

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 980**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6869 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2012** **PCT/US2012/021594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012** **WO12097374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012** **E 12734581 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 2663864**

54 Título: **Método de evaluación de la inmunodiversidad y su uso**

30 Prioridad:

14.01.2011 US 201161432638 P

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

13.11.2019

73 Titular/es:

IREPERTOIRE, INC. (100.0%)
601 Genome Way, Suite 3005
Huntsville, AL 35806, US

72 Inventor/es:

HAN, JIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 730 980 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

Método de evaluación de la inmunodiversidad y su uso

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 61/432.638, presentada el 14 de enero de 2011.

La invención se refiere a métodos para la evaluación del nivel de diversidad en un inmunorrepositorio.

- 10 Rara vez existe una prueba diagnóstica única para el diagnóstico definitivo de una enfermedad individual. Sin embargo, las pruebas de diagnóstico se pueden usar para detectar la presencia o ausencia del estado normal y los resultados de estas pruebas se pueden usar para evaluar a los pacientes y ayudar colectivamente en el diagnóstico. Por ejemplo, un recuento normal de glóbulos blancos es de entre 4.500 y 10.000 células por microlitro. Un recuento elevado de glóbulos blancos no es determinante para una enfermedad específica, pero puede indicar un problema subyacente
15 que requiere evaluación médica. Los intervalos normales de recuento de glóbulos rojos para mujeres y hombres son generalmente diferentes, con un recuento de 5 a 6 millones por microlitro que es normal para los hombres y de 3,6 a 5,6 millones que es normal para las mujeres. Los recuentos de plaquetas son normales si están dentro del intervalo de 150.000 a 400.000. En presencia de inflamación, por ejemplo, el recuento de glóbulos rojos puede disminuir, el recuento de glóbulos blancos puede aumentar y el recuento de plaquetas también puede estar elevado.

- 20 Los niveles de glucosa en sangre pueden usarse como indicadores tempranos asociados con enfermedades tan variadas como el síndrome de Cushing, el hipertiroidismo, el cáncer de páncreas, la pancreatitis, la prediabetes y la diabetes. La enfermedad cardíaca, la tendencia a tener una enfermedad cardíaca, los signos de ciertos tipos de cáncer y una variedad de enfermedades genéticas pueden tener como signos tempranos uno o más resultados anormales
25 para una variedad de pruebas de diagnóstico. Las pruebas de diagnóstico que individual y/o colectivamente indican una salud normal o la ausencia de una salud normal (es decir, una enfermedad) incluyen, por ejemplo, medidas de albúmina, fosfatasa alcalina, alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), nitrógeno ureico en sangre (BUN), calcio en suero, cloruro en suero, dióxido de carbono, creatinina, bilirrubina directa, gamma-glutamyl-transpeptidasa (gamma-GT), glucosa, lactato deshidrogenasa (LDH), fósforo en suero, potasio, sodio en suero,
30 bilirrubina total, colesterol total, proteínas totales, y ácido úrico.

- La prevención de la enfermedad también requiere una descripción más precisa del estado normal, porque solo cuando podemos describir mejor lo que es normal podemos identificar desviaciones de lo normal o subnormal, y evaluar la efectividad de las medidas preventivas.

- 35 Aunque muchas pruebas de diagnóstico están actualmente disponibles y se realizan de manera regular, muchas enfermedades, como el cáncer y la enfermedad cardíaca, pueden pasar desapercibidas hasta que hayan progresado hasta el punto en que estén presentes síntomas físicos claros. Con demasiada frecuencia, en ese momento es demasiado tarde para proporcionar un tratamiento eficaz. Por lo tanto, siempre hay una necesidad de pruebas
40 adicionales que puedan usarse para evaluar la salud de un paciente e identificar estados anormales que puedan indicar la presencia de una enfermedad grave o la predisposición a tal enfermedad.

- Boyd et al., (Science Translational Medicine, 1 (12), 2009) divulga la medición y el control clínico de la clonalidad de linfocitos humanos mediante una pirosecuenciación de VDJ masivamente paralela.

- 45 Cohen et al., (Virology, 304 (2), 2002) divulga el rastreo de clonotipos de repertorios de TCR durante infecciones virales crónicas.

- El documento WO 2004/033728 divulga estudios de clonalidad basados en PCR para el diagnóstico precoz de trastornos linfoproliferativos y la detección de una enfermedad residual mínima.

- 50 El documento US 2011/0003291 divulga un método para analizar la diversidad del catálogo de linfocitos T y/o B en un individuo, con base en la amplificación, a partir de una muestra, de fragmentos de ADN genómico mediante n multiplexos de PCR, con $n \geq 2$, llevada a cabo con una combinación de al menos 3 cebadores que definen al menos
55 2 parejas de cebadores, cada una de los cuales incluye un cebador que hibrida específicamente secuencia arriba y/o en un gen V o D dado y un cebador que hibrida específicamente secuencia abajo y/o un gen J dado, para obtener la amplificación de al menos dos fragmentos característicos de dos reordenamientos V-J o D-J distintos de cada par de cebadores.

- 60 Langerak et al., (Blood, 98 (1), 2001) divulga el análisis citométrico molecular y de flujo del repertorio de Vbeta para la evaluación de la clonalidad en las proliferaciones de células T de TCRalfabeta maduras.

- El documento US 2010/330571 divulga un método para medir la inmunocompetencia que proporciona un medio para evaluar los efectos de enfermedades o afecciones que comprometen el sistema inmunitario y las terapias dirigidas a reconstituirlas, que se basan en la cuantificación de la diversidad de células T mediante el cálculo del número de
65 diversas regiones variables de la cadena beta del receptor de células T (TCR) de las células sanguíneas.

En este documento se divulga un método para identificar un estado inmunitario normal o un estado inmunitario anormal en un individuo, estando indicado un estado inmunitario normal por la presencia de una población objetivo diversa de células detectables del sistema inmunitario y un estado inmunitario anormal indicado por la falta de tal diversidad. El método comprende cuantificar clonotipos de células del sistema inmune e identificar el número de clonotipos que comprenden un porcentaje significativo de un número total de células contadas dentro de esa población. El estado normal se caracteriza por la presencia de una mayor variedad (o diversidad) de clonotipos representados por el porcentaje significativo del número total de células y un estado anormal se caracteriza por la presencia de un número significativamente menor de clonotipos representados por el porcentaje significativo del número total de celdas. Por ejemplo, la región más importante de la TCR es la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) cuya secuencia de nucleótidos es única para cada clon de células T. El porcentaje significativo puede ser un número de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 por ciento. En diversos aspectos de la invención, el inventor ha encontrado que un porcentaje significativo del cincuenta por ciento (50%) proporciona un resultado diagnóstico útil. Cuando el "porcentaje significativo" del número total de células es del cincuenta por ciento (50%), el índice de diversidad (D50) es una medida de la diversidad de un repertorio inmune de células J individuales (el número total de CDR3) compuestas de CDR3 distintas de S en una configuración de dominancia clasificada donde r_i es la abundancia i -ésima CDR3 más abundante, r_1 es la abundancia de las CDR3 más abundante, r_2 es la abundancia de la segunda CDR3 más abundantes, y así sucesivamente. C es el número mínimo de CDR3 distintas, que asciende a $\geq 50\%$ del total de lecturas de secuenciación. D50, por lo tanto, viene dada por $C/S \times 100$.

$$\text{Supongamos que } \underbrace{r_1 \geq r_2 \cdots \geq r_i \geq r_{i+1} \cdots \geq r_S}_{S}, \sum_{i=1}^S r_i = J$$

$$\text{si } \sum_{i=1}^C r_i \geq J/2 \quad \text{y} \quad \sum_{i=1}^{C-1} r_i < J/2$$

$$D50 = \frac{C}{S} \times 100$$

En varios aspectos de la invención, las células del sistema inmune que se cuantifican pueden incluir, por ejemplo, todas las células T [panT], subconjuntos funcionales de células T tales como células T CD8⁺ [T citotóxicas (T_c)], células T CD4⁺ y sus subconjuntos [T_H1, T_H2, T_H17, T reguladoras (T_{reg}) y T foliculares (T_{FH})], o subconjuntos de desarrollo de células T tales como T inalterada (T_n), T activadas (T_a), T de memoria (T_m), todas las células B (pan B) y sus subconjuntos, tales como las células B inalterada (B_n), B activadas (B_a), B de memoria (B_m), células B plasmáticas y plasmoblásticas. En diversos aspectos de la invención, el porcentaje significativo puede ser cualquier valor desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 75%. En algunos aspectos, el porcentaje significativo puede ser del 50%.

La invención se refiere a un método para evaluar el nivel de diversidad de un inmunorrepositorio, comprendiendo el método las etapas de (a) amplificar polinucleótidos de una población de glóbulos blancos de un sujeto humano o animal en una mezcla de reacción que comprende cebadores anidados específicos del objetivo para producir un conjunto de primeros amplicones, al menos una parte de los cebadores anidados específicos del objetivo que comprenden nucleótidos adicionales que, durante la amplificación, sirven como plantilla para incorporar en los primeros amplicones un sitio de unión para al menos un cebador común; (b) transferir una porción de la primera mezcla de reacción que contiene los primeros amplicones a una segunda mezcla de reacción que comprende al menos un cebador común; (c) amplificar, utilizando al menos un cebador común, los primeros amplicones para producir un conjunto de segundos amplicones; (d) secuenciar los segundos amplicones para identificar secuencias de reordenamiento de V(D)J en la subpoblación de glóbulos blancos, y (e) usar las secuencias de reordenamiento de V(D)J identificadas para cuantificar tanto el número total de células en una población de células del sistema inmune como el número total de células dentro de cada clonotipo distinto de CDR3 identificado dentro de la población; y (f) identificar el número de clonotipos distintos de CDR3 que comprenden un porcentaje significativo (N) de un número total de células contadas dentro de esa población, en el que un estado normal se caracteriza por la presencia de una mayor variedad de clonotipos distintos de CDR3 representados dentro del porcentaje significativo (N) del número total de células y un estado anormal se caracteriza por la presencia de un número menor de clonotipos distintos de CDR3 representados dentro del porcentaje significativo (N) del número total de células, en el que la diversidad de los clonotipos distintos de CDR3 se mide por el índice de diversidad (D_N), en el que D_N se determina por $C/S \times 100$, en el que C es un número mínimo de clonotipos distintos de CDR3 que representan un porcentaje mayor o igual a N de un total de lecturas de secuenciación obtenidas después de la amplificación y secuenciación de los polinucleótidos aislados de la población de células, en la que S es el número de clonotipos distintos de CDR3 en la configuración de dominancia clasificada.

La divulgación también tiene aplicación con respecto a la evaluación de la diversidad microbiana. Se han observado cambios en las poblaciones microbianas y en el número de poblaciones en la obesidad, en la diabetes y en las afecciones inflamatorias del intestino, por ejemplo. La identificación de perfiles de diversidad normales y anormales

utilizando el método de la invención puede ser útil como prueba diagnóstica utilizando muestras clínicas tomadas de fosas nasales, cavidades orales, piel, tracto gastrointestinal y/o tracto urogenital, por ejemplo.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es una gráfica que ilustra los números relativos de clonotipos de células T en la sangre de un individuo normal.

La Figura 2 es una gráfica que ilustra los números relativos de clonotipos de células T en la sangre de un individuo que ha sido diagnosticado con cáncer de colon. Se destacan claramente dos clones, y estos clones se han expandido a un nivel en el que constituyen un porcentaje significativo del número total de clonotipos.

La Figura 3 es una gráfica que ilustra los números relativos de clonotipos de células T en la sangre de un individuo que ha sido diagnosticado con cáncer de mama (subconjunto de células T citotóxicas). Se destacan claramente cuatro clones, que representan un porcentaje significativo del número total de clonotipos.

La Figura 4 muestra dos gráficas (4a y 4b), en las que 4a representa los números relativos de clonotipos de células T detectados en una muestra tomada de tejido canceroso, mientras que 4b representa el número total de clonotipos de células T detectados en una muestra tomada de sangre del mismo paciente (subconjunto de células T citotóxicas). El clon dominante que comprende la expansión clonal diferencial del inmunorrepositorio de este paciente es del subconjunto T_c.

Descripción detallada

El inventor ha desarrollado un método para distinguir los inmunorrepositorios de individuos normales y sanos de aquellos que tienen enfermedad sintomática y/o no sintomática. Este método utiliza la diferencia entre el nivel de diversidad de células inmunitarias que se ve generalmente en un individuo normal y sano y el nivel generalmente más bajo de diversidad que se observa en un individuo que tiene una o más afecciones patológicas como indicador de diagnóstico de la presencia de un estado inmune normal o anormal. En un aspecto de la invención, el nivel de diversidad se denomina D50, y D50 se define como el porcentaje mínimo de CDR3 distintas que representan al menos la mitad de las CDR3 totales en una población o subpoblación de células del sistema inmunológico. La tercera región determinante de la complementariedad (CDR3) es una región cuya secuencia de nucleótidos es única para cada clon de células T o B, cuanto mayor sea el número, mayor será el nivel de diversidad. D50 se puede describir de la siguiente manera. Cuando el "porcentaje significativo" del número total de células es del cincuenta por ciento (50%), el índice de diversidad (D50) también se puede definir como una medida de la diversidad de un repertorio inmune de células J individuales (el número total de CDR3) compuesto de CDR3 distintas de S en una configuración de dominancia clasificada en la que r_1 es la abundancia de la i_{ava} CDR3 más abundante, r_1 es la abundancia de la CDR3 más abundante, r_2 es la abundancia de la segunda CDR3 más abundante, y así sucesivamente. C es el número mínimo de CDR3 distintas, que representan el 50% del total de lecturas de secuenciación. D50, por lo tanto, viene dada por $C/S \times 100$.

Supongamos que $\underbrace{r_1 \geq r_2 \cdots \geq r_i \geq r_{i+1} \cdots \geq r_S}_S, \sum_{i=1}^S r_i = J$

si $\sum_{i=1}^C r_i \geq J/2$ y $\sum_{i=1}^{C-1} r_i < J/2$

$$D50 = \frac{C}{S} \times 100$$

El método de la invención se lleva a cabo utilizando las siguientes etapas para evaluar el nivel de diversidad de un inmunorrepositorio: (a) amplificar polinucleótidos de una población de glóbulos blancos de un sujeto humano o animal en una mezcla de reacción que comprende cebadores anidados específicos del objetivo para producir un conjunto de primeros amplicones, al menos una parte de los cebadores anidados específicos del objetivo que comprenden nucleótidos adicionales que, durante la amplificación, sirven como plantilla para incorporar en los primeros amplicones un sitio de unión para al menos un cebador común; (b) transferir una porción de la primera mezcla de reacción que contiene los primeros amplicones a una segunda mezcla de reacción que comprende al menos un cebador común; (c) amplificar, utilizando al menos un cebador común, los primeros amplicones para producir un conjunto de segundos amplicones; (d) secuenciar los segundos amplicones para identificar secuencias de reordenamiento de V(D)J en la subpoblación de glóbulos blancos, y (e) usar las secuencias de reordenamiento de V(D)J identificadas para cuantificar tanto el número total de células en una población de células del sistema inmune como el número total de células dentro de cada uno de los clonotipos identificados dentro de la población; y (f) identificar el número de clonotipos que comprende un porcentaje significativo de un número total de células contadas dentro de esa población, en el que un estado normal se caracteriza por la presencia de una mayor variedad de clonotipos representados dentro del porcentaje significativo (N) del número total de células y un estado anormal se caracteriza por la presencia de un número menor de clonotipos representados dentro del porcentaje significativo (N) del número total de células, en el que la diversidad de los clonotipos se mide por el índice de diversidad (D_N), en el que D_N se determina por $C/S \times 100$,

en el que C es un número mínimo de clonotipos distintos que representan un porcentaje mayor o igual a N de un total de lecturas de secuenciación de S obtenidas después de la amplificación y secuenciación de los polinucleótidos aislados de la población de células.

5 Previamente, ha sido difícil evaluar el sistema inmunológico de manera amplia, porque la cantidad y variedad de células en un sistema inmunitario humano o animal es tan grande que la secuenciación de más de un pequeño subconjunto de células ha sido casi imposible. El inventor desarrolló un método de PCR semicuantitativo (arm-PCR, descrito con más detalle en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 20090253183), que produce resultados semicuantitativos. Es esta capacidad para aumentar la especificidad y la sensibilidad y, por lo tanto, aumentar el número de objetivos detectables dentro de una sola muestra lo que hace que el método sea ideal para detectar números relativos de clonotipos del inmunorrepositorio. El inventor ha descubierto más recientemente que el uso de este método de secuenciación le permite comparar inmunorrepositorios de sujetos individuales, lo que ha llevado al desarrollo del método actual. El método se ha utilizado para evaluar a los sujetos que parecen normales, sanos y asintomáticos, así como a los sujetos a los que se les ha diagnosticado varias formas de cáncer, por ejemplo, y el inventor ha demostrado que la presencia de la enfermedad se correlaciona con una menor diversidad del inmunorrepositorio que puede detectarse fácilmente utilizando el método de la invención. Por lo tanto, este método puede ser útil como indicador de diagnóstico, al igual que los recuentos de células y las pruebas bioquímicas que se utilizan actualmente en la práctica clínica.

20 Los clonotipos (es decir, los tipos clonales) de un inmunorrepositorio se determinan mediante la reorganización de los segmentos de los genes Variable (V), Diverso (D) y de Unión (J) a través de la recombinación somática en las primeras etapas de producción de inmunoglobulina (Ig) y del receptor de células T (TCR) del sistema inmune. El reordenamiento de V(D)J puede amplificarse y detectarse a partir de las cadenas alfa, beta, gamma y delta del receptor de células T, así como de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) y las cadenas ligeras (IgK, IgL). Las células pueden obtenerse de un paciente obteniendo sangre periférica, tejido linfoide, tejido canceroso o tejido o fluidos de otros órganos y/o sistemas de órganos, por ejemplo. Las técnicas para obtener estas muestras, tales como muestras de sangre, son conocidas por los expertos en la técnica. "Cuantificar clonotipos", como se usa en este documento, significa contar u obtener una aproximación confiable de los números de células que pertenecen a un clonotipo particular. Los recuentos celulares pueden extrapolarse a partir del número de secuencias detectadas mediante la amplificación por PCR y secuenciación.

La región CDR3, que comprende aproximadamente 30-90 nucleótidos, abarca la unión de los segmentos del gen variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) recombinados. Codifica la especificidad de unión del receptor y es útil como una etiqueta de secuencia para identificar reordenamientos V(D)J únicos.

40 Wang et al., divulgaron que la PCR se puede usar para obtener evaluaciones cuantitativas o semicuantitativas del número de moléculas objetivo en un espécimen (Wang, M. et al., "Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction", (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 86: 9717-9721). Métodos particularmente efectivos para lograr la amplificación cuantitativa han sido descritos previamente por el inventor. Uno de estos métodos se conoce como arm-PCR, que se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 20090253183A1.

45 Los aspectos de la invención incluyen la amplificación por arm-PCR de CDR3 de células T, células B y/o subconjuntos de células T o B. El término "población" de células, como se usa en el presente documento, abarca, por lo tanto, lo que generalmente se denomina "poblaciones" o "subpoblaciones" de células. Una gran cantidad de productos amplificados se pueden secuenciar de manera eficiente utilizando la secuenciación de próxima generación utilizando plataformas como 454 o Illumina, por ejemplo. Si el porcentaje significativo que se elige es del 50%, el número puede denominarse "D50". D50 puede ser el porcentaje de clones de células T o B dominantes y únicas que representan el cincuenta por ciento (50%) del total de células T o B contabilizadas en esa muestra. Para la secuenciación de alto rendimiento, por ejemplo, D50 puede ser el número de las CDR3 más dominantes, entre todas las CDR3 únicas, que constituyen el 50% de las lecturas efectivas totales, en las que las lecturas efectivas totales se definen como el número de secuencias con segmentos de genes V y J identificables que se han analizado con éxito a través de una serie de filtros de error.

55 El método de arm-PCR proporciona una amplificación semicuantitativa altamente sensible de múltiples polinucleótidos en una reacción. El método de arm-PCR también se puede realizar mediante métodos automatizados en un sistema de casete cerrado (iCubate®, Huntsville, Alabama), que es beneficioso en el método presente porque los repertorios de varias células T y B, por ejemplo, son muy grandes. En el método de arm-PCR, los números objetivo se incrementan en una reacción impulsada por la ADN polimerasa, que es el resultado de cebadores específicos objetivo que se introducen en la reacción. Un resultado adicional de esta reacción de amplificación es la introducción de sitios de unión para cebadores comunes que se utilizarán en una amplificación posterior mediante la transferencia de una porción de la primera mezcla de reacción que contiene el primer conjunto de amplicones a una segunda mezcla de reacción que comprende cebadores comunes. "Al menos un cebador común", como se usa en el presente documento, se refiere a al menos un cebador que se unirá a dicho sitio de unión, e incluye pares de cebadores, tales como cebadores directos e inversos. Esta transferencia puede realizarse recuperando una parte de la mezcla de reacción de la primera reacción de amplificación e introduciendo esa muestra en un segundo tubo o cámara de reacción, o eliminando una parte del

líquido de la primera amplificación completada, dejando una parte, y la adición de reactivos frescos en el tubo en el que se realizó la primera amplificación. En cualquier caso, se pueden agregar reguladores adicionales, polimerasa, etc., junto con los cebadores comunes para producir productos amplificados para la detección. La amplificación de las moléculas objetivo utilizando cebadores comunes produce un resultado semicuantitativo en el que los números cuantitativos de objetivos amplificados en la primera amplificación se amplifican utilizando cebadores comunes, en lugar de específicos del objetivo, lo que hace posible producir un número significativamente mayor de objetivos para detección y para determinar las cantidades relativas de las células que comprenden varios reordenamientos dentro de una muestra de sangre del paciente. Además, la combinación de la segunda mezcla de reacción con una porción de la primera mezcla de reacción permite que se agreguen concentraciones más altas de cebadores específicos del objetivo a la primera mezcla de reacción, lo que resulta en una mayor sensibilidad en la primera reacción de amplificación. Es la combinación de especificidad y sensibilidad, junto con la capacidad de lograr resultados cuantitativos mediante el uso de un método como el método de arm-PCR, lo que permite una evaluación suficientemente sensible y cuantitativa del tipo y número de clonotipos en una población de células para producir un índice de diversidad que sea de uso diagnóstico.

La expansión clonal debida al reconocimiento del antígeno da como resultado una mayor población de células que reconocen ese antígeno, y la evaluación de las células por sus números relativos proporciona un método para determinar si una exposición al antígeno ha influido en la expansión de células B productoras de anticuerpos o células T portadoras del receptor. Esto es útil para evaluar si puede haber una población particular de células que prevalece en personas que han sido diagnosticadas con una enfermedad en particular, por ejemplo, y puede ser especialmente útil para evaluar si una vacuna ha logrado o no la respuesta inmune deseada en individuos a quienes se les ha suministrado la vacuna.

Los cebadores para amplificar y secuenciar regiones variables de células del sistema inmune están disponibles comercialmente, y se han descrito en publicaciones tales como las solicitudes de patente publicadas del inventor WO2009137255 y US201000021896A1.

Hay varias tecnologías de secuenciación de alto rendimiento disponibles comercialmente, tales como el sistema de secuenciación 454® de Hoffman-LaRoche, Inc. En el método de secuenciación 454®, por ejemplo, los adaptadores A y B se conectan a los productos de PCR durante la PCR o se ligan después de la reacción de la PCR. Los adaptadores se utilizan para etapas de amplificación y secuenciación. Cuando se realiza junto con la técnica de Arm-PCR, los adaptadores A y B se pueden usar como cebadores comunes (que a veces se denominan "cebadores comunales" o "supercebadores") en las reacciones de amplificación. Una vez que los adaptadores A y B se han unido físicamente a una biblioteca de muestras (como los amplicones de PCR), se prepara una biblioteca de ADN de una sola hebra utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. La biblioteca de ADN de una sola hebra se inmoviliza en perlas de captura de ADN diseñadas específicamente. Cada perla porta un fragmento único de la biblioteca de ADN de una sola hebra. La biblioteca unida a la perla se emulsiona con reactivos de amplificación en una mezcla de agua en aceite, produciendo microrreactores, cada uno de los cuales contiene solo una perla con un fragmento único de biblioteca de muestras. Cada fragmento único de biblioteca de muestra se amplifica dentro de su propio microrreactor, excluyendo las secuencias competidoras o contaminantes. La amplificación de toda la colección de fragmentos se realiza en paralelo. Para cada fragmento, esto da como resultado números de copias de varios millones por perla. Posteriormente, la PCR de la emulsión se rompe mientras que los fragmentos amplificados permanecen unidos a sus perlas específicas. Los fragmentos amplificados clonalmente se enriquecen y se cargan en un dispositivo PicoTiterPlate® para la secuenciación. El diámetro de los pozos de PicoTiterPlate® permite solo una perla por pozo. Después de la adición de enzimas de secuenciación, el subsistema de fluidos del instrumento de secuenciación hace que los nucleótidos individuales fluyan en un orden fijo a través de los cientos de miles de pozos que contienen cada uno una sola perla. La adición de uno (o más) nucleótidos complementarios a la hebra de la plantilla da como resultado una señal quimioluminiscente grabada por una cámara CCD dentro del instrumento. La combinación de la intensidad de la señal y la información de posición generada a través del dispositivo PicoTiterPlate® permite al software determinar la secuencia de más de 1.000.000 de lecturas individuales, cada una de hasta aproximadamente 450 pares de bases, con el sistema GS FLX.

Habiendo obtenido las secuencias usando un método cuantitativo y/o semicuantitativo, es posible calcular el D50, por ejemplo, determinando el porcentaje de clones que representan al menos aproximadamente el 50% del total de clones detectados en la muestra del paciente. Los intervalos normales pueden compararse con los números obtenidos para un paciente individual, y el resultado puede informarse como un número y como un resultado normal o anormal. Esto proporciona a un médico una prueba clínica adicional para fines de diagnóstico. Los resultados para las muestras de pacientes de un individuo sano, un paciente con cáncer de colon y un paciente con cáncer de pulmón se muestran a continuación en la Tabla 1. Estos resultados son de poblaciones de células T, expresadas como un promedio de resultados de 8 (normales de la misma edad) a 10 muestras (cáncer de colon, cáncer de pulmón).

Tabla 1

Condición de salud	D50 (Tc)	D50 (Tr)	D50 (Th)
Saludable/Normal	23,6	43,5	38,9
Cáncer de colon	4,5	21,7	28,3
Cáncer de pulmón	4,5	17,1	26,8

Como cada número representa el porcentaje de clones que representan aproximadamente el 50 por ciento del número total de secuencias detectadas en la población que se está evaluando, es claro a partir de los números anteriores que la falta de diversidad de inmunorrepositorio, expresado como una desviación de la normal, puede ser un criterio útil para uso en paneles de pruebas de diagnóstico. El método de la invención, particularmente si se usa en un sistema automatizado como el descrito por el inventor en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 201000291668A1, se puede usar para analizar muestras de múltiples pacientes, con la detección de las secuencias objetivo amplificadas que se llevan a cabo mediante el uso de uno o más microarreglos.

La hibridación, que utiliza al menos un microarreglo, también se puede usar para determinar el D50 de un inmunorrepositorio de un individuo. En tal método, el D50 se calcularía como el porcentaje de los genes variables más dominantes (genes V y/o J) que representaría al menos el 50% de la señal total de todos los genes V y J.

La Tabla 2 ilustra la diferencia en la diversidad de células B, como lo demuestra el D50, entre (8) individuos normales y sanos y (20) individuos con leucemia linfocítica crónica y (12) pacientes con lupus

Tabla 2

Condición del paciente	D50 (IgH)
Saludable/Normal	95,3
Leucemia linfocítica crónica	17,86
Lupus	26,5

Recientemente, investigadores en diversos laboratorios han informado que la diversidad microbiana dentro de un ser humano o animal (el "microbioma") también cambia cuando el estado saludable cambia a un estado menos saludable. Por ejemplo, los cambios en las poblaciones microbianas se han asociado con diversos trastornos gastrointestinales, con la obesidad y con la diabetes, por ejemplo. Zaura et al., (Zaura, E. et al., "Defining the healthy" 'core microbiome' of oral microbial communities". BMC Microbiology (2009) 9: 259) reportaron que una proporción importante de las secuencias bacterianas de individuos sanos no relacionados es idéntica, y la proporción cambia en individuos que tienen una enfermedad oral. El método de Arm-PCR, combinado con una secuenciación de alto rendimiento, proporciona un método relativamente rápido, altamente sensible, específico y semicuantitativo para evaluar la diversidad de poblaciones microbianas para establecer un valor D50 microbiano, por ejemplo, para diversos tejidos humanos o animales. Arm-PCR ha demostrado ser bastante eficaz para identificar bacterias en poblaciones mixtas obtenidas de muestras clínicas.

Ejemplos

Muestras de pacientes

Se adquirieron muestras de sangre entera (40 mL) recogidas en heparina sódica de 10 pacientes con cáncer de pulmones y 10 de colon, y 10 de mama a través de Conversant Healthcare Systems (Huntsville, Alabama). Las muestras de sangre entera (40 mL) recogidas en heparina sódica de 8 muestras de control normal se adquirieron a través de ProMedDx (Norton, MA).

Aislamiento de subconjuntos de células T

Los aislamientos de células T se realizaron utilizando perlas de poliestireno superparamagnéticas (MiltenyiBiotec) recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para cada subconjunto de células T. A partir de sangre entera, se obtuvieron células mononucleares mediante la preparación de Ficoll y se extrajeron los monocitos usando microperlas anti-CD14. Esta fracción mononuclear empobrecida en monocitos se usó luego como fuente para fracciones específicas de subconjuntos de células T.

Se aislaron células T CD8⁺ citotóxicas mediante selección negativa utilizando perlas de clasificación múltiple anti-CD4 (MiltenyiBiotec), seguido por selección positiva con perlas anti-CD8. Se aislaron células T CD4⁺ mediante selección positiva con perlas anti-CD4. Se utilizaron perlas anti-CD25 (MiltenyiBiotec) para seleccionar células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺. Todas las poblaciones de células aisladas se resuspendieron inmediatamente en RNeasy Protect (Qiagen).

Extracción de ARN y amplificación del repertorio

La extracción de ARN se realizó utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para cada objetivo, se diseñó un conjunto de cebadores anidados específicos de secuencia (directo externo, Fo; directo interno, Fi; inverso externo, Ro; y inverso interno, Ri) utilizando el software de cebadores disponible en www.irepertoire.com. Se enlazó un par de etiquetas de secuencia comunes a todos los cebadores internos (Fi y Ri). Una vez que estas secuencias de etiquetas se incorporaron en los productos de PCR en los primeros pocos ciclos de amplificación, se llevó a cabo la fase exponencial de la amplificación con un par de cebadores comunes. En la primera ronda de amplificación, solo se utilizaron cebadores anidados específicos de la secuencia. Luego, los cebadores anidados se eliminaron mediante digestión con exonucleasa y se usaron los productos de la primera ronda de la PCR

como plantillas para una segunda ronda de amplificación agregando cebadores comunes y una mezcla de enzima fresca y dNTP. Cada etiqueta de código de barras distinta se introdujo en el amplicón de la misma muestra a través del cebador de PCR.

5 Secuenciación

10 Los productos de amplicón etiquetados con código de barras de diferentes muestras se agruparon y se cargaron en un gel de agarosa al 2%. Después de la electroforesis, los fragmentos de ADN se purificaron a partir de la banda de ADN correspondiente a los fragmentos de 250-500 pb extraídos del gel de agarosa. El ADN se secuenció utilizando el sistema 454 GS FLX con kits de titanio (SeqWright, Inc.).

 Análisis de los datos de secuenciación

15 Las secuencias para cada muestra se clasificaron de acuerdo con la etiqueta del código de barras. Después de la separación de la secuencia, el análisis de la secuencia se realizó de manera similar al enfoque informado por Wang et al., (Wang C, et al., High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. Proc Natl Acad Sci USA 107(4): 1518-1523). Brevemente, las secuencias de referencia V y J de línea germinal, que se descargaron del servidor IMGT (<http://www.imgt.org>), se mapearon en lecturas de secuencia usando el programa IRmap. Los límites que definen la región CDR3 en secuencias de referencia se reflejaron en las lecturas de secuencia a través de la información de mapeo. Las regiones CDR3 adjuntas en las lecturas de secuenciación se extrajeron y se tradujeron en secuencias de aminoácidos.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el nivel de diversidad de un inmunorrepertorio que comprende las etapas de:

- 5 (a) amplificar polinucleótidos de una población de glóbulos blancos de un sujeto humano o animal en una mezcla de reacción que comprende cebadores anidados específicos del objetivo para producir un conjunto de primeros amplicones, al menos una parte de los cebadores anidados específicos del objetivo que comprenden nucleótidos adicionales que, durante la amplificación, sirven como plantilla para incorporar en los primeros amplicones un sitio de unión para al menos un cebador común;
 - 10 (b) transferir una porción de la primera mezcla de reacción que contiene los primeros amplicones a una segunda mezcla de reacción que comprende al menos un cebador común;
 - (c) amplificar, utilizando al menos un cebador común, los primeros amplicones para producir un conjunto de segundos amplicones;
 - 15 (d) secuenciar los segundos amplicones para identificar secuencias de reordenamiento de V(D)J en la subpoblación de glóbulos blancos,
 - (e) usar las secuencias de reordenamiento de V(D)J identificadas para cuantificar tanto el número total de células en una población de células del sistema inmune como el número total de células dentro de cada clonotipo de CDR3 distinto identificados dentro de la población; y
 - 20 (f) identificar el número de clonotipos de CDR3 distintos que comprende un porcentaje significativo (N) de un número total de células contadas dentro de esa población, en el que un estado normal se caracteriza por la presencia de una mayor variedad de clonotipos CDR3 distintos representados dentro del porcentaje significativo (N) del número total de células y un estado anormal se caracteriza por la presencia de un número menor de clonotipos CDR3 distintos representados dentro del porcentaje significativo (N) del número total de células,
 - 25 en el que la diversidad de los clonotipos de CDR3 distintos se mide por el índice de diversidad (D_N), en el que D_N se determina por $C/S \times 100$, en el que C es un número mínimo de clonotipos CDR3 distintos que representan un porcentaje mayor o igual a N de un total de lecturas de secuenciación obtenidas después de la amplificación y secuenciación de los polinucleótidos aislados de la población de células en el que S es el número de clonotipos de CDR3 distintos en configuración de dominancia clasificada.
 - 30
2. El método de la reivindicación 1, en el que el porcentaje significativo (N) es un número en porcentaje de 25 a 75.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el porcentaje significativo (N) es aproximadamente el 50 por ciento.

Fig. 1



Fig. 2

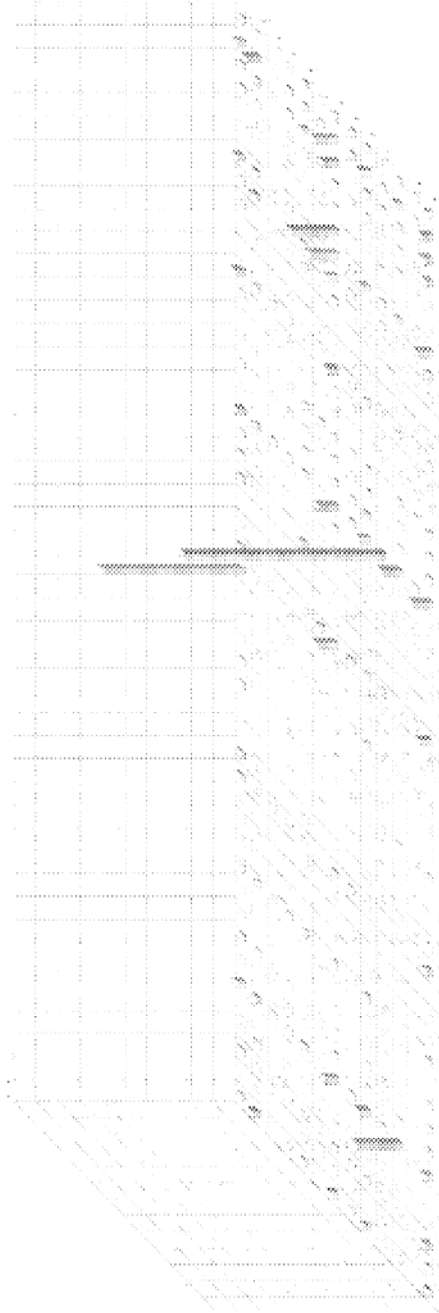


Fig. 3

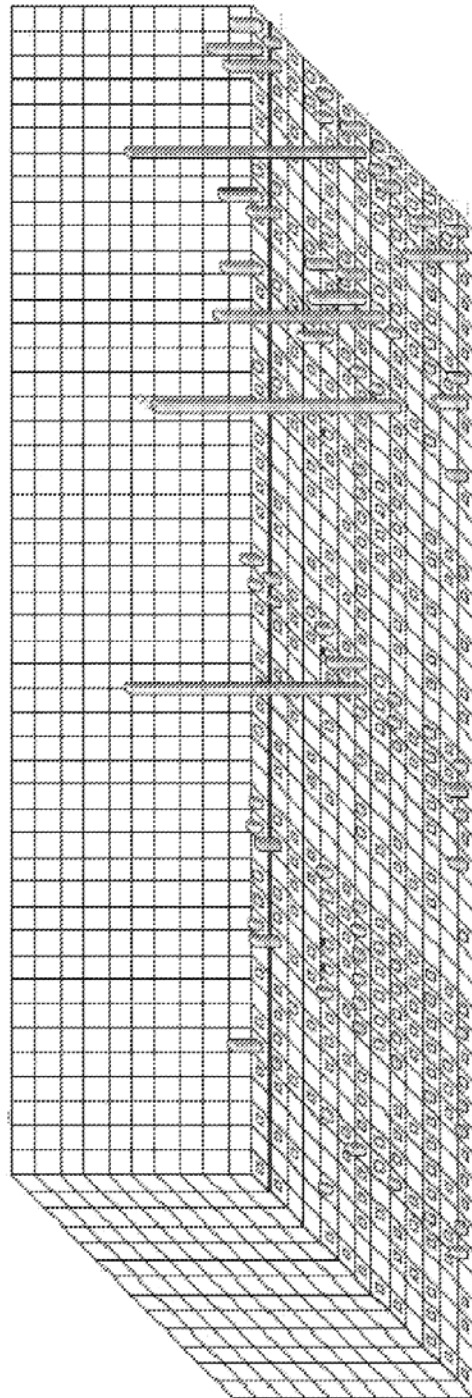


Fig. 4

