requería de cada paciente bajo estudio.

La presencia de linfocitos específicos para cualquier péptido dado se determinó usando elispot para interferón γ y con

500.000 células mononucleares de sangre periférica por pocillo por cuadruplicado. (Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron de la sangre completa heparinizada por medio de centrifugación en gradiente de densidad. Éstas 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 de elispot para interferón y de 96 pocillos (Mabtech, Nacka Strand, Suecia) en 100 µl de medio completo, con el péptido a una concentración de 4 µg y 20 µg/ml. La frecuencia de células productoras de interferón y se evaluó mediante elispot, como se muestra en la Figura 7 para un solo paciente ejemplo. A continuación, la frecuencia y la especificidad de las respuestas específicas de péptidos se compararon entre los individuos en los grupos sensibilizados y no sensibilizados.

6) Reclutamiento de los sujetos para su estudio

Los sujetos paciente se reclutaron de la lista de espera para trasplante renal del Hospital Universitario de Birmingham. Los pacientes en diálisis en el Hospital Universitario de Birmingham fueron abordados inicialmente, tras la recepción de la aprobación del comité ético de investigación local. Se excluyeron los sujetos que actualmente recibían inmunosupresión o que tenían una hemoglobina <10 g/dl. Después de haber obtenido el consentimiento plenamente informado, se obtuvieron 50 ml de sangre venosa en el momento de la venisección rutinaria.

El tipo de HLA determinado por medio de técnicas moleculares convencionales estuvo disponible para cada sujeto a partir de la evaluación clínica rutinaria por el West Midlands Blood Transfusion Service Immunogenetics Laboratory. Este laboratorio caracteriza especificidades de anticuerpos anti-HLA utilizando técnicas basadas en citometría de flujo convencionales, incluyendo el uso de cuentas monoespecíficas, dentro del contexto de la práctica clínica habitual y proporciona información histórica pertinente sobre las especificidades de anticuerpos para los sujetos respectivos.

Resultados

Los autores de la presente invención examinaron 5 grupos de pacientes resumidos en la siguiente Tabla.

Tabla 3 - Grupos de pacientes

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

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

En el grupo 1, 10 pacientes respondieron a los péptidos p20/21. Éstos son de la región altamente polimórfica de HLA-A2. Los péptidos estrechamente solapados habían sido eluidos de DR1 de HLA de linfocito B humano, es decir, se ha demostrado que es una proteína endógena 'procesada naturalmente' y presentada. Un péptido más grande que contenía estas secuencias también se ha identificado como un epítipo restringido de DR15 en un paciente que rechazó un riñón positivo a A2.

En el grupo 1: 10 pacientes respondieron a los péptidos derivados de los dominios α3 y transmembrana que muestran polimorfismo muy limitado. Estos péptidos fueron más comúnmente p39 (192-206), p50/51 (268-284) y p52/53 (280-296), aunque un pequeño número de otros sitios también dio lugar a respuestas incluyendo p40 (202-216) y p45/46 (239-256). Estos péptidos no han sido previamente identificados como epítopos de células T. En dos de los pacientes, algunos de los péptidos α3/transmembrana eran epítopos autólogos, por ejemplo el paciente 1 es positivo para A68 y por lo tanto comparte las secuencias de p39, p52/53 con HLA-A2.

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

Haciendo referencia a la Figura 6, se muestran las secuencias de los péptidos p50 y p51. El círculo de la izquierda muestra los tipos de HLA en los que 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 que difieren, (prolina por leucina en 276, para A1, A3, A11, A30, A36 etc.).

Haciendo referencia a la Figura 7, se muestran las secuencias de los péptidos p52 y p53. El círculo de la izquierda muestra los tipos de HLA en la que la secuencia de la región homóloga es compartida con HLA2 y los otros círculos, aquellos en los que la región homóloga es diferente de HLA-A2, y los aminoácidos en los que 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 consistente con la hipótesis de que no es probable que los pacientes sensibilizados a otra 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. Tal respuesta también se ha observado en 1/6 de 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 podían, por tanto, haber sido sensibilizados a nivel de linfocitos T sin producir anticuerpos anti-HLA.

Paciente ejemplo

Haciendo referencia a la Figura 8, se muestra un recuento Elispot de células reactivas con péptidos/500.000 PBMC. La concentración de péptido fue 20 $\mu\text{g/ml}$. Los datos muestran que este individuo, que ha elaborado altos niveles de anticuerpos anti-HLA durante aproximadamente 10 años, en los antecedentes de embarazo y transfusión previos, elabora respuestas de alta 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 lo tanto, el paciente respondió a la región altamente polimórfica y en particular a una secuencia dentro de los residuos 105-121 de la secuencia de HLA-A2 cubierta por p20 y 21, que los autores de la presente invención demostraron que se une promiscuamente al MHC de clase II. Esta también respondió a los péptidos de la región $\alpha 3$ y transmembrana de HLA-A2, cuyas propiedades se han descrito anteriormente. De hecho, en su caso, estas respuestas son autorreactivas puesto que estas secuencias son compartidas con HLA-A68. La respuesta de control positivo es al derivado de proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) y el control negativo al medio solo.

Resumen

En resumen, los resultados muestran que los péptidos de polimorfismo limitado de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana con frecuencia inducen una respuesta inmune. Ésta es generalmente alogénica, pero a veces autoinmune, 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 son probablemente para conducir el rechazo crónico a través de mecanismos de daño mediados por células T. A medida que estos péptidos son tan ampliamente expresados, son dianas ideales para la desensibilización 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 se pueden expresar por medio de muchas otras moléculas de HLA-A, y no solo HLA-A2. Por lo tanto, los autores de la presente invención consideran que los beneficios de la utilización de tales péptidos en los métodos de acuerdo con la invención, y en particular para los usos en el tratamiento o la prevención del fracaso o el rechazo de aloinjertos, y/o la síntesis de anticuerpos a través de este u otros medios de alosensibilización, pueden ser mucho más amplios que para HLA-A2 solo. Por consiguiente, los autores de la presente invención consideran que las implicaciones de sus hallazgos son mucho más amplias que la producción de anticuerpos únicamente, pero también pueden estar relacionadas con los mecanismos inmunitarios de fracaso o rechazo del injerto *per se*, y son más amplios que la HLA-A2 diana, extendiéndose a las respuestas a los antígenos de trasplante en general.

Aunque los autores de la presente invención no desean vincularse a ninguna hipótesis, consideran que se puede utilizar una mezcla o "cóctel" de péptidos, derivados o análogos de acuerdo con la invención para regular a la baja la respuesta a los aloantígenos, y por lo tanto mejorar el resultado del trasplante y/o permitir la desensibilización de los pacientes que han elaborado anticuerpos anti-HLA. La novedad de la invención radica no solo en la definición de secuencias de péptidos precisas de HLA-A2 (es decir, los epítomos), sino también en el sorprendente hallazgo de que estas secuencias son lo que podríamos denominar "públicas"; este es un término que hasta ahora solo se ha aplicado a epítomos de células B, debido a que su existencia no había sido apreciada para las células T. Por lo tanto, este sorprendente hallazgo permite el uso de una mezcla o cóctel que contienen un número limitado de péptidos que tendrán potencialmente amplio beneficio terapéutico.

Ejemplo 2

*Materiales y métodos**Diseño de péptidos*

5 Se diseñaron 60 péptidos solapantes, 15 o 16 aminoácidos de longitud, para proporcionar una cobertura óptima de HLA-A*020 101 para supuestos epítomos de células T, utilizando el programa Tepitope (33). La solubilidad de los péptidos se pronosticó utilizando el programa en www.expasy.org. Los péptidos se sintetizaron (NeoMPS, Estrasburgo, Francia) utilizando la química Fmoc como se ha descrito anteriormente, pero de los diseñados, solo se
 10 pudieron elaborar 53. La biotinilación de los péptidos de control se logró mediante reacción con ácido biotinil-6-aminocaproico (Fluka Chimie, St. Quentin Fallavier, Francia) en el extremo NH₂ de la molécula. Todos los péptidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa en una columna C18 Vydac, y se evaluó su calidad mediante espectroscopia de masas de electropulverización y HPLC analítica.

15 *Purificación de moléculas de HLA-DR*

Se purificaron moléculas de HLA-DR 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 de 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).
 20

Análisis de unión de péptidos a HLA-DR

La unión de péptidos a diferentes moléculas de HLA-DR se realizó 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 son buenos ligadores a la molécula de MHC de clase II bajo investigación (véase la Figura 9) y péptidos de ensayo titulados en el análisis de unión con MHC de clase II inmovilizado, purificado. La unión máxima se determinó incubando el péptido biotinilado con la molécula de MHC de clase II en ausencia de competidor. Los datos se expresan como la concentración de péptido que impedía la unión del 50% del péptido marcado (CI50). Una razón de
 25 CI50 de péptido de control para someter a ensayo el péptido de <20 se consideró alta afinidad de unión y 20-100 moderada afinidad.
 30

Población de estudio

35 Este estudio se realizó con la aprobación del comité de ética de investigación del South Birmingham. Todos los sujetos se sometieron a diálisis en el Hospital Universitario de Birmingham o St James Hospital de Leeds. Las muestras de sangre se obtuvieron en heparina de pacientes de diálisis en el momento de la punción venosa de rutina. Los genotipos de HLA se determinaron utilizando técnicas moleculares convencionales en el National Blood Service Laboratory, Birmingham, Reino Unido, de los cuales estaba disponible el historial de formación de
 40 aloanticuerpos para cada sujeto, se escrutaron mediante citotoxicidad convencional, citometría de flujo y a partir de 2004, análisis en fase sólida.

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

Tabla 4 - Grupos de pacientes

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

Análisis de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas

- 5 Las PBMC se aislaron de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll antes de su uso. Las células viables se enumeraron por exclusión con azul tripán. Se utilizó un análisis ELISPOT con interferón γ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mabtech, Nacka Strand, Suecia). Se añadieron a cada pocillo un total de 5×10^5 PBMC, en un volumen final de 100 μ l de "medio completo": RPMI 1640 al 95% (Sigma, Poole, Reino Unido)/suero AB humano al 5% (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. Se utilizaron péptidos de forma individual o para algunos por pares si las secuencias eran compensadas por 2 aminoácidos.

- 10 Los pocillos de control negativo contenían PBMC respondedoras más medio solo. Los pocillos de control positivo contenían PPD (SSI, Copenhague, Dinamarca) a una concentración final de 10 μ gml⁻¹, toxoide tetánico (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, CO₂ al 5% durante 48 horas, después se descartó y la placa se lavó 6 veces con PBS. Las placas se incubaron a continuación a temperatura ambiente durante 2 horas con el reactivo de detección de una etapa (anticuerpo monoclonal de detección conjugado con fosfatasa alcalina 7-B6-1, preparado diluyendo a 1:200 en PBS filtrada que contenía de suero de ternera fetal al 0,5% (Sigma). A continuación, éste se descartó y las placas se lavaron 5 veces con PBS. Se añadió sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina listo para usar filtrado ((nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP/NBT-plus)) proporcionado por el fabricante en un volumen de 100 μ l/pocillo. Las placas se dejaron desarrollar y la reacción terminó una vez que surgieron los puntos. Las placas se lavaron exhaustivamente con agua del grifo y a continuación se secaron al aire en la oscuridad durante al menos 12 horas antes del análisis. El número de puntos en cada pocillo se contó después utilizando un lector de placas AID elispot (Strassberg, Alemania). Se definió una respuesta positiva al péptido de ensayo si el número de puntos por pocillo era significativamente mayor que el control mediante ANOVA.

Inhibición de las respuestas aloinmunes indirectas con anticuerpos anti-MHC de clase II

- 30 La restricción por MHC de las respuestas a los péptidos se investigó mediante la adición de una mezcla de un anticuerpo monoclonal de anti-MHC de 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

- 35 Las PBMC se resuspendieron a 10⁶ células/ml en RPMI templado a 37°C a lo que se añadió CFSE (Molecular Probes, Cambridge Biosciences) a una concentración final 10 μ M. Esto se incubó a 37°C, CO₂ al 5% con agitación intermitente durante 10 minutos, cuando se añadió suero AB humano (Sigma) para terminar el marcaje, y las células se lavaron dos veces. Las células se resuspendieron a 2,5 x 10⁵/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, después se cultivaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 10 días. Las células se recuperaron a partir de 3 o más pocillos, se lavaron dos veces y se tiñeron con anticuerpo para CD4 (SK3-PerCP, Becton Dickinson) o CD8 (SK1-PerCP, Becton Dickinson), o con control de isotipo (IgG1-PerCP, Becton Dickinson).
- 45 Las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando soporte lógico WinMDI 2,8 (Scripps Research), adquiriendo la información de un total de 50.000 células viables.

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

- Se diseñaron un total de 60 péptidos de 15 unidades que abarcaban HLA-A2 y se pudieron elaborar 53. Los otros 7 péptidos, en gran medida derivados de la región transmembrana, eran insolubles y por lo tanto no pudieron ser sintetizados de manera satisfactoria. La afinidad de unión de los péptidos a HLA-DR se muestra en la Figura 9.

- 55 Los datos muestran que varias secuencias exhiben unión promiscua a una gama de HLA-DR. Estas incluyen el

péptido 20 (105-119), el péptido estrechamente solapante 21 (107-121) y el péptido 7 (31-45) que corresponden a las secuencias previamente referidas a partir de experimentos en los que el péptido eluyó a partir del MHC de clase II. Resulta evidente que grandes cantidades de diferentes epítomos de HLA-A2 se unen al MHC de clase II de diferentes especificidades (Figura 9). Esto reviste un interés particular ya que un epítomo compuesto de péptido del MHC auto-derivado presentado en el contexto del propio MHC de clase II, sería un medio seguro por el cual autodefinirlo.

Los péptidos 20 y 21 también se corresponden con el epítomo (92-120) reconocido por clones de células T restringidas a DR15 generadas a partir del receptor de un trasplante renal incompatible con HLA-A2.

Sobre la base del hallazgo relativamente común de alta o moderada afinidad de unión a 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

Los detalles de los sujetos reclutados se muestran en la Figura 10. El número de células productoras de interferón y en respuesta a PPD: 143 (15 - 422)/10⁶ PBMC fue significativamente menor en los pacientes dializados que habían elaborado aloanticuerpo que en 337 controles sanos (40 - 885)/10⁶ PBMC (p = 0,007) (incompatibles). Los medios de control en estos sujetos variaron entre 0 - 9/10⁶ PBMC y la respuesta máxima al péptido fue 122/10⁶ PBMC.

El número de pacientes que respondieron a al menos un péptido, evaluado mediante elispot para interferón y se muestra en la Tabla 5. El número de pacientes que respondieron al menos a un péptido derivado de HLA-A2 se muestra para cada grupo de pacientes. Los pacientes que elaboran anticuerpos anti-HLA-A2 son significativamente más propensos que otros pacientes a elaborar una respuesta indirecta al péptido derivado de HLA-A2.

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

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

En la mayoría de los pacientes el número de células que respondieron fue más alto con el péptido a una concentración de 20 µgml⁻¹ pero en un pequeño número de la concentración óptima fue de 4 µgml⁻¹. En la Figura 1 se muestra para cada individuo la respuesta al péptido a 20 µgml⁻¹.

En el grupo 1 de sujetos, 14/18 pacientes elaboraron una respuesta a al menos un péptido de HLA-A2, mostrada en la Figura 1a. El número de pacientes que elabora una respuesta en el grupo 1 fue estadística y significativamente mayor 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 la prueba exacta de Fisher). La asociación de las respuestas aloinmunes indirectas a HLA-A2 y la formación de anticuerpos específicos contra HLA-A2, es coherente con los modelos animales de formación de aloanticuerpos (Lovegrove et al, J Immunol 2001; 167(8): 4338-44).

Un hallazgo menos esperado fue la observación de que aunque 12 sujetos del "grupo 1" respondieron a los péptidos de la región hipervariable α1 y α2 (lo más comúnmente p20 o p21), de estos sujetos, 8 también respondieron a otros péptidos de la región α3 y transmembrana temprana; y dos más respondieron a éstos solos. Las respuestas a los péptidos de estas regiones al conocimiento de los autores de la presente invención, no han sido referidas previamente en estudios con humanos o animales. Estas secuencias tienen polimorfismo muy limitado, se expresan por medio de 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	Secuencia o 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 fueron compartidas por HLA-A2 y auto HLA-A68 (el sujeto 1.1 respondió a p39 y p52/53), HLA-A2 y auto HLA-A33 (el sujeto 1.10 respondió a p52/53) o HLA-A2 y auto HLA-A32 (el sujeto 1.17 respondió a p39 y p52/53).

En el "grupo 2" de sujetos, 3 pacientes respondieron a una serie de péptidos derivados de HLA-A2 (resultados no mostrados). Por ejemplo el sujeto 2.1 respondió al péptido p30, p40, 45/46, 50/51 y 52/53 presente en una gama de diferentes HLA-A (Tabla 5), incluyendo la región hipervariable del péptido p30. Un patrón similar de respuesta tanto a la región hipervariable como $\alpha 3$ y transmembrana se observó con el sujeto 2.2 y 2.3. Ninguno de estos péptidos son únicos para HLA-A2 por lo que los resultados siguen siendo consistentes con el historial de producción de anticuerpos. En el paciente 2.2 se elaboraron respuestas a las secuencias p39 y p52/53 compartidas con auto HLA-A68.

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 los sueros actuales o históricos, todos habían sido sometidos a múltiples transfusiones y por lo tanto es posible que todos hubieran sido sensibilizados a 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) por rechazo Banff III 17 meses antes del ensayo, elaboró una respuesta autoinmune a p 39, p 50/51 y p52/53, pero también a p20 que es único para HLA-A2. Un paciente, 5.1 de "grupo 5" también elaboró una respuesta autoinmune a los péptidos p39, p50/51 y p52/53.

Un grupo de 15 controles normales, (denominado grupo 6) sin eventos sensibilizadores anteriores conocidos también se sometió a ensayo. Un varón (6.3) elaboró una respuesta inmunitaria a péptidos derivados de HLA-A2 incluyendo p39, y p50/51 y p52/53. Este individuo fue positivo para HLA-A32 y por tanto estas respuestas fueron autoinmunes. Ningún otro control normal elaboró ninguna respuesta detectable.

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

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

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

La correspondencia de la proliferación con la producción de interferón y se estudió en el "control normal": 6.3 que respondió a los péptidos p39 y p52/53 evaluados mediante elisot. Como se muestra en la Figura 12, se produjo la proliferación de células CD4⁺ en presencia de estos péptidos, pero no en presencia de péptidos de control que no estimularon la producción de interferón.

Discusión

La contribución del alorreconocimiento indirecto al rechazo está bien establecida en diversos modelos experimentales de trasplante (por ejemplo, Benichou et al., J Exp Med 1992; 175(1):305-8). En estudios clínicos, el alorreconocimiento indirecto se ha asociado con el rechazo crónico del riñón, corazón y pulmón. Los antígenos utilizados en estos estudios clínicos incluyen: células lisadas congeladas-descongeladas, péptidos que abarcan el dominio $\beta 1$ de HLA-DR y péptidos del dominio $\alpha 1$ de HLA de clase I. La alorespuesta indirecta ha sido detectada mediante la producción de IL2, la proliferación celular (en cultivos primarios o secundarios) o la producción de citocinas mediante elisot.

En estudios tanto experimentales como clínicos se informa con frecuencia de la presencia de un único epítipo "inmunodominante", pero estos hallazgos pueden ser determinados mediante diseño experimental, tales como el uso

de cultivos secundarios para detectar respuestas siguientes a la expansión preliminar del número de linfocitos T in vitro. De hecho se pueden detectar múltiples epítomos usando estos métodos, pero en diferentes momentos después del trasplante. Además, en modelos animales de trasplante resulta evidente que puede haber reconocimiento de múltiples epítomos aparte del epítomo "proliferativamente inmunodominante"; y estas respuestas pueden incluir "autocríticas".

El uso de la técnica de elispot permite la detección de linfocitos T específicos de antígenos presentes a frecuencias relativamente bajas, en cultivo primario. Esto ha permitido la evaluación por parte de los autores de la presente invención del alorreconocimiento indirecto en pacientes en lista de espera de trasplante renal. En particular, los autores de la presente invención analizaron las respuestas inmunitarias de los pacientes que elaboraban un aloanticuerpo de especificidad conocida contra HLA-A2. La frecuencia de las respuestas que han observado los autores de la presente invención es consistente con la observada en los receptores de trasplante renal estimulados con péptidos de 20 unidades derivados de donante HLA-DR evaluados de manera similar mediante elispot para interferón γ . Estas son del mismo orden de magnitud que las frecuencias notificadas de receptores de trasplante renal estimulados por productos lisados de PBMC de donantes evaluados mediante síntesis de ADN en análisis de dilución limitante y de receptores de trasplante de pulmón con bronquiolitis obliterante estimulados con uno o dos péptidos del dominio $\alpha 1$ (derivados de A1, A2, B8 y B44) también sometidos a ensayo mediante síntesis de ADN en dilución limitante (SivaSai et al., Transplantation 1999; 67(8): 1094-8). En este informe de Sivasai y colaboradores se utilizó un péptido de 25 unidades: 60-84 del dominio $\alpha 1$ de HLA-A2, pero los autores de la presente invención observaron una respuesta a esta región en un solo paciente.

Los resultados de los autores de la presente invención demuestran que aunque las respuestas a los péptidos de la región hipervariable eran relativamente comunes, como se espera de la bibliografía, hubo el hallazgo inesperado de las respuestas a los péptidos de la región $\alpha 3$ y transmembrana temprana. Como se ilustra en la tabla 6, secuencias peptídicas 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 es comúnmente un polimorfismo de un solo aminoácido o doble que abarca la mayoría de los otros tipos. Por tanto, estos péptidos podrían ser descritos como "epítomos de células T públicos", cuya implicación es que la exposición a una molécula HLA puede dar como resultado el cebado de los linfocitos T que responden a una serie de otros miembros de la familia de HLA-A o viceversa. Debido a que estos epítomos son distintos de los reconocidos por el anticuerpo esto es un mecanismo potencial para la disminución de la supervivencia del aloinjerto en pacientes sensibilizados, independientemente de la detección de anticuerpos específicos de los donantes. Del mismo modo sugiere un mecanismo mediante el cual la transfusión de sangre podría influir en las respuestas de anticuerpos anamnésica, independientemente de la presencia de un epítomo de células B reconocido.

Puesto que las secuencias identificadas como "epítomos de células T públicos" en HLA-A2 solo muestran polimorfismo muy limitado, es posible que una parte de la respuesta allogénica presente reactividad cruzada con el auto-péptido, como han informado Benichou y colaboradores para la respuesta inmunitaria a péptidos del MHC de clase I en ratones (Tarn et al, J Immunol 1996; 156(10):3765-71); y esta posibilidad está siendo investigada actualmente. De hecho, varias de las respuestas descritas en la Fig. 2 son verdaderamente autoinmunes, ya que la secuencia del péptido contra el que se elabora una respuesta es compartida por HLA-A2 y auto. Esto se ilustra por los pacientes 1.1, 1.10 y 1.17. Es similar a la respuesta observada por Lovegrove y colaboradores a auto-epítomos crípticos, en un modelo de rata de rechazo asociado con formación de aloanticuerpos (Lovegrove et al, J Immunol 2001;167(8):4338-44).

El hallazgo de "epítomos de células T públicos" también es relevante para el mecanismo del efecto de transfusión de sangre: el beneficio de la transfusión de sangre anterior en la supervivencia del trasplante renal, observado principalmente antes del uso generalizado de los inhibidores de la calcineurina. Los modelos experimentales del efecto de la transfusión sugieren que hay una inducción de células T reguladoras específicas para el aloantígeno presentado indirectamente (Kishimoto et al, J Am Soc Nephrol 2004; 15(9):2423-8). Aunque éstos generalmente informan de tolerancia específica al antígeno del donante hay nuevos modelos, que tratan de imitar el escenario clínico, en el que 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 los seres humanos el efecto de transfusión de sangre requiere de donantes y receptores de sangre que comparten al menos un HLA-DR y un número relativamente pequeño de transfusiones para el máximo beneficio. Esto es a pesar de la amplia gama de aloantígenos que los receptores pueden encontrar. Esto podría explicarse por la inducción de células reguladoras autorrestringidas, específicas para los epítomos allogénicos que son todavía comunes a una amplia gama de donantes. Si bien estos no tienen que ser necesariamente del MHC, los "epítomos de células T públicos" anteriormente descritos cumplen las propiedades necesarias para explicar gran parte de la evidencia disponible.

Una segunda propiedad de muchos de los epítomos de péptidos derivados de HLA-A2 es que se unen con alguna

promiscuidad al MHC de clase II, e inducen correspondientemente respuestas en una proporción relativamente alta de pacientes sensibilizados. Este fue el caso tanto de epítomos únicos para HLA-A2 y de "epítomos de células T públicos". Esto, en parte, permitió extraer conclusiones de nuestro 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 lo que si se tradujera al uso clínico limitaría la utilidad de este enfoque. Por tanto, estos péptidos derivados HLA que han estimulado el mayor interés han impactado en vías independientes de reconocimiento de TCR convencional basado en antígenos. Esto es distinto de muchos modelos animales de tolerancia inducida por péptidos en los que hay evidencia de especificidad antigénica a través de la inducción de células T reguladoras. Las propiedades exhibidas por los epítomos de los dominios $\alpha 3$ y transmembrana, es decir ser tanto públicos como promiscuos, identifican a los candidatos ideales con los que 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 con péptidos.

En resumen, la identificación de aloepítomos indirectos de las regiones $\alpha 3$ y transmembrana del MHC de clase I tiene implicaciones importantes para la respuesta inmune alogénica, su regulación y el desarrollo de la terapia específica del antígeno.

Ejemplo 3

Los autores de la presente invención compararon la secuencia de algunos de los aloepítomos de 15 unidades identificados en los Ejemplos 1 y 2 con las secuencias correspondientes en otros polipéptidos de HLA. Los autores de la presente invención identificaron de esta manera aloepítomos adicionales. Los resultados se muestran en las Figuras 13 a 16.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSIDAD DE BIRMINGHAM
 <120> TERAPIA CON PÉPTIDOS
 <130> W073856PWO
 <160> 96
 <170> Patent In version 3.2
 <210> 1
 <211> 365
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

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

15

ES 2 520 020 T3

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

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

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

ES 2 520 020 T3

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
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
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
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		

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

ggattcccca	actccgcagt	ttcttttctc	cctctcccaa	cctatgtagg	gtccttcttc	60
ctggatactc	acgacgcgga	cccagttctc	actcccatcg	ggtgtcgggt	ttccagagaa	120
gccaatcagt	gtcgtcgcg	tcgcggttct	aaagtccgca	cgcacccacc	gggactcaga	180
ttctccccag	acgccgagga	tggccgtcat	ggcgccccga	accctcgtcc	tgctactctc	240
gggggctctg	gccctgacct	agacctgggc	gggtgagtgc	ggggtcggga	gggaaacggc	300
ctctgtgggg	agaagcaacg	ggccccgctg	gcgggggagc	aggaccggg	aagccgcgcc	360
gggaggagg	tcgggcgggt	ctcagccact	cctcgtcccc	aggctctcac	tccatgaggt	420
atttcttcac	atccgtgtcc	cggccccggc	gcggggagcc	ccgcttcac	gcagtgggct	480

ES 2 520 020 T3

```

acgtggacga cagcgagttc gtgcgggttc acagcgacgc cgcgagccag aggatggagc 540
cgcggggcgcc gtggatagag caggaggggtc cggagtattg ggacggggag acacggaaag 600
tgaaggccca ctcacagact caccgagtggt acctggggac cctgcgcggc tactacaacc 660
agagcgagggc cgggtgagtga ccccgggccc gggcgaggt cagcactct catccccac 720
ggacggggcca ggtcgccac agtctccggg tccgagatcc gcccgaagc cgcgggaccc 780
cgagaccctt gcccggggag aggccaggc gcctttaccc gggtttcatt tcagttagg 840
ccaaaaatcc ccccaggttg gtcggggcg ggcggggctc gggggaccgg gctgaccgcg 900
gggtccgggc caggtttctca caccgtccag aggatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac 960
tggcgcttcc tccgcgggta ccaccagtac gcctacgacg gcaaggatta catcgccctg 1020
aaagaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg gacatggcag ctcagaccac caagcacaag 1080
tgggagggcg cccatgtggc ggagcagttg agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag 1140
tggctccgca gatacctgga gaacgggaag gagacgctgc agcgcacggg taccagggggc 1200
cacggggcg ctcctgatc gcctgtagat ctccggggct ggccctccac aaggagggga 1260
gacaattggg accaacacta gaatatcgcc ctccctctgg tcctgagggg gaggaaatcct 1320
cctgggttcc cagatcctgt accagagagt gactctgagg ttccgcctg ctctctgaca 1380
caattaaggg ataaaaatctc tgaaggaaag acgggaagac gatccctcga atactgatga 1440
gtggttccct ttgacacaca caggcagcag ccttggggcc gtgacttttc ctctcaggcc 1500
ttgttctctg cttcacactc aatgtgtgtg ggggtctgag tccagcactt ctgagtcctt 1560
cagcctccac tcaggtcagg accagaagtc gctgttccct cttcagggac tagaattttc 1620
cacggaatag gagattatcc caggtgcctg tgtccaggct ggtgtctggg ttctgtgctc 1680
ccttccccat cccaggtgtc ctgtccattc tcaagatagc cacatgtgtg ctggaggagt 1740
gtccccatgac agatgcaaaa tgccctgaatg atctgactct tcctgacaga cgcctccaaa 1800
acgcatatga ctcaccacgc tgtctctgac catgaagcca cctgaggtg ctgggcccctg 1860
agcttctacc ctcgggagat cacactgacc tggcagcggg atggggagga ccagaccacg 1920
gacacgggagc tcgtggagac caggcctgca ggggatggaa ccttcagaa gtggggcggt 1980
gtggtgtgtg cttctggaca ggagcagaga tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg 2040
cccaagcccc tcacctgag atggggtaag gagggagacg ggggtgtcat gtcttttagg 2100
gaaagcagga gcctctctga cctttagcag ggtcagggcc cctcaccttc cctctttttc 2160
ccagagccgt cttcccagcc caccatcccc atcgtgggca tcattgctgg cctggttctc 2220
tttggagctg tgatcactgg agctgtggtc gctgctgtga tgtggaggag gaagagctca 2280
gggtggggaag ggggtgaagg tgggtctgag atttcttgtc tctactgagg ttccaagacc 2340
caggtagaag tgtgccctgc ctcgttactg ggaagcacca cccacaatta tgggcctacc 2400
cagcctgggc cctgtgtgac agcacttact cttttgtaaa gcacctgtta aaatgaagga 2460
cagatttatc accttgatta cagcgtgat gggacctgat ccagcagtc acaagtcaca 2520
ggggaagggt cctgaggacc ttacaggagg cgggttggtcc aggaccacac cctgctttct 2580
tcattgtttc tgatccccgc ctgggtctgc agtcacacat ttctggaaac ttctctgagg 2640
tccaagactt ggaggttctc ctaggacctt aaggccctga ctcctttctg gtatctcaca 2700
ggacattttc ttccacaga tagaaaagga gggagctact ctcaggctgc aagtaagtat 2760
gaaggaggct gatgcctgag gtccttgga tattgtgttt gggagcccat gggggagctc 2820
accaccccca caattcctcc tctagccaca tcttctgtgg gatctgacca ggttctgttt 2880
ttgttctacc ccaggcagtg acagtgccca gggctctgat gtgtctctca cagcttgtaa 2940
aggtgagagc ctggagggcc tgatgtgtgt tgggtgttgg gcggaacagt ggacacagct 3000
gtgctatggg gtttctttcc attggatgta ttgagcatgc gatgggctgt ttaaagtgtg 3060
acccctcact gtgacagata cgaatttgtt catgaatatt tttttctata gtgtgagaca 3120
gctgccttgt gtgggactga gaggcaagag ttgttctgc ccttcccttt gtgacttgaa 3180
gaaccctgac tttgtttctg caaaggcacc tgcattgtgc tgtgttcgtg taggcataat 3240
gtgaggaggt ggggagacca cccaccccc atgtccacca tgacct 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
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 5

ES 2 520 020 T3

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

5
<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 6

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

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

20
Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val
1 5 10 15

25
<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 8

30
Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp
1 5 10 15

35
<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 9

40
Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp
1 5 10 15

45
<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 10

50
Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met
1 5 10 15

55
<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 11

ES 2 520 020 T3

	Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg	
	1 5 10 15	
5	<210> 12	
	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 12	
10	Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro	
	1 5 10 15	
	<210> 13	
	<211> 15	
15	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 13	
20	Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu	
	1 5 10 15	
	<210> 14	
	<211> 15	
25	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 14	
30	Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser	
	1 5 10 15	
	<210> 15	
	<211> 15	
35	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 15	
40	Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly	
	1 5 10 15	
	<210> 16	
	<211> 15	
45	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 16	
50	His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser	
	1 5 10 15	
	<210> 17	
	<211> 15	
55	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia derivada de HLA-A2	
	<400> 17	

ES 2 520 020 T3

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

<210> 18
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
10 <400> 18

Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
20 <400> 19

Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
30 <400> 20

His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp
1 5 10 15

<210> 21
<211> 16
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
40 <400> 21

Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
50 <400> 22

Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 23

ES 2 520 020 T3

Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 24
 Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 25
 Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 26
 His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 27
 Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 28
 Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2

ES 2 520 020 T3

<400> 29

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

5

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<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

15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<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

25

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<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

35

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<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

45

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<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

55

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 520 020 T3

<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

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 36

Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 37

Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 38

Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 39

Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 40

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 520 020 T3

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 41

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

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 42

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

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 43

[illegible]

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 44

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

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 45

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

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 46

Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu
55 1 5 10 15

<210> 47

$\langle 211 \rangle$ 15

<212> PRT

ES 2 520 020 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 47
 5
 Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 15
 10
 <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
 <210> 49
 <211> 16
 20
 <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
 <210> 50
 <211> 15
 30
 <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
 <210> 51
 <211> 16
 40
 <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
 <210> 52
 <211> 15
 50
 <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
 <210> 53

ES 2 520 020 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <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>
 15 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 54

 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>
 25 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 55

 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>
 35 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 56

 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>
 45 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 57

 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>
 55 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 58

ES 2 520 020 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

5 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <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

 Ile
 10 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <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

 Ala
 20 <210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <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

 Ile
 30 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <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

 Ile
 40 <210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 68

ES 2 520 020 T3

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

Ile
<210> 69
<211> 17
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 69

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

<210> 70
<211> 17
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
20 <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
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
30 <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
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
40 <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
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2

ES 2 520 020 T3

<400> 73

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

Gln Arg

5

<210> 74

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<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

15

<210> 75

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 75

cactccatga ggtatttctt cacatccgtg tcccgcccg gccgc 45

25

<210> 76

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 76

atgaggtatt tctcacatc cgtgtcccg cccggcccg gggag 45

35

<210> 77

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 77

cacaagtggg aggcggccca tgtggcggag cagtgagag cctac 45

45

<210> 78

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Secuencia derivada de HLA-A2

<400> 78

cacgctgtct ctgacatga agccaccctg aggtgctggg cctg 45

55

<210> 79

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 79
 5 aggtgctggg ccctgagctt ctaccctgcg gagatcacac tgacc 45
 <210> 80
 <211> 45
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 80
 15 aagccctca ccctgagatg ggagccgtct tccagccca ccatc 45
 <210> 81
 <211> 45
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 81
 25 ctaccctga gatgggagcc gtctccag cccacatcc ccatc 45
 <210> 82
 <211> 45
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 82
 35 cccacatcc ccatcgtggg catcattgct ggctgttc tctt 45
 <210> 83
 <211> 45
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 83
 45 atccccatcg tgggcatcat tgctggcctg gttctcttg gagct 45
 <210> 84
 <211> 45
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 84
 55 ggaacctcc agaagtggc ggctgtgtg gtgcctctg gacag 45
 <210> 85
 <211> 48
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 85

ES 2 520 020 T3

ttccagaagt gggcggctgt ggtggtgcct tctggacagg agcagaga 48

5 <210> 86
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 86

10 aagcccctca cctgagatg ggagccgtct tccagccca ccatcccat c 51

15 <210> 87
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 87

20 cccaccatcc ccacgtggg catcattgct ggctgggtc tcttggagc t 51

25 <210> 88
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 88

30 ggaacctcc agaagtggg ggctgtgtg gtgcctctg gacaggagca gaga 54

35 <210> 89
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 89

40 tcggactggc gcttctccg cgggtaccac cagtacgct acgac 45

45 <210> 90
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 90

50 tggcgcttc tccgcgggta ccaccagtac gcctacgacg gcaag 45

55 <210> 91
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia derivada de HLA-A2
<400> 91

60 caccatct ctgacctga ggccaccctg aggtgctggg ccctg 45

<210> 92
<211> 51

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 92
 5 aagccctca ccctgagatg ggagccttct tccagccca ccatcccat c 51
 <210> 93
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 93
 10
 15 cccaccatcc ccacgtggg catcattgct ggctgggtc tcctggagc t 51
 <210> 94
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 94
 20
 25 aggtgctggg ccttgggctt ctaccctgcg gagatcacac tgacc 45
 <210> 95
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 95
 30
 35 ggaacctcc agaagtgggc ggctgtggtg gtgcctctg gagaggagca gaga 54
 <210> 96
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia derivada de HLA-A2
 <400> 96
 40
 45 ggaacctcc agaagtgggc gtctgtggtg gtgcctctg gacaggagca gaga 54

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72; o un derivado o análogo del mismo que tiene menos de 30 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de más de 65% con dicha secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72, y que se une a un HLA de clase II del MHC y activa una célula T específica para dicho polipéptido;
para su uso en un método para el tratamiento o la prevención del fracaso o el rechazo de aloinjertos.
2. El polipéptido o derivado o análogo del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para la prevención o el tratamiento del rechazo de aloinjertos.
3. Un polipéptido de entre 15 y 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72; o un derivado o análogo del mismo que tiene entre 15 y 30 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de más de 90% con dicha secuencia de uno cualquiera de los SEQ ID NO: 53 a 58 y 64 a 72, y que se une a un HLA de clase II del MHC y activa una célula T específica para dicho polipéptido.
4. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o derivado o análogo del mismo como se define en la reivindicación 3.
5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o derivado o análogo del mismo como se define en la reivindicación 3 o una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4.
6. Un procedimiento para elaborar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o derivado o análogo del mismo como se define en la reivindicación 3 o una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un método *in vitro* para estimular células T, comprendiendo el método poner en contacto las células T con:
(a) un polipéptido o derivado o análogo del mismo como se define en la reivindicación 3; o
(b) una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4,
en condiciones que permiten la estimulación de las células T y estimular de ese modo las células T.

Figura 1

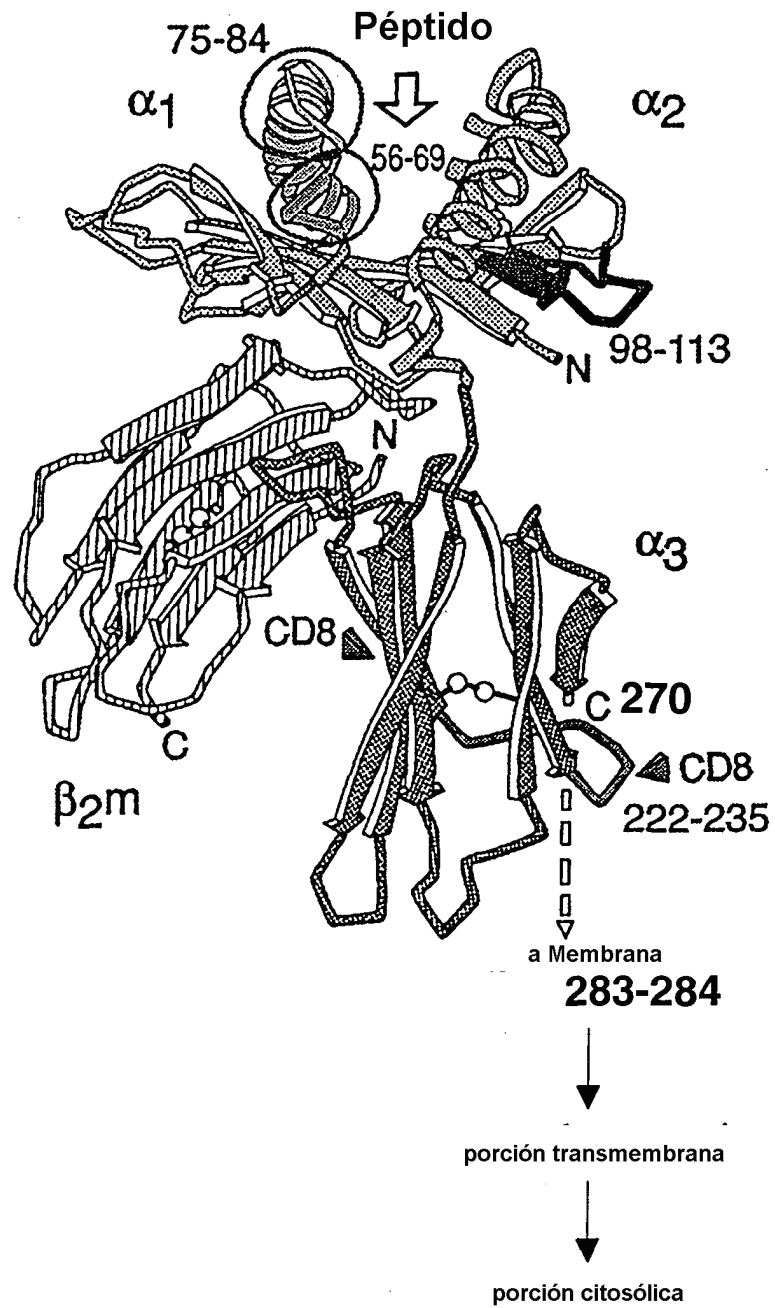


Figura 2

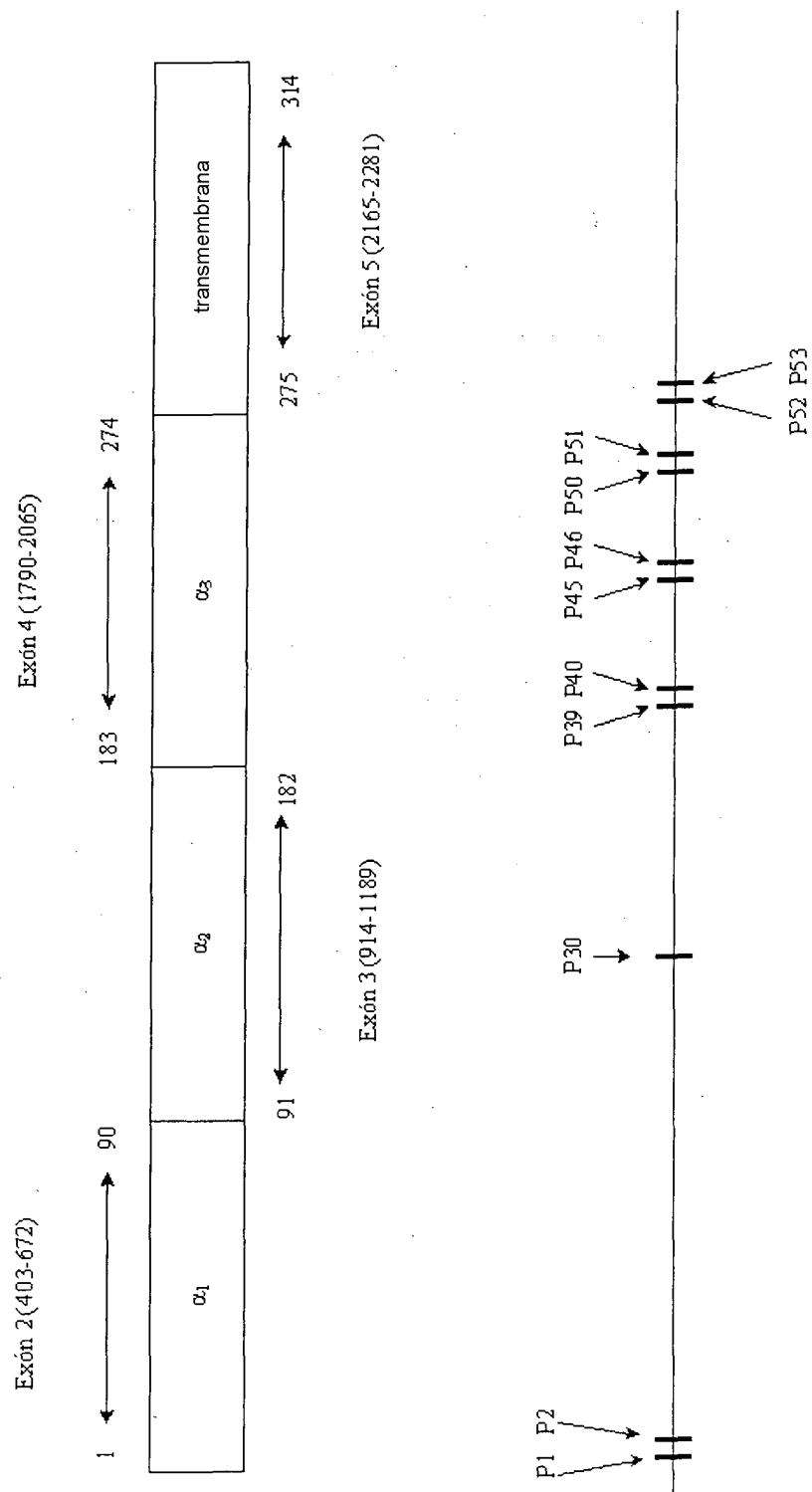


Figura 3

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

Figura 3 Continuación

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

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	599,2	>330	273,9	1234,4	70,5	>766	386,7	>6202	>3686	>12910
p4	788,8	38,1	>45,24	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

péptidos	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	53,8	>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	1566,6	>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	>5436	>12703
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

A2,25,26,29,
31,
32,33,34,43,
66,68,69,74,

A1,3,11,2
3,24,
30,36,80
Pro 193 Ile 194

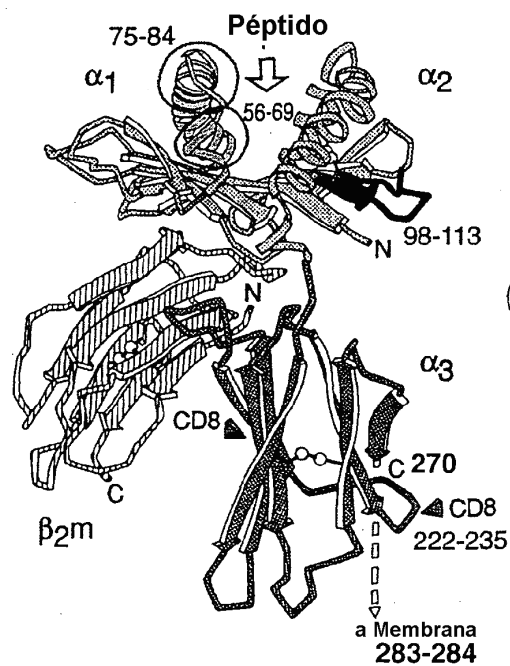


Figura 6

Péptidos 50_y51

Secuencias: 268-282 y 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*

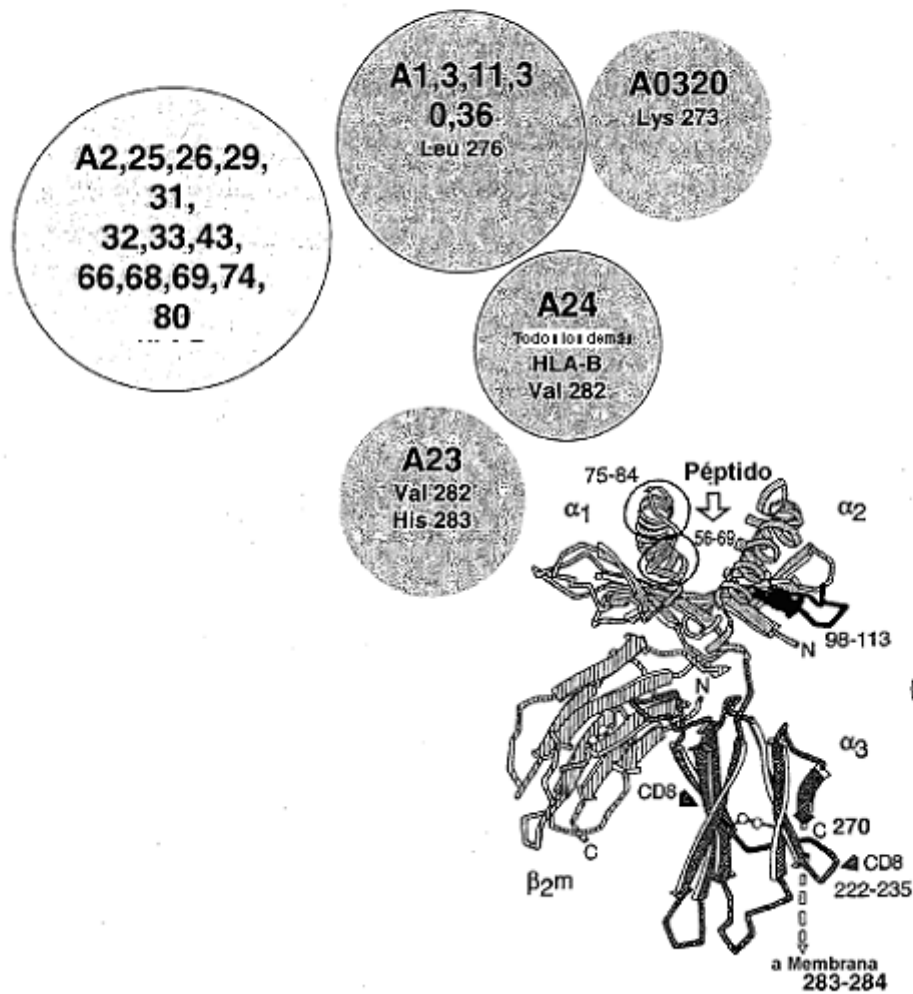
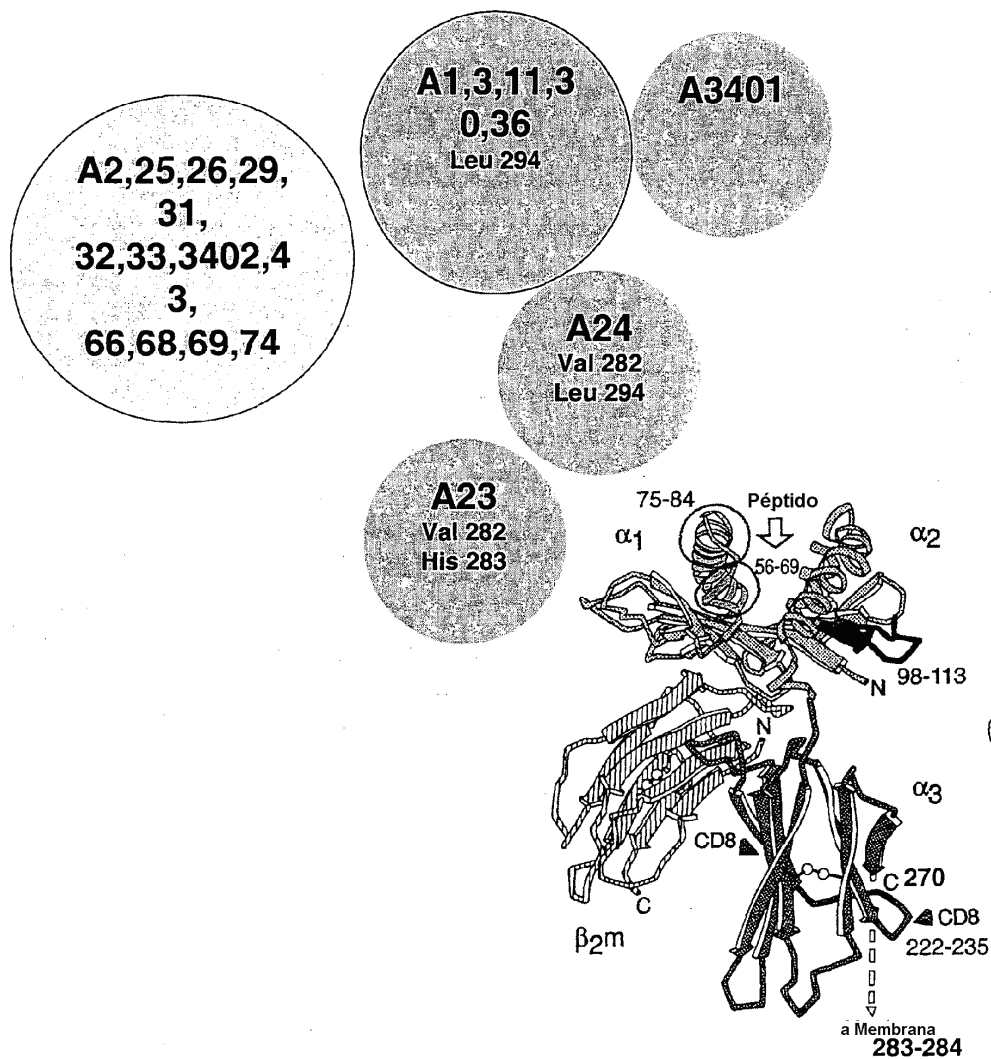


Figura 7

Péptidos 52 y 53

Secuencias: 280-294 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



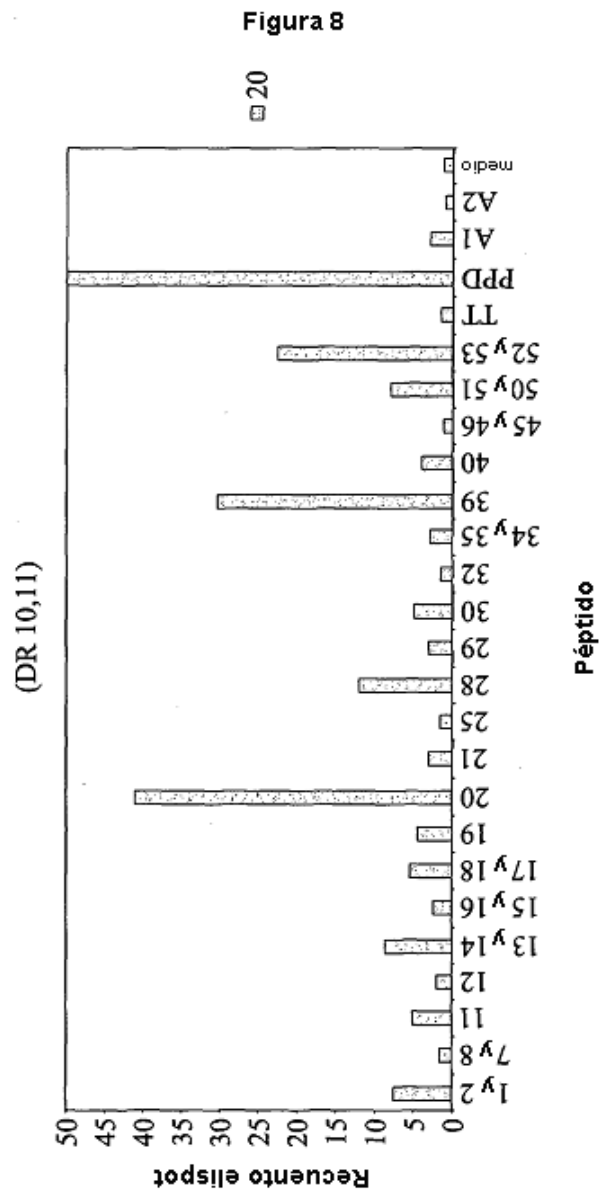


Figura 9

Alelo	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
Péptido	Secuencia				Cl50					
p1*	3-17	3	7348	13	38	2	365	>100000	193	4
p2*	5-19	2	2837	18	45	3	399	>100000	>100000	4
p3	10-24	648	>100000	5477	6928	1020	>100000	>100000	>100000	>100000
p4	20-34	748	12000	>100000	850	5477	>100000	196	45717	755
p5	23-37	2766	316	30984	3098	9220	>100000	59	>100000	798
p6	25-39	27749	600	97468	3162	2797	>100000	245	90000	9192
p7*	31-45	122	164	354	786	4000	>100000	456	2182	1549
p8*	34-48	13964	1396	3391	4648	58310	>100000	2683	>100000	3578
p9	42-57	10817	>100000	>100000	83666	15474	60000	>100000	>100000	67082
p10	49-63	12961	49749	>100000	79373	58095	>100000	75000	>100000	73485
p11	57-71	4950	>100000	63246	62929	418	>100000	>100000	>100000	24372
p12	65-79	21633	>100000	100000	486	>100000	385	>100000	2966	7984
p13*	74-88	89	>100000	4040	36742	8062	>100000	>100000	67082	12369
p14*	76-90	209	>100000	8832	>100000	1549	>100000	>100000	>100000	10954
p15*	79-93	456	>100000	1817	2958	1857	>100000	>100000	>100000	612
p16*	82-96	17	>100000	494	130	3175	>100000	>100000	>100000	175
p17*	93-107	35	5612	2121	1587	6481	>100000	529	15	12021
p18*	95-110	88	>100000	1844	4775	1803	>100000	30	19	1487
p19	101-115	9	1500	543	341	29	100000	>100000	51381	33
p20	105-119	1	29563	27	53	2	1000	1336	13077	4
p21	107-121	1	19596	92	3000	18	474	4709	3633	17
p22	111-125	9487	8485	81548	33437	1749	>100000	1285	>100000	40000
p23	114-128	406	51962	17664	37789	684	>100000	2291	>100000	1500
p24	116-130	35	>100000	3873	4472	184	>100000	>100000	>100000	3633
p25	121-135	10	1631	325	2958	42	2739	85528	27386	52
p26	124-138	151	4613	3912	825	4583	46904	>100000	>100000	1378
p27	128-142	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	1876
p28	131-145	67	>100000	1530	12845	10488	>100000	40497	>100000	1000

Figura 9 continuación

[illegible]

Figura 10

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

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	Y	2,68	71,60	7, 17	A1,3,9,10,11,29,31,33,36,80, B
4.2	39	F	Y (2)	Y	2,3	39,56	11,13	A1,9,10,11,19,28,29,36,43,60,B,C,DR,DQ
4.3	45	F	Y (1)	Y	2,32	27,62	15	A10,11,30,31,33,36,74,80,B,C,DR,DQ
4.4	50	M	Y (1)	Y	2	60,44	13,15	A1,3,9,10,11,29,30,31,33,68,80,B,C,DR
4.5	50	F	Y (1)	Y	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	Y (1)	Y	2,30	18,60	4,17	A1,3,11,29,31,32,33,74,80,B,C,DR
4.8	30	F	Y (1)	Y	2,26	52,62	4	A1,3,9,11,19,35,74,80,B,C,DR,DQ
4.9	29	F	Y (1)	Y	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	Y	2,3	7,51	1,103	
5.3	34	M	Y (1)	Y	2	18,62	15,17	
5.4	49	M	N	N	2,3	37,40	10,15	
5.5	50	M	Y (1)	Y	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

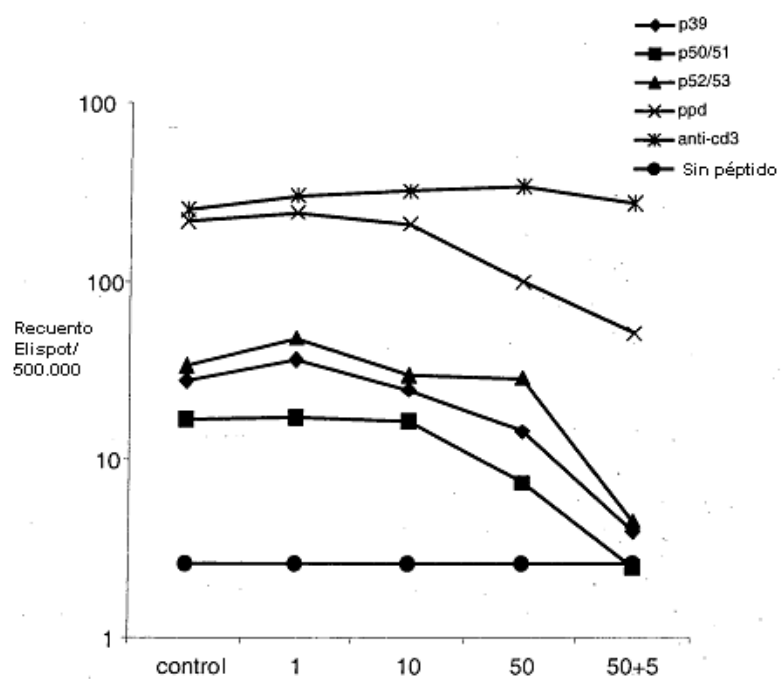


Figura 12

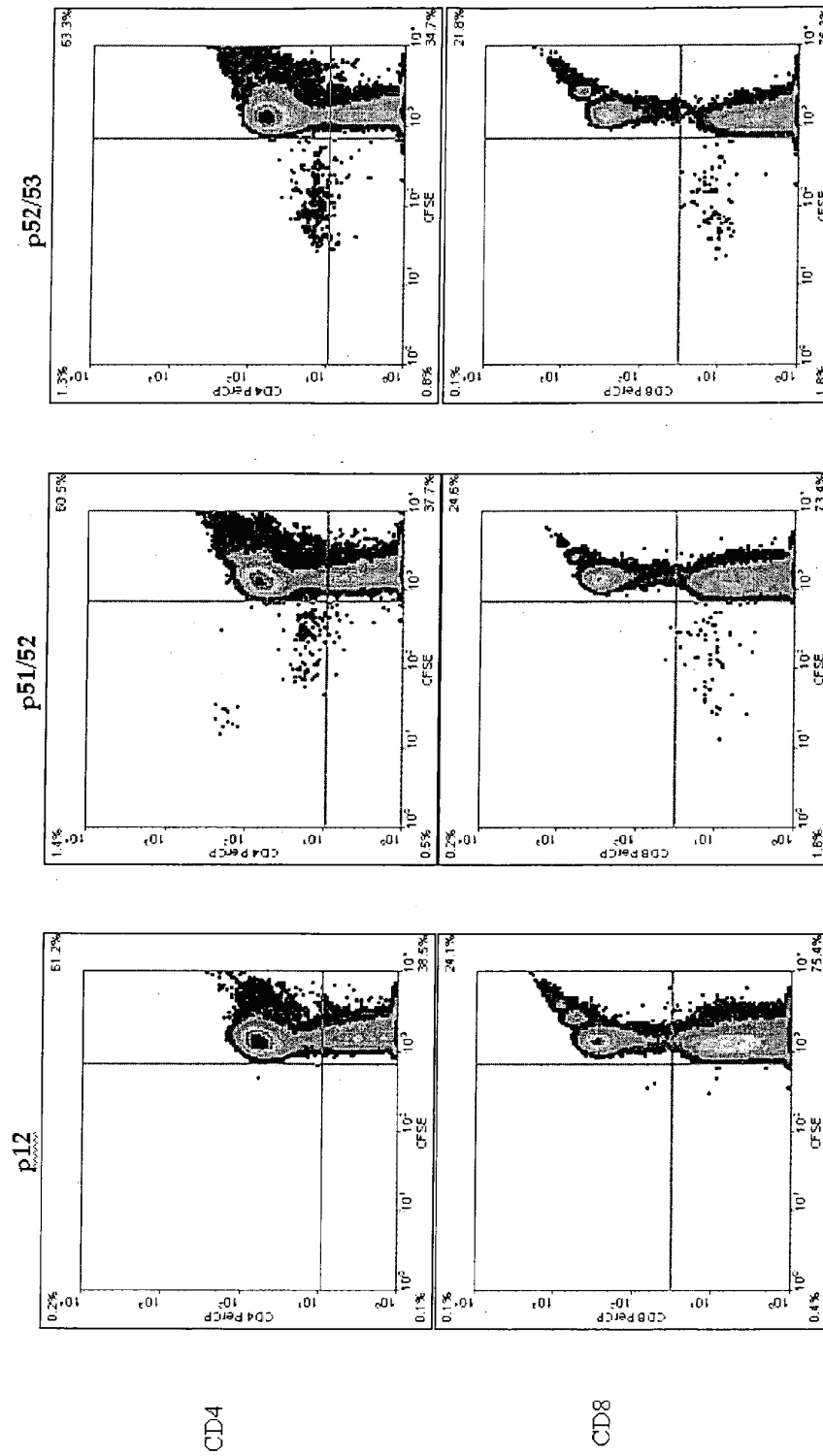


Figura 13

Péptidos 39

Secuencias : 192-206

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

A2,25,26,29,
31,
32,33,34,43,
66,68,69,74,

A1,3,11,2
3,24,
30,36,80

y la mayoría de
H I A R

B44

Pro 193 Val
199

B51,52,53
,58,78
Pro 193

Figura 14

Péptidos 40

Secuencias: 202-216

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

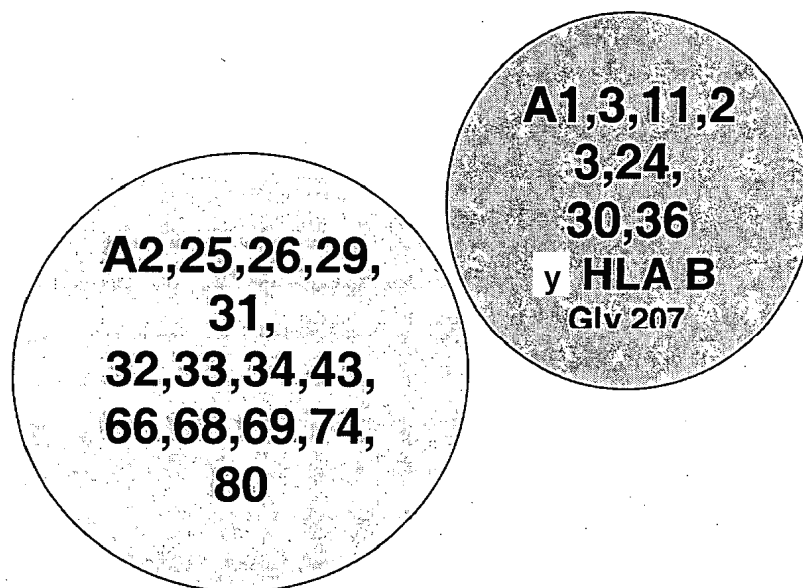


Figura 15

Péptidos 50 y 51

Secuencias: 268-282 y 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*

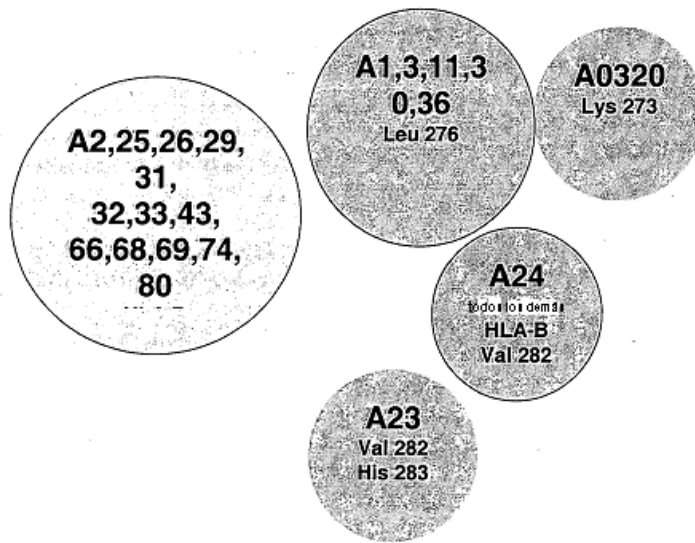


Figura 16

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

