

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 118**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 17199432 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3330384**

54 Título: **Evaluación de la inmunocompetencia por la diversidad de los receptores de inmunidad adaptativa y caracterización de la clonalidad**

30 Prioridad:

01.10.2012 US 201261708534 P

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

19.03.2020

73 Titular/es:

**ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES CORPORATION
(50.0%)
1551 Eastlake Avenue East, Suite 200
Seattle, Washington 98102 , US y
MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROBINS, HARLAN;
RUBINSTEIN, JULIE;
EMERSON, RYAN y
YUAN, JIANDA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 749 118 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

Evaluación de la inmunocompetencia por la diversidad de los receptores de inmunidad adaptativa y caracterización de la clonalidad

5

Antecedentes**Campo técnico**

10 La presente descripción se refiere generalmente a la evaluación de la inmunocompetencia del sistema inmunitario adaptativo de un sujeto mediante cuantificación altamente sensible, de alto rendimiento basada en secuencias de ADN de la diversidad y frecuencia de aparición (p.ej., expansión clonal) de células del sistema inmunitario adaptativo que tienen una secuencia génica que codifica un receptor de células T reordenado concreto (TCR) o inmunoglobulina (IG o Ig). La información sobre el estado inmunológico de un sujeto o una población de sujetos se puede utilizar, por ejemplo, para caracterizar a un individuo o estratificar una población de pacientes con respecto a la capacidad de armar una respuesta inmunitaria o probabilidad de responder a la inmunoterapia o la probabilidad de desarrollar un efecto secundario mediado por el sistema inmunitario en respuesta a dicha terapia, o para informar de otra manera de un curso de gestión de inmunoterapia clínica.

20 **Descripción de la técnica relacionada**

El sistema inmunitario adaptativo protege a los organismos superiores contra infecciones y otros eventos patológicos que pueden ser atribuibles a sustancias extrañas, utilizando receptores de la inmunidad adaptativa, las proteínas de reconocimiento específicas de antígeno que son expresadas por células hematopoyéticas del linaje linfóide y que son capaces de autodistinguirse de moléculas no propias en el anfitrión. Estos linfocitos se pueden encontrar en la circulación y los tejidos de un anfitrión, y se ha descrito su recirculación entre sangre y vasos linfáticos, incluida su extravasación a través de vénulas endoteliales altas de nódulos linfáticos, así como en sitios de infección, inflamación, lesión tisular y otros insultos clínicos. (Véase, por ejemplo, Stein et al., 2005 Immunol. 116: 1-12; DeNucci et al., 2009 Crit. Rev. Immunol. 29: 87-109; Marelli-Berg et al., 2010 Immunol. 130:158; Ward et al., 2009 Biochem. J. 418:13; Gonzalez et al., 2011 Ann. Rev. Immunol. 29:215; Kehrl et al., 2009 Curr. Top. Microb. Immunol. 334:107; Steinmetz et al., 2009 Front. Biosci. (Schol. Ed.) 1:13.)

Por consiguiente, la naturaleza dinámica del movimiento de los linfocitos en un organismo anfitrión se refleja en cambios cualitativos (p.ej., especificidad de antígeno del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa expresado clonalmente (inmunoglobulina o receptor de células T), células T frente a células B, células T auxiliares (T_H) frente a células T reguladoras (T_{reg}), células T efectoras frente a células T de memoria, etc.) y distribución cuantitativa de linfocitos entre tejidos, como una función de los cambios en el estado inmunológico del anfitrión.

El sistema inmunitario adaptativo emplea varias estrategias para generar un repertorio de receptores de antígenos de células T y B con diversidad suficiente para reconocer el universo de posibles patógenos. Los linfocitos B maduran para expresar anticuerpos (inmunoglobulinas, Ig) que se producen como heterodímeros de un polipéptido de cadena pesada (H) y ligera (L), mientras que los linfocitos T expresan receptores de células T heterodiméricos (TCR). La capacidad de las células T para reconocer el universo de antígenos asociados con diversos cánceres u organismos infecciosos es conferida por su receptor de antígeno de células T (TCR), que es un heterodímero que comprende una cadena α (alfa) y una cadena β (beta) o una cadena γ (gamma) y una cadena δ (delta). Las proteínas que componen estas cadenas están codificadas por ADN que emplea un mecanismo único para generar la tremenda diversidad del TCR. Este receptor de reconocimiento inmunitario de múltiples subunidades se asocia con el complejo CD3 y se une a los péptidos presentados por las proteínas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). La unión de TCR al péptido antigénico en la APC es un evento central en la activación de células T, que se produce en una sinapsis inmunológica en el punto de contacto entre la célula T y la APC.

Cada péptido de TCR contiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) variables, así como regiones estructurales (FR) y una región constante. La diversidad de secuencias de las células T $\alpha\beta$ está determinada en gran parte por la secuencia de aminoácidos de los terceros bucles de la región determinante de la complementariedad (CDR3) de los dominios variables de la cadena α y β , cuya diversidad es el resultado de la recombinación entre segmentos génicos variables (V_β), de diversidad (D_β), y de unión (J_β) en el locus de la cadena β , y entre segmentos génicos V_α y J_α análogos en el locus de la cadena α , respectivamente. La existencia de una multitud de tales segmentos génicos en los loci de la cadena α y β de los TCR permite codificar una gran cantidad de secuencias de CDR3 distintas. La diversidad de la secuencia de CDR3 aumenta adicionalmente mediante la delección y la adición de nucleótidos independiente del molde en las uniones V_β - D_β , D_β - J_β , y V_α - J_α durante el proceso de reordenamiento del gen de TCR. A este respecto, la inmunocompetencia se refleja en la diversidad de TCR.

El TCR $\gamma\delta$ es distintivo del TCR $\alpha\beta$ porque codifica un receptor que interactúa estrechamente con el sistema

inmunitario innato. El TCR $\gamma\delta$, se expresa al inicio del desarrollo, tiene una distribución anatómica especializada, tiene especificidades únicas de patógenos y moléculas pequeñas, y tiene un amplio espectro de interacciones celulares innatas y adaptativas. Se establece temprano en la ontogenia un patrón sesgado de expresión de los segmentos V y J de TCR γ ya que los subconjuntos restringidos de células TCR $\gamma\delta$ pueblan la boca, la piel, el intestino, la vagina y los pulmones prenatalmente. En consecuencia, el repertorio diverso de TCR γ en tejidos adultos es el resultado de una amplia expansión periférica después de la estimulación por exposición ambiental a patógenos y moléculas tóxicas.

Las Ig expresadas por las células B son proteínas que consisten en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (cadenas H) y dos cadenas ligeras (cadenas L), que forman una estructura H₂L₂. Cada par de cadenas H y L contiene un dominio hipervariable, que consiste en una región V_L y una V_H, y un dominio constante. Las cadenas H de las Ig son de varios tipos, μ , δ , γ , α y β . La diversidad de las Ig dentro de un individuo está determinada principalmente por el dominio hipervariable. Similar al TCR, el dominio V de las cadenas H se crea por la unión combinatoria de los segmentos génicos V_H, D_H y J_H. La diversidad de la secuencia del dominio hipervariable se incrementa adicionalmente mediante delección y la adición independiente del molde de nucleótidos en las uniones V_H-D_H, D_H-J_H, y V_H-J_H durante el proceso de reordenamiento del gen Ig. A este respecto, la inmunocompetencia se refleja en la diversidad de las Ig.

La caracterización cuantitativa de las células relacionadas con la inmunidad adaptativa basada en la presencia en tales células de genes que codifican Ig y TCR funcionalmente reordenados que dirigen la expresión productiva de los receptores de la inmunidad adaptativa se ha logrado utilizando muestras biológicas a partir de las cuales las células del sistema inmunitario adaptativo pueden aislarse fácilmente en cantidades significativas, tales como sangre, linfa u otros fluidos biológicos. En estas muestras, las células del sistema inmunitario adaptativo se presentan como partículas en suspensión fluida. Véase, p.ej., el documento US 2010/0330571; véase también p.ej., Murphy, Janeway's Immunobiology (8ª Ed.), 2011 Garland Science, NY, Apéndice I, pág. 717-762.

Desde hace mucho tiempo, se ha implicado al sistema inmunitario adaptativo como un factor en el reconocimiento de las células cancerosas y en la generación subsiguiente de una respuesta inmunitaria para eliminar tumores (p.ej., Murphy, Janeway's Immunobiology (8ª Ed.), 2011 Garland Science, NY, pág. 682-697; Pandolfi et al., 2011 Clin. Dev. Immunol. Artículo ID894704; Draghiciu et al., 2011 Clin. Dev. Immunol. Artículo ID439053) La variabilidad entre los perfiles antigénicos presentados por diferentes células cancerosas y la variabilidad en la solidez de las respuestas inmunitarias antitumorales de diferentes individuos, han llevado a una cantidad de enfoques clínicos ampliamente diferentes que generalmente se conocen como inmunoterapia del cáncer, por lo cual se realizan esfuerzos para inducir, reclutar, aumentar o potenciar de otro modo la respuesta inmunitaria adaptativa, en este contexto, estimulando la inmunidad antitumoral.

Tales enfoques inmunoterapéuticos representan alternativas preferibles a las terapias convencionales contra el cáncer, que pueden ser no específicas de células cancerosas y pueden implicar regímenes citotóxicos duros tales como radiación y quimioterapia. La inmunoterapia del cáncer a veces se administra a pacientes que también reciben quimioterapia o radioterapia, pero debido a que la quimioterapia y la radiación son particularmente citotóxicas para dividir las células, mientras que la proliferación de inmunocitos puede ser una característica cardinal de muchas respuestas inmunitarias, dichos enfoques pueden comprometer de forma contraproducente el sistema inmunológico adaptativo y, por lo tanto, pueden ir acompañados de dificultades para llegar a regímenes terapéuticos eficaces.

En consecuencia, sería deseable tener una comprensión detallada del estado inmunológico del paciente para diseñar un régimen de inmunoterapia eficaz, en el contexto del cáncer y también, por ejemplo, en casos de trasplante de células hematopoyéticas o trasplante de órganos sólidos (p.ej., para detectar y tratar apropiadamente el rechazo inmunológico de un injerto), en el tratamiento de infecciones microbianas, y para optimizar las respuestas a las vacunas. Las formas de realización descritas actualmente abordan estas necesidades y proporcionan otras ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para determinar un estado inmunológico de un sujeto de ensayo, que comprende obtener información de las secuencias de ácido nucleico generadas a partir de una o más muestras que comprenden ácidos nucleicos de células linfoides de dicho sujeto de prueba, en donde dicha información de las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias para una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas, codificando cada una de dicha pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas un polipéptido AIR, dichas una o más muestras obtenidas de dicho sujeto de prueba en uno o más puntos temporales para dichas una o más muestras, utilizar dicha información de secuencia de ácido nucleico, determinar un número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra; determinar un número total de secuencias de ADN reordenadas únicas en dicha muestra; cuantificar una puntuación de diversidad de secuencia de AIR para dichas una o más muestras en base a dicho número total de secuencias de ADN reordenadas únicas; cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR para

dichas una o más muestras calculando una frecuencia de aparición de cada secuencia de ADN reordenada única como un porcentaje de dicho número total de secuencias reordenadas observadas en dichas una o más muestras; y determinar una puntuación de calificación del sujeto de prueba para determinar dicho estado inmunológico de dicho sujeto de prueba en base a dicha puntuación de diversidad de secuencia de AIR y dicha puntuación de distribución de secuencia de AIR de dicho sujeto de prueba.

5

En algunas realizaciones, el método incluye comparar dichas puntuaciones de calificación de sujetos de prueba para una o más muestras con un segundo conjunto de puntuaciones de calificación de sujetos de control obtenidas de muestras de un sujeto de control y determinar dicho estado inmunológico de dicho sujeto de prueba en dichos uno o más puntos temporales, en donde se determina que dicho sujeto de prueba tiene un estado inmunológico en dichos uno o más puntos temporales que es diferente de un estado inmunológico de dicho sujeto de control, si la diferencia entre dicha puntuación de calificación del sujeto de prueba y dicha puntuación de calificación del sujeto de control es estadísticamente significativa y en donde se determina que dicho sujeto de prueba tiene el mismo estado inmunológico de dicho sujeto de control si no hay una diferencia estadísticamente significativa entre dicha puntuación de calificación del sujeto de prueba y dicha puntuación de calificación del sujeto de control.

10

15

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden ADN genómico. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden ADNc. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden ARN mensajero.

20

En algunas realizaciones, los métodos de la invención también incluyen etapas para cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR para dicho sujeto que comprende determinar un número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 50% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra; y caracterizar una puntuación de distribución de secuencia de AIR como puntuación baja si el número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 50% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra es menor o igual a un umbral predeterminado.

25

En una realización, el método incluye cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR para dicho sujeto que comprende determinar un número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 40% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra; y caracterizar una puntuación de distribución de secuencia de AIR como puntuación baja si el número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 40% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra es menor o igual a un umbral predeterminado.

30

En otra realización, el método incluye cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR para dicho sujeto que comprende determinar un número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 30% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra; y caracterizar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR como puntuación baja si el número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 30% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra es menor o igual a un umbral predeterminado.

35

40

En otra realización más, el método incluye cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR para dicho sujeto que comprende determinar un número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 20% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra; y caracterizar una puntuación de distribución de secuencia de AIR como puntuación baja si el número de secuencias de AIR reordenadas únicas que tienen una frecuencia combinada de aparición de hasta 20% del número total de secuencias reordenadas observadas en dicha muestra es menor o igual a un umbral predeterminado.

45

En otras realizaciones, el método comprende cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR que comprende seleccionar al menos una secuencia reordenada única que tiene la frecuencia más alta de aparición en cada punto temporal en comparación con las frecuencias de aparición para cada una de las secuencias reordenadas únicas restantes en dicha muestra y determinar un perfil de distribución de la secuencia de AIR para dicha al menos una secuencia reordenada única a lo largo del tiempo en dicho sujeto de prueba.

50

En otra realización, el método comprende seleccionar una pluralidad de la secuencia de AIR reordenada única más abundante que tiene una frecuencia de aparición en cada punto temporal que es estadísticamente significativamente más alta que una frecuencia promedio de aparición para el número total de secuencias de ADN reordenadas únicas y determinar un perfil de distribución de la secuencia de AIR para cada una de dichas secuencias reordenadas únicas más abundantes a lo largo del tiempo en dicho sujeto de prueba.

55

60

En otra realización más, el método incluye cuantificar dicha puntuación de diversidad de secuencia de AIR que comprende determinar un número total de clones únicos en dicha muestra.

En ciertas realizaciones, el sujeto de control tiene un estado inmunológico conocido. En una realización, el sujeto de

control es un sujeto sano y tiene un estado inmunológico no comprometido. En otra realización, el sujeto de control tiene un estado inmunológico comprometido.

5 En algunas realizaciones, el sujeto de control tiene un resultado conocido de respuesta a la inmunoterapia. En una realización, la respuesta es una respuesta positiva a la inmunoterapia. En una realización, la respuesta es una respuesta escasa a la inmunoterapia.

10 En otra realización, se predice que el sujeto de prueba tiene el mismo resultado de respuesta a la inmunoterapia en comparación con el sujeto de control. En otra realización más, se predice que el sujeto de prueba tendrá un resultado de respuesta diferente a la inmunoterapia en comparación con el sujeto de control.

15 En ciertas realizaciones, el sujeto de control tiene un resultado conocido de respuesta a un trasplante de células madre. En una realización, la respuesta puede ser una respuesta positiva al trasplante de células madre. En otra realización, la respuesta es una respuesta escasa al trasplante de células madre. En otra realización más, se predice que el sujeto de prueba tiene el mismo resultado de respuesta al trasplante de células madre en comparación con el sujeto de control. En otras realizaciones, se predice que el sujeto de prueba tiene un resultado diferente de la respuesta al trasplante de células madre en comparación con el sujeto de control.

20 En ciertos aspectos, el sujeto de control tiene un resultado conocido de respuesta a un tratamiento. En algunos aspectos, el tratamiento comprende un anticuerpo inmunoterapéutico, una citocina, un trasplante de células hematopoyéticas, un agente inmunosupresor o una vacuna.

En otros aspectos, la una o más muestras comprenden muestras de tejido sólido obtenidas del sujeto de prueba.

25 En un aspecto, la una o más muestras comprenden muestras de sangre obtenidas del sujeto de prueba. En ciertas realizaciones, cuando una o más muestras comprenden muestras de sangre, una puntuación baja de diversidad de secuencia de AIR y una puntuación baja de distribución de secuencia de AIR se caracterizan como una puntuación baja de calificación del sujeto de prueba y son indicativas de una alta clonalidad de TCR en dicho sujeto de prueba. En otras realizaciones, una puntuación de calificación baja del sujeto de prueba es predictiva de una respuesta deficiente a la inmunoterapia en dicho sujeto de prueba. En otra realización, una puntuación alta de diversidad de secuencia de AIR y una puntuación alta de distribución de secuencia de AIR se caracterizan como una puntuación alta de calificación del sujeto de prueba y son indicativas de una baja clonalidad de TCR. En otras realizaciones, una puntuación alta de calificación del sujeto de prueba es predictiva de una respuesta positiva a la inmunoterapia en dicho sujeto de prueba.

35 En otras realizaciones, el sujeto de prueba ha sido tratado con inmunoterapia. En algunas realizaciones, la inmunoterapia comprende la administración de un inhibidor de un regulador negativo del sistema inmunitario. En una realización, el regulador negativo se selecciona entre un grupo que consiste en CTLA-4 y PD-1. En otra realización, el regulador negativo es CTLA-4. En otra realización más, el regulador negativo es PD-1. En ciertos aspectos, el inhibidor es un anticuerpo anti-CTLA-4. En otro aspecto, el inhibidor es un anticuerpo anti-PD-1.

40 En otros aspectos más, las una o más muestras comprenden muestras de tumores sólidos obtenidas del sujeto de prueba. En algunas realizaciones, en muestras de tumores sólidos, una puntuación alta de diversidad de secuencia de AIR y una puntuación alta de distribución de secuencia de AIR se caracterizan como puntuación baja de calificación del sujeto de prueba y son indicativas de una baja clonalidad de TCR en dicho sujeto de prueba.

45 En una realización, en muestras de tumores sólidos, una puntuación baja de calificación del sujeto de prueba es predictiva de una respuesta deficiente a la inmunoterapia. En otra realización, una puntuación baja de diversidad de secuencia de AIR y una puntuación baja de distribución de secuencia de AIR se caracterizan como una puntuación alta de calificación del sujeto de prueba y son indicativas de una alta clonalidad de TCR. En una realización, una puntuación alta de calificación del sujeto de prueba es predictiva de una respuesta positiva a la inmunoterapia en dicho sujeto.

50 En otra realización, el sujeto de prueba se ha tratado con inmunoterapia. En una realización, la inmunoterapia comprende la administración de un inhibidor de un regulador negativo del sistema inmunitario. En algunos aspectos, el regulador negativo se selecciona entre un grupo que consiste en CTLA-4 y PD-1. En una realización, el regulador negativo puede ser CTLA-4. En otra realización, el regulador negativo puede ser PD-1. En otras realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo anti-CTLA-4. En aún otras realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo anti-PD-1.

55 El método también incluye determinar un efecto secundario de un tratamiento de inmunoterapia para dicho sujeto de prueba indicado por una expansión clonal de al menos un clon que tiene una frecuencia de aparición que es estadísticamente significativamente diferente de una frecuencia media de aparición de un conjunto de clones restantes en una muestra obtenida después de dicho tratamiento de inmunoterapia. En una realización, el conjunto de clones restantes comprende clones que tienen cada uno una frecuencia de aparición que está en el 50% superior

de los clones totales en dicha muestra. En otra realización, el conjunto de clones restantes comprende clones que tienen cada uno una frecuencia de aparición que está en el 40% superior de los clones totales en dicha muestra. En otra realización más, el conjunto de clones restantes comprende clones que tienen cada uno una frecuencia de aparición que está en el 30% superior de los clones totales en dicha muestra. En otras realizaciones, el conjunto de clones restantes comprende clones que tienen cada uno una frecuencia de aparición que está en el 20% superior del total de clones en dicha muestra. En una realización, el conjunto de clones restantes comprende clones que tienen cada uno una frecuencia de aparición que está en el 10% superior de los clones totales en dicha muestra. En un aspecto, el al menos un clon tiene una frecuencia de aparición que es estadísticamente significativamente diferente de los clones que tienen cada uno una frecuencia de aparición que está en el cuartil superior de frecuencias de aparición en dicha muestra. En otros aspectos, la expansión clonal de dicho al menos un clon es indicativa de una respuesta deficiente de dicho sujeto de prueba a dicho tratamiento de inmunoterapia.

En ciertos aspectos, el método también incluye amplificar secuencias de ácido nucleico obtenidas de al menos una de dichas muestras que comprende células linfoides de un sujeto de prueba en un ensayo multiplexado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando (1) una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos de segmento V de AIR y (2) o bien una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento J de AIR o una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento C de AIR.

En algunas realizaciones, cada uno de la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos de segmento V de AIR es independientemente capaz de hibridarse específicamente con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de la región V de AIR de mamífero, en donde cada cebador oligonucleotídico del segmento V de AIR comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que son complementarios a al menos un segmento génico funcional que codifica AIR, en donde dicha pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento V de AIR hibrida específicamente sustancialmente con todos los segmentos génicos funcionales que codifican V de AIR que están presentes en dicha muestra. En una realización, cada uno de la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento J es independientemente capaz de hibridar específicamente con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de la región J de AIR de mamífero, en donde cada cebador del segmento J comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que es complementario a al menos un segmento génico funcional que codifica J de AIR, en donde dicha pluralidad de cebadores del segmento J hibrida específicamente sustancialmente con todos los segmentos génicos que codifican J de AIR funcionales que están presentes en la muestra. En otra realización, cada uno de la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento C es independientemente capaz de hibridar específicamente con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de la región C de AIR de mamífero, en donde cada cebador del segmento C comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que es complementaria a al menos un segmento génico que codifica C de AIR funcional, en donde la pluralidad de cebadores del segmento C hibrida específicamente sustancialmente con todos los segmentos funcionales de C de AIR o segmentos génicos que están presentes en la muestra.

En ciertos aspectos, la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos de segmento V de AIR, y (2) dicha pluralidad de cebadores oligonucleotídicos de segmento J de AIR y dicha pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento C de AIR son capaces de promover la amplificación en dicha PCR múltiple de sustancialmente todas las regiones que codifican CDR3 de AIR reordenadas en dicha muestra para producir una pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas de una población de células del sistema inmunitario adaptativo en dicha muestra, siendo dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas suficiente para cuantificar la diversidad completa de dicha región que codifica CDR3 de AIR en dicha al menos una muestra.

En algunas realizaciones, cada segmento génico que codifica V de AIR funcional comprende una secuencia señal de recombinación del gen V (RSS) y cada segmento génico que codifica J de AIR funcional comprende una RSS del gen J, en donde cada molécula amplificada de ADN reordenada comprende (i) al menos 10, 20, 30 o 40 nucleótidos contiguos de una cadena efectora de dicho segmento génico que codifica V de AIR, en donde dichos al menos 10, 20, 30 o 40 nucleótidos contiguos están situados 5' con respecto a dicha RSS del gen V y (ii) al menos 10, 20 o 30 nucleótidos contiguos de una cadena efectora de dicho segmento génico que codifica J de AIR, en donde dichos al menos 10, 20 o 30 nucleótidos contiguos están situados 3' con respecto a dicha RSS del gen J. En una realización, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 1500 nucleótidos de longitud. En otra realización, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 1000 nucleótidos de longitud. En otra realización más, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 600 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 500 nucleótidos de longitud. En un aspecto, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 400 nucleótidos de longitud. En otro aspecto, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 300 nucleótidos de longitud. En otro aspecto más, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 200 nucleótidos de longitud. En

algunas realizaciones, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 100 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, cada molécula de ADN reordenada amplificada en dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas está entre 50-600 nucleótidos de longitud.

5 En algunos aspectos, el método incluye seleccionar un conjunto de secuencias reordenadas únicas en una de dichas muestras que tienen una frecuencia de aparición que es estadísticamente significativamente mayor en comparación con otras secuencias reordenadas únicas en dicha muestra. En ciertos aspectos, la alta frecuencia de aparición está determinada por un porcentaje umbral predeterminado. En un aspecto, el número seleccionado de secuencias reordenadas únicas en dicho conjunto está determinado por un número predeterminado. En otras realizaciones, el método incluye determinar a partir de dicho conjunto si una de dichas secuencias reordenadas únicas de alta frecuencia es persistente o transitoria, en donde una secuencia reordenada única persistente está presente en dos o más muestras obtenidas de dicho sujeto de prueba en periodos de tiempo subsiguientes, y en donde una secuencia transitoria única reordenada está presente en solo una muestra obtenida en un punto temporal a partir de dicho sujeto.

10 El método también incluye determinar un curso de inmunoterapia para dicho sujeto basándose en la presencia de una o más secuencias reordenadas únicas persistentes en dichas dos o más muestras de dicho sujeto de prueba, donde la presencia de secuencias reordenadas únicas persistentes indica una mayor probabilidad de que dicho sujeto tenga un estado inmunológico saludable. En algunas realizaciones, la presencia de dichas una o más secuencias reordenadas únicas persistentes en dicho sujeto es predictiva de una respuesta positiva al tratamiento de inmunoterapia por dicho sujeto. El método de la invención incluye determinar un curso de inmunoterapia para dicho sujeto basándose en la presencia de una o más secuencias transitorias únicas reordenadas en dichas una o más muestras de dicho sujeto de prueba, en donde dicha presencia de dichas una o más secuencias transitorias únicas reordenadas indica una mayor probabilidad de que dicho sujeto tenga un estado inmunológico comprometido. En otra realización, la presencia de dichas una o más secuencias reordenadas únicas transitorias en dicho sujeto es predictiva de una respuesta deficiente al tratamiento de inmunoterapia por dicho sujeto.

20 En algunas realizaciones, el método de la invención proporciona etapas para categorizar a un sujeto de prueba que tiene una puntuación baja de calificación del sujeto de prueba en dichas una o más muestras por tener una menor probabilidad relativa de responder a la inmunoterapia en comparación con un segundo sujeto que tiene una puntuación de calificación más alta; y estratificar una población de pacientes de sujetos de prueba de acuerdo con la probabilidad relativa de responder a la inmunoterapia. El método incluye determinar la diversidad del repertorio de AIR de dicho sujeto de prueba secuenciando dichas secuencias de ácido nucleico de una de dichas muestras y determinar una puntuación de calificación del sujeto de prueba a partir de dicha diversidad de repertorio de AIR total. En una realización, el modelo matemático es un modelo de especies no observado.

30 En otra realización, la determinación de dicha puntuación de calificación del sujeto de prueba comprende calcular una puntuación de entropía de Shannon y una puntuación de clonalidad y determinar una puntuación de calificación del sujeto de prueba en base a dicha puntuación de entropía de Shannon y dicha puntuación de clonalidad. En una realización, la puntuación de clonalidad es una transformada de la puntuación de entropía de Shannon.

35 En otros aspectos de la invención, el polipéptido receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR) es un polipéptido AIR de mamífero y se selecciona entre un polipéptido receptor gamma de células T (TCRG), un polipéptido receptor beta de células T (TCRB), un polipéptido receptor alfa de células T (TCRA), un polipéptido receptor delta de células T (TCRD), un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina (IGH) y un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina (IGL). En algunas realizaciones, el polipéptido IGH se selecciona entre una IgM, un polipéptido de IgA, un polipéptido de IgG, un polipéptido de IgD y un polipéptido de IgE. El polipéptido de IGL se puede seleccionar entre un polipéptido IGL-lambda y un polipéptido IGL-kappa. En una realización, el polipéptido AIR de mamífero es un polipéptido AIR humano. En otra realización, el polipéptido AIR de mamífero se selecciona entre un polipéptido AIR de primate no humano, un polipéptido AIR de roedor, un polipéptido AIR de cánido, un polipéptido AIR de felino y un polipéptido AIR de ungulado.

45 En ciertas realizaciones, el sujeto de prueba se selecciona entre: un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una afección maligna, un sujeto que ha recibido un trasplante de células hematopoyéticas, un sujeto que ha recibido un trasplante de órgano sólido, y un sujeto que tiene una infección microbiana. En algunas realizaciones, la afección maligna se selecciona entre una neoplasia maligna hematológica, un melanoma, un sarcoma y un carcinoma. La afección maligna puede seleccionarse entre melanoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata.

50 En otras realizaciones, el trasplante de células hematopoyéticas se selecciona entre un trasplante de sangre de cordón umbilical, un trasplante de células hematopoyéticas autólogo, un trasplante de células hematopoyéticas alogénicas y un trasplante de médula ósea. En una realización, el trasplante de células hematopoyéticas comprende

un trasplante de células T autólogo.

En otros aspectos, la pluralidad de puntos temporales comprende puntos temporales durante o después de la inmunoterapia. En otro aspecto, la pluralidad de puntos temporales comprende puntos temporales antes de la

En otras realizaciones, el método incluye etapas para gestionar un tratamiento de dicho sujeto de prueba que está recibiendo inmunoterapia basándose en una determinación de dicho estado inmunológico de dicho sujeto de prueba. En una realización, la inmunoterapia comprende un tratamiento con un agente de inmunoterapia que se selecciona entre un anticuerpo inmunoterapéutico, una citocina, un trasplante de células hematopoyéticas, un agente inmunosupresor y una vacuna.

En otra realización, la inmunoterapia comprende un tratamiento con un inhibidor de un regulador negativo de una respuesta inmunitaria. En algunos aspectos, el regulador negativo de una respuesta inmunitaria se selecciona entre CTLA4/CD152, LAG3/CD223 y PD-1/CD279. En una realización, el regulador negativo de una respuesta inmunitaria puede ser CTLA-4/CD152 y dicho inhibidor de dicho regulador negativo de una respuesta inmunitaria puede ser un anticuerpo anti-CTLA-4. En otra realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona entre ipilimumab y tremelimumab. En algunas realizaciones, el regulador negativo de una respuesta inmunitaria es PD-1/CD279 y dicho inhibidor del regulador negativo de una respuesta inmunitaria es un anticuerpo anti-PD-1. En otra realización, la inmunoterapia comprende un tratamiento con un agente que se dirige a un potenciador de una respuesta inmunitaria. En otra realización más, el potenciador de una respuesta inmunitaria se selecciona entre 41BB/CD137, OX40/CD134 y CD40.

En otras realizaciones, la inmunoterapia comprende un tratamiento de una afección inflamatoria o una enfermedad autoinmune con un inhibidor de una ruta inflamatoria. En ciertas realizaciones, la afección inflamatoria o dicha enfermedad autoinmune se selecciona entre artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn y artritis idiopática juvenil. En una realización, la ruta inflamatoria comprende al menos uno de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gamma (IFN γ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8). En otras realizaciones, la ruta inflamatoria comprende TNF α y dicho inhibidor de la ruta inflamatoria es un agente que se une específicamente a TNF α . En otra realización, el agente que se une específicamente a TNF α se selecciona entre un anticuerpo anti-TNF α y un receptor de TNF α soluble artificial. En una realización, el anticuerpo anti-TNF α se selecciona entre adalimumab e infliximab y dicho receptor de TNF α soluble artificial es etanercept.

En otras realizaciones, se proporciona un método implementado por computadora para determinar un estado inmunológico de un sujeto de prueba, que comprende: almacenar datos para un sujeto de control obtenidos de una pluralidad de muestras en diversos puntos temporales, comprendiendo dichos datos para cada muestra, información de secuencia de ácido nucleico para una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas en dicha muestra, una puntuación de diversidad de secuencias de AIR para dicha muestra, una frecuencia de aparición de cada secuencia de ácido nucleico reordenada única en dicha muestra, y un estado inmunológico determinado para dicho sujeto; determinar reglas por un procesador para evaluar un estado inmunológico de un sujeto de prueba en base a dichos datos de dicho sujeto de control; introducir datos para un sujeto de prueba para una pluralidad de muestras obtenidas en diversos momentos antes y después de la inmunoterapia, comprendiendo dichos datos para cada muestra, información de la secuencia de ácido nucleico para una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas en dicha muestra, una puntuación de diversidad de secuencia de AIR para dicha muestra, y una frecuencia de aparición de cada secuencia única de ácido nucleico reordenada en dicha muestra; y recibir una determinación de un estado inmunológico de dicho sujeto de prueba. En algunas realizaciones, el método incluye determinar una respuesta pronosticada a la inmunoterapia de dicho sujeto de prueba. En una realización, los datos para dicho sujeto de control comprenden información de la secuencia de ácido nucleico obtenida de dicho sujeto de control en un punto temporal anterior al tratamiento de inmunoterapia. En otra realización, los datos para dicho sujeto de control comprenden información de la secuencia de ácido nucleico obtenida de dicho sujeto de control en un punto temporal después del tratamiento de inmunoterapia.

Estos y otros aspectos de las realizaciones de la invención descritas en la presente serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Los aspectos y realizaciones de la invención se pueden modificar, si fuera necesario, para emplear conceptos de las diferentes patentes, solicitudes y publicaciones para proporcionar otras realizaciones adicionales.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La Figura 1 ilustra los clones de TCR que permanecieron a lo largo del tiempo después del tratamiento mieloablativo. Se muestra el intervalo de valores para la proporción del repertorio de cada paciente representado por clones que se mantuvieron después del trasplante de células madre. El cuartil inferior se extendió a cero. La proporción de clones remanentes se calculó como la proporción de lecturas totales de

secuenciación de TCR correspondiente a los clones observados (a cualquier nivel) antes del trasplante. Los valores indicaron cierta persistencia de clones previos al trasplante en los repertorios de TCR de estos pacientes.

La Figura 2 muestra el número de clones de TCR transitorios observados en pacientes durante la reconstitución inmunitaria temprana, a los 28, 56, 100 y 180 días del trasplante, en comparación con los controles sanos. Para cada muestra, cada uno de los 10 clones superiores de TCR por frecuencia se clasificó como persistente (observado nuevamente en el mismo paciente en un punto posterior) o transitorio (no se volvió a observar a ningún nivel en muestras posteriores del mismo paciente). El número de clones transitorios fue muy variable entre los pacientes, variando de 0 a 9, pero la cantidad media de clones transitorios disminuyó con el tiempo. También se analizaron cuatro controles sanos, y el número de clones de TCR transitorios varió de 0 a 2 con una mediana de 0.

La Figura 3 ilustra la reconstitución del repertorio de TCR después del trasplante de células madre, que se muestra en el tamaño del repertorio de TCR en todos los pacientes después del trasplante de células madre hematopoyéticas. Las muestras se tomaron antes del trasplante y cinco veces después del trasplante (los días 28, 56, 100, 180 y 365). Se estimó el tamaño del repertorio de TCR para cada paciente utilizando la secuenciación de alto rendimiento de reordenamientos de TCR, y se muestra la media geométrica del tamaño del repertorio de TCR estimado. Después del trasplante, los pacientes tenían un repertorio de TCR muy reducido que alcanzó su mínimo 56 días después del trasplante, antes de comenzar una recuperación lenta.

La Figura 4 muestra una comparación estimada del tamaño del repertorio de TCR basada en la secuenciación de alto rendimiento de reordenamientos de TCR β para todos los pacientes con y sin mortalidad eventual sin recaída (MSR). Los valores de tamaño del repertorio de TCR se muestran como cuartiles para ambas poblaciones. La significación se evaluó utilizando una prueba U de Mann-Whitney de una cola. Los pacientes que pasaron a sufrir mortalidad sin recaída tuvieron tamaños de repertorio estimados significativamente más bajos a los 56 y 100 días después del trasplante.

La Figura 5 muestra una comparación de los recuentos de CD3+ y el tamaño del repertorio de TCR estimado. Los recuentos de CD3+ (número de células/ml) se compararon con el tamaño del repertorio de TCR estimado para las muestras de todos los pacientes supervivientes de los días 28, 56 y 100 para los que ambas mediciones estaban disponibles. Hubo una correlación débil entre los recuentos de CD3+ y el tamaño del repertorio ($r = 0,06$), lo que indica que una estimación en el límite inferior de la diversidad de TCRP obtenida a través de la secuenciación reveló información independiente de la densidad total de las células T circulantes.

La Figura 6 muestra la clonalidad del repertorio de TCR en muestras de sangre. En muestras de sangre, la baja clonalidad del repertorio de TCR fue un predictor del estado respondedor de inmunoterapia (tratamiento con ipilimumab (un mAb anti-CTLA-4)) y la alta clonalidad del repertorio de TCR fue un predictor del estado no respondedor de inmunoterapia.

La Figura 7 muestra los resultados de la secuenciación cuantitativa del ADN que codifica TCR a partir de muestras de tejido tumoral. Los resultados muestran un aumento en la clonalidad de TCR en linfocitos presentes en muestras de tejido tumoral sólido obtenidas después de la administración de inmunoterapia (tratamiento con ipilimumab (un mAb anti-CTLA-4)) en relación con el nivel de clonalidad de TCR detectado en muestras tumorales obtenidas antes de la inmunoterapia (AT).

La Figura 8 muestra la dinámica en las representaciones relativas de poblaciones clonales de TCR individuales a lo largo del tiempo en muestras de sangre y en muestras de tumores sólidos obtenidas antes de la inmunoterapia (tratamiento con ipilimumab (un mAb anti-CTLA-4)) y después de la inmunoterapia. Los puntos temporales A, B y C son puntos temporales tomados de muestras de sangre. El punto temporal A es anterior a la inmunoterapia, y los puntos temporales B y C son dos puntos temporales después de comenzar el régimen de inmunoterapia. Los puntos temporales AT, BT, CT son pares de muestras tumorales (AT es antes de la inmunoterapia, y los puntos temporales BT y CT son dos puntos temporales después de comenzar el régimen de inmunoterapia). La flecha indica un solo clon cuya preponderancia ha aumentado después de la terapia para representar 10% del repertorio en el momento CT. La abundancia significativa de dos clones (X1 y X2) que representaron 7-9% de secuencias de TCR en sangre en los puntos temporales A y B disminuyó significativamente posteriormente, mientras que varias secuencias de receptor de células T que inicialmente tenían frecuencias muy bajas en sangre aumentaron significativamente en el punto temporal C. Los tres clones más numerosos en muestras tumorales en el punto temporal A disminuyeron significativamente en su representación relativa posterior, como se determinó en los puntos temporales posteriores.

La Figura 9 muestra la diversidad de secuencia y las entropías de distribución de TCR determinadas en muestras de sangre periférica obtenidas antes (punto temporal A) y después (puntos temporales B y C) del inicio de la inmunoterapia (tratamiento con ipilimumab (un mAb anti-CTLA-4)) y muestra la dinámica de las representaciones clonales de TCR individuales a lo largo del tiempo, preterapia (punto temporal A) y postterapia (puntos temporales B y C). La flecha indica un único clon cuya preponderancia ha aumentado después de la terapia para representar más de 10% del repertorio en el punto temporal C.

La Figura 10A muestra mediciones de la clonalidad del repertorio de TCR a partir de muestras de tejido de lesiones de melanoma obtenidas de pacientes con melanoma metastásico en estadio tardío antes, durante

y después de la inmunoterapia con anticuerpo anti-PD-1. La media y la desviación típica de la clonalidad del repertorio de TCR (una métrica modificada basada en la entropía de distribución de secuencias de TCR normalizada en el intervalo (0 - 1) al explicar el número de secuencias únicas de TCR presentes en cada muestra) se muestra de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia. De los 12 pacientes estudiados, 8 respondieron al tratamiento (enfermedad estable o respuesta parcial), mientras que 4 no respondieron (progresión de la enfermedad). La clonalidad del repertorio de TCR fue mayor en los 8 pacientes que respondieron en comparación con los 4 pacientes que no respondieron ($p = 0,015$ mediante una prueba t de dos colas no pareada).

La Figura 10B muestra la media y la desviación típica de la infiltración de células T (medida como reordenamientos del receptor de células T por genoma diploide) de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia obtenida de muestras de tejido de lesiones de melanoma obtenidas de una cohorte de 12 pacientes con melanoma metastásico en estadio tardío. Medidos mediante una prueba t de dos colas no pareada, los niveles de infiltración de linfocitos T fueron más altos en los 8 pacientes que respondieron en comparación con los 4 pacientes que no respondieron ($p = 0,056$ mediante prueba t de dos colas no pareada). La inmunoterapia fue el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1.

La Figura 11A muestra las mediciones de la clonalidad del repertorio de TCR y la respuesta a la inmunoterapia para la cohorte 1 (12 pacientes), la cohorte 2 (13 pacientes) y una cohorte combinada (obtenida de muestras de tejido de lesiones de melanoma). La inmunoterapia fue el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1. La media y la desviación típica de la clonalidad del repertorio de TCR (una métrica modificada basada en la entropía de la distribución de secuencias de TCR normalizada en el intervalo (0 - 1) al explicar el número de secuencias únicas de TCR presentes en cada muestra) se muestra de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia en la cohorte 1 (cuadrado simple), cohorte 2 (cuadrado de rayas oblicuas) y en los datos combinados (cuadrado de rayas rectas). La clonalidad en la distribución de la secuencia de TCR fue mayor en los pacientes que respondieron en comparación con los pacientes que no respondieron ($p = 0,00065$ en los datos combinados mediante una prueba t de dos colas no pareada).

La Figura 11B muestra la media y la desviación típica de la infiltración de células T (medida como reordenamientos del receptor de células T por genoma diploide) de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia en la cohorte 1 (cuadrado simple), cohorte 2 (cuadrado de rayas oblicuas) y en los datos combinados (cuadrado de rayas rectas). Las células T se obtuvieron a partir de muestras de tejido de lesiones de melanoma. La inmunoterapia fue el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1. Los niveles de infiltración de linfocitos T son más altos en los pacientes que respondieron en comparación con los pacientes que no respondieron ($p = 0,0015$ en los datos combinados mediante una prueba t de dos colas no pareada).

La Figura 11C muestra una comparación de la clasificación de cada paciente (en clasificación descendente, de un total de 25 pacientes) para el nivel de infiltración de células T y la clonalidad del repertorio de TCR. Las células T se obtuvieron a partir de muestras de tejido de lesiones de melanoma. La inmunoterapia fue el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1. En comparación con los respondedores (rombo), los que no responden (círculo) tienden simultáneamente hacia una baja clonalidad del repertorio de TCR y niveles bajos de linfocitos T infiltrantes.

La Figura 12 es un diagrama de bloques de alto nivel que ilustra un ejemplo de una computadora, de acuerdo con una realización de la invención.

Descripción detallada

I. Visión general

La presente invención proporciona, en ciertas realizaciones y como se describe en la presente memoria, métodos inesperadamente ventajosos para determinar el estado inmunológico de un sujeto o de una pluralidad de sujetos, incluyendo cualitativamente (p.ej., por diversidad de secuencias de receptores de células T o de inmunoglobulinas) y cuantitativamente (p.ej., por distribución de las secuencias de TCR o IG) que caracteriza la clonalidad de la célula relacionada con la inmunidad adaptativa (p.ej., célula T o célula B), a partir de la cual se puede evaluar la inmunocompetencia del sistema inmunitario adaptativo de un individuo. Las presentes realizaciones proporcionan así nuevos métodos para evaluar la inmunocompetencia de un individuo y para estratificar una población de acuerdo con el estado del sistema inmunitario, donde la determinación de la diversidad de secuencia de TCR y/o IG expresada por células linfoides en un individuo, y el grado relativo de la clonalidad de células T y/o células B en el individuo, son relevantes para el pronóstico, el diagnóstico y el resultado, incluida la probabilidad de desarrollar efectos secundarios relacionados con el sistema inmunitario, en una variedad de contextos clínicos.

Las presentes realizaciones permiten por primera vez una evaluación de alta resolución, gran escala y alto rendimiento de la inmunocompetencia por medio de la caracterización a nivel de secuencia de ADN de (i) la diversidad de repertorios de TCR e IG, y (ii) la distribución de repertorios de TCR e IG. La invención incluye composiciones y métodos para la detección cuantitativa de secuencias de sustancialmente todos los reordenamientos de genes de TCR e IG posibles que pueden estar presentes en una muestra que contiene ADN de células linfoides.

En ciertas realizaciones, una muestra que contiene ADN de células linfoides (ADN genómico, ADNc o alternativamente, ARN mensajero) de un sujeto se utiliza como molde para la amplificación mediante PCR multiplexada utilizando un conjunto de cebadores específicamente diseñado para ser capaz de amplificar sustancialmente todos los reordenamientos de ADN posibles que codifican una cadena concreta de TCR o IG. Los productos de amplificación mediante PCR múltiple son susceptibles de secuenciación de ADN cuantitativa rápida, de alto rendimiento y alta calidad. La diversidad del repertorio de TCR o IG estructural en la muestra se determina identificando una pluralidad de secuencias de ADN reordenadas únicas a partir de la información de la secuencia de ADN, y a partir de allí determinando el número total de secuencias únicas en la muestra.

Cuando se desee, se pueden usar métodos de estimación o extrapolación conocidos para determinar a partir de la información de secuencia una diversidad de repertorio en el sistema inmunitario adaptativo completo del sujeto. Para cuantificar la distribución relativa de cada secuencia única, las metodologías de secuenciación cuantitativa descritas en la presente memoria y puestas en práctica por los expertos en la técnica también permiten la determinación de la frecuencia de aparición de cada secuencia de ADN reordenada única particular entre el número total de secuencias únicas. En ciertas realizaciones, se puede obtener una muestra de sangre como fuente de células linfoides a partir de las cuales se puede extraer ADN y/o ARN de células linfoides para proporcionar moldes de PCR.

Estos y métodos relacionados encontrarán una variedad de usos como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan para cuantificar la diversidad y distribución del repertorio de receptores relacionados con la inmunidad adaptativa (AIR) dentro del sistema inmunitario adaptativo de cada individuo. Los métodos descritos en la presente memoria también se utilizan para estratificar una población de pacientes de acuerdo con el estado de inmunocompetencia del paciente o la probabilidad relativa de que los individuos respondan a una inmunoterapia o desarrollen efectos secundarios relacionados con el sistema inmunitario. La cuantificación de la diversidad de las secuencias de AIR (p.ej., el número de diferentes secuencias únicas que codifican AIR, identificadas mediante la obtención de información de la secuencia de nucleótidos distintiva para todo el ADN reordenado que codifica un polipéptido AIR concreto en una muestra) y de la distribución de la secuencia de AIR (p.ej., la frecuencia de aparición de cada secuencia de ADN que codifica AIR reordenada única) permite ventajosamente la correlación de la clonalidad de células T o B, definida con una precisión sin precedentes, con información clínicamente útil.

A modo de teoría no limitante, esta distribución de la secuencia puede representar el grado de clonalidad de células T o células B en cada muestra de un paciente (p.ej., grado cuantitativo de representación o abundancia relativa). Cualquiera de una serie de herramientas computacionales conocidas para procesar este parámetro de distribución puede usarse para generar valores de distribución (p.ej., la frecuencia de aparición de cada secuencia única) y los valores de diversidad (p.ej., el número total de diferentes secuencias únicas). Los valores de distribución y diversidad se pueden usar en una etapa de calificación para calificar muestras individuales y compararlas con una muestra de control y/o entre sí.

Como se describe en la presente memoria, en pacientes que reciben un trasplante de sangre del cordón umbilical para tratar tumores malignos hematológicos, un grado relativamente bajo de diversidad del repertorio de TCR en pacientes tras el trasplante de sangre del cordón umbilical es un predictor de la probabilidad relativa de susceptibilidad a la infección y de la incapacidad inmunológica para aclarar la infección (p.ej., respuesta deficiente). Por otro lado, un grado relativamente alto de diversidad del repertorio de TCR en pacientes humanos después del trasplante de sangre del cordón umbilical para tratar tumores malignos hematológicos demostró ser un predictor de la probabilidad relativa de resistencia a la infección y de inmunocompetencia, es decir, capacidad inmunológica para despejar la infección.

En muestras de sangre obtenidas de pacientes antes y después de la inmunoterapia con un inhibidor de un regulador negativo de la respuesta inmunitaria (p.ej., anticuerpo anti-CTLA4), una alta diversidad de secuencia de TCR y baja clonalidad en la sangre del paciente se correlaciona con resultados clínicos positivos. Por otro lado, un repertorio de TCR que se caracterizó por una baja diversidad de secuencias de TCR (alta clonalidad) y una menor entropía de la distribución de secuencias de TCR se asoció con resultados clínicos más pobres atribuibles a la capacidad inmunitaria adaptativa comprometida.

En muestras de tumores sólidos obtenidas de pacientes antes y después de la inmunoterapia con un inhibidor de un regulador negativo de la respuesta inmunitaria (p.ej., anticuerpo anti-PD-1), un alto nivel de presencia de células T infiltrantes y alta clonalidad (es decir, evidencia de migración de células T al tumor y proliferación clonal dentro del tumor) se asociaron con una respuesta positiva a la inmunoterapia. Por el contrario, un repertorio mínimo de células T infiltrantes y baja clonalidad en tumores sólidos (es decir, evidencia de una respuesta de células T restringida y no específica dentro del tumor) se asociaron con la falta de respuesta al tratamiento.

Las realizaciones descritas ahora encontrarán una amplia gama de usos al perfilar la inmunocompetencia de un sujeto en un punto dado en el tiempo, por ejemplo, como un pronóstico o diagnóstico o para informar de una estrategia terapéutica, y para otros fines.

II. Definiciones

Los términos utilizados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR) se refiere a un receptor de células inmunitarias, tal como un receptor de células T (TCR) o un receptor de inmunoglobulina (Ig) encontrado en células de mamíferos.

10 El término "cebador", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. Tales condiciones incluyen aquellas en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente de extensión (p.ej., una ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada.

15 El término porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (p.ej., BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para expertos en la técnica) o mediante inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de "identidad" puede existir en una región de la secuencia que se compara, p.ej., sobre un dominio funcional, o, alternativamente, existe a lo largo de toda la longitud de las dos secuencias que se van a comparar.

20 Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia para comparar secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

30 La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, p.ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de soporte lógico Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (*ver Ausubel et al.*, más abajo).

35 Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que describen en Altschul et al., en *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) El soporte lógico para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov).

40 El término "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, p.ej., una cantidad suficiente para modular la respuesta inmunitaria en una célula.

45 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una "cantidad profilácticamente eficaz" ya que la profilaxis puede considerarse terapia.

50 A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, biología molecular, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descrita en la presente memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se pueden utilizar técnicas convencionales para tecnología recombinante, biología molecular, microbiología, síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

55 A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones, tales como, "comprende" y "que comprende" deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como "incluyendo, pero sin limitarse a". Por "que consiste en" se entiende que incluye, y típicamente se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son obligatorios o preceptivos, pero que no se requieren otros elementos y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o

no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Según se utiliza en la presente memoria, en realizaciones particulares, los términos "aproximadamente" o "aproximadamente" cuando preceden a un valor numérico indican el valor más o menos un intervalo de 5%, 6%, 7%, 8% o 9%, *etc.* En otras realizaciones, los términos "aproximadamente" o "aproximadamente" cuando preceden a un valor numérico indican el valor más o menos un intervalo de 10%, 11%, 12%, 13% o 14%, *etc.* En otras realizaciones más, los términos "aproximadamente" o "aproximadamente" cuando preceden a un valor numérico indican el valor más o menos un intervalo de 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20%, *etc.*

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "una realización" o "un aspecto" significa que un rasgo, estructura o característica particulares descritas en conexión con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. De este modo, la apariencia de la frase "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no necesariamente se refiere a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

III. Métodos de cuantificación

Se pueden usar varios métodos para cuantificar y evaluar la inmunocompetencia del sujeto. En algunas realizaciones, la inmunocompetencia se evalúa midiendo la diversidad de secuencia del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR) y la distribución de la secuencia de AIR del sujeto.

A. Diversidad de secuencias del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR)

La diversidad de secuencias de ADN que codifican TCR o IG reordenadas únicas en células linfoides en una muestra refleja el número de clones diferentes de células T o B en una muestra de un sujeto. La diversidad de la secuencia se puede determinar como el número de clones en una muestra de un tamaño concreto, tal como por ejemplo mediante recuento directo o recuento ponderado en una muestra. Una muestra puede ser una muestra de sangre o una muestra de tejido (muestra de tumor sólido), por ejemplo. Alternativamente, el número de clones diferentes en un sujeto se puede estimar en función del número de clones en una submuestra. En otra realización, se puede asignar un valor de corte arbitrario para estimar el número de diferentes clones "eficaces", tales como contar hacia la diversidad solo aquellos clones que representan más del 0,01% de todas las células T o todas las células B en la muestra. Se contemplan otros modelos para determinaciones de diversidad ponderadas o extrapoladas para su uso en ciertas realizaciones relacionadas, tales como modelos de entropía, el "modelo de especies no observadas" (véanse, *por ejemplo*, Efron et al., 1976 *Biometrika* 63:435; Fisher et al., 1943 *J. Anim. Ecol.* 12:42) u otros modelos adecuados, como sabrán quienes estén familiarizados con la técnica.

En algunas realizaciones, la diversidad de AIR se puede medir mediante secuenciación cuantitativa de las secuencias totales observadas de AIR en una muestra concreta. Por ejemplo, Robins et al., 2009 *Blood* 114, 4099; Robins et al., 2010 *Sci. Translat. Med.* 2: 47ra64; Robins et al., 2011 *J. Immunol. Meth.* doi:10.1016/j.jim.2011.09.001; Sherwood et al. 2011 *Sci. Translat. Med.* 3:90ra61; el documento U.S.A.N. 13/217.126, el documento U.S.A.N. 12/794.507, el documento WO/2010/151416, el documento WO/2011/106738 (PCT/US2011/026373), el documento WO2012/027503 (PCT/US2011/049012), el documento U.S.A.N. 61/550.311 y el documento U.S.A.N. 61/569.118 describen composiciones y métodos para la secuenciación cuantitativa de secuencias genéticas adaptadas del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa y para la determinación del clonotipo del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa. También se pueden encontrar detalles sobre secuencias de cebadores oligonucleotídicos de amplificación mediante PCR y cebadores de secuenciación, secuenciación de productos de amplificación mediante PCR, datos de secuenciación de procesamiento y usos de mediciones de diversidad de receptores de la inmunidad adaptativa, todos los cuales pueden emplearse para su uso de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un programa de secuenciación tal como Raw HiSeq™ para preprocesar datos de secuencia para eliminar errores en la secuencia primaria de cada lectura, y para comprimir los datos de secuencia. Se puede utilizar un algoritmo del vecino más próximo para integrar los datos en secuencias únicas fusionando secuencias estrechamente relacionadas, para eliminar los errores de PCR y de secuenciación.

La secuenciación cuantitativa de TCR o IG tal como se describe en la presente memoria permite la asignación de una puntuación o calificación de diversidad a una muestra. En algunas realizaciones, se puede determinar que la puntuación o calificación de diversidad es baja cuando hay un pequeño número de secuencias de AIR reordenadas únicas en el repertorio en comparación con el número total de secuencias de AIR reordenadas observadas en una muestra. La puntuación o calificación de diversidad puede ser mayor cuando hay un gran número de secuencias de AIR reordenadas únicas en el repertorio en comparación con el número total de secuencias de AIR reordenadas

observadas en una muestra. La determinación de una puntuación o calificación de diversidad baja o alta puede basarse en umbrales predeterminados o cálculos de significación estadística, como puede determinar un experto en la técnica. Por ejemplo, un umbral predeterminado para clasificar una puntuación o calificación de diversidad como "baja" puede ser, en algunas realizaciones, una puntuación que no sea más alta (con significación estadística) que la obtenida a partir de muestras de sangre de una población sujeto, en donde la población puede ser una población que se determina que experimenta un mal resultado en respuesta a una intervención inmunoterapéutica. En otras realizaciones, el umbral predeterminado se determina basándose en el cálculo del 50%, 25%, 10% o 5% superior o más alto de la diversidad o puntuaciones de calificación determinadas a partir de las secuencias de AIR reordenadas de la muestra.

Como escala relativa, el sistema de calificación puede variarse o ajustarse teniendo en cuenta una serie de factores, que incluyen, entre otros, el tamaño de la muestra, el método de cuantificación de la diversidad (p.ej., ya sea por secuenciación directa, o por extrapolación, "especies ocultas" etc.), signos y síntomas clínicos de la población de pacientes a partir de los cuales se obtienen las muestras, etc. Por ejemplo, en ciertos ejemplos no limitantes, los miembros de una población de pacientes se pueden categorizar según la diversidad relativa y/o los índices de distribución, y en ciertas realizaciones, se puede poner en práctica la segmentación arbitraria de la población. En ciertas realizaciones, la población de pacientes se puede estratificar de acuerdo con (i) el grado de diversidad de secuencia o distribución por cuartil, quintil, decil, etc., o (ii) clasificando la diversidad de secuencia de AIR relativa y la entropía de distribución en 50, 40, 30, 20 o 10 por ciento del número total de secuencias como una correlación de clonalidad, o (iii) seleccionando las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 secuencias de AIR únicas más abundantes en cada una de una sucesión de puntos temporales. La categorización proporciona un conjunto de parámetros mediante los cuales se puede evaluar la inmunocompetencia.

Como también se indicó anteriormente, utilizando estos cálculos de diversidad de secuencias, se determinó que en muestras de sangre obtenidas de pacientes sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas, las puntuaciones de diversidad de secuencias de AIR superiores se correlacionaban con mayores probabilidades de resultados clínicos favorables, tal como la capacidad de eliminar infecciones. En muestras de tumores sólidos obtenidos de pacientes sometidos a inmunoterapia con anticuerpo anti-PD-1, los altos niveles de infiltración de células T y una diversidad baja del repertorio de células T infiltrantes se asociaron con una respuesta positiva a la inmunoterapia.

Se pueden utilizar otros métodos conocidos para calcular la diversidad de la secuencia de AIR como conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, los siguientes trabajos resumen la teoría actual y la práctica de estimación de los índices de diversidad a partir de los datos de abundancia de especies, al tiempo que brindan ejemplos detallados de varias realizaciones comunes de la medición del índice de diversidad. Véase Anne E. Magurran y Brian J. McGill. 2011. *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment*. Nueva York: Oxford University Press. Se pueden encontrar otros ejemplos de métodos para la estimación de la diversidad genética que se pueden aplicar para calcular una calificación de puntuación de diversidad en *An Introduction to Population Genetics Theory*. Blackburn Press de James F. Crow y Motoo Kimura. 2009.

B. Distribución de secuencias del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR)

En algunas realizaciones, la distribución de la secuencia de AIR se puede utilizar para determinar y evaluar el estado inmunológico de un sujeto (p.ej., inmunocompetencia). La distribución de la secuencia de AIR, tal como la distribución de la secuencia de TCR o IG, se refiere a la variación entre el número de diferentes clones de células T o células B en una muestra, p.ej., la cantidad de células que expresan un TCR o IG idénticos. Por ejemplo, la distribución de la secuencia de AIR puede determinarse cuantificando la frecuencia de aparición de cada secuencia de ADN que codifica AIR reordenada única, como un porcentaje del número total de secuencias de ADN que codifican AIR reordenadas observadas. La distribución cuantificada de las secuencias de AIR se puede usar, opcionalmente junto con la diversidad de la secuencia de AIR, para puntuar o clasificar la inmunocompetencia de un sujeto, de acuerdo con ciertas realizaciones actualmente contempladas para determinar el estado inmunológico.

En algunas realizaciones, una distribución de la secuencia de AIR puede determinarse mediante, pero sin limitarse a, los siguientes métodos: (i) identificar y cuantificar al menos 1-20 de las secuencias de AIR reordenadas únicas (clonales) más abundantes en un sujeto durante un intervalo de tiempo, o (ii) identificando y cuantificando el número de secuencias de AIR únicas (reordenadas) (clonales) que se necesitan para representar un porcentaje dado (p.ej., hasta 10, 20, 30, 40 o 50%) del número total de secuencias reordenadas observadas en una muestra de un sujeto. Se pueden emplear adicionalmente o alternativamente otros cálculos para determinar la distribución de la secuencia de AIR de una muestra de un sujeto y asignar un valor de distribución de secuencia a una muestra concreta para fines de puntuar la muestra en comparación con un control u otra muestra con un estado inmunológico conocido. Estos pueden incluir, por ejemplo, determinar la entropía (es decir, entropía de Shannon como se define típicamente en la teoría de la información, que puede normalizarse en el intervalo [0 - 1] dividiendo por el logaritmo del número de elementos en el conjunto de muestras) o utilizando otros métodos conocidos para determinar uno o más modos de distribución (p.ej., media, asimetría, curtosis, etc.). Los presentes métodos permiten la determinación de la

distribución de la secuencia y la clonalidad con un grado de precisión que no era posible previamente y permiten una variedad de capacidades de pronóstico, de diagnóstico, prescriptivas y de otro tipo.

C. Determinación del estado inmunológico

5 De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona un método para determinar el estado inmunológico de un sujeto de prueba. En algunas realizaciones, el método incluye etapas para identificar, cuantificar, calificar, comparar y categorizar el estado inmunológico del sujeto de prueba.

10 En algunas realizaciones, la identificación de la información de la secuencia de ADN para cada una de una pluralidad de secuencias de ADN reordenadas únicas que codifican un polipéptido receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR) en una o más muestras que contienen ADN de células linfoides obtenidas de un sujeto de prueba en cada uno de uno o una pluralidad de los puntos temporales, y la determinación de un número total de secuencias de ADN que codifican polipéptidos de AIR reordenados únicos en el sujeto de prueba en cada uno de uno o una pluralidad de puntos temporales para cuantificar la diversidad de la secuencia de AIR en el sujeto se pueden realizar como se ha descrito anteriormente y como describen Robins et al., 2009 Blood 114, 4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64; Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09. 001; Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61; el documento U.S.A.N. 13/217.126, el documento U.S.A.N. 12/794.507, el documento WO/2010/151416, el documento WO/2011/106738 (PCT/US2011/026373), el documento WO2012/027503(PCT/US2011/049012), el documento U.S.A.N. 61/550.311 y el documento U.S.A.N. 61/569.118. Estas referencias proporcionan descripción con respecto a secuencias de cebadores oligonucleotídicos de amplificación por PCR y cebadores de secuenciación, secuenciación de productos de amplificación de PCR, datos de secuenciación de procesamiento y usos de mediciones de diversidad de receptores de la inmunidad adaptativa.

25 Después de determinar el número total de secuencias de ADN que codifican polipéptidos de AIR reordenados únicos en el sujeto de prueba en cada uno de dichos uno o una pluralidad de puntos temporales, la frecuencia de aparición de cada secuencia de ADN reordenada única puede cuantificarse como un porcentaje del número total observado de secuencias de ADN que codifican polipéptido AIR reordenado. Por ejemplo, si un valor de diversidad de secuencia de AIR se determina a partir de un recuento de datos de secuencia reales, ese valor puede usarse para determinar la distribución de la secuencia de AIR. En otro ejemplo, si se estiman los datos de diversidad de la secuencia de AIR, por ejemplo, mediante extrapolación de una submuestra al sistema inmunitario adaptativo completo del sujeto, o utilizando el "modelo de especies no observadas" o mediante cualquier otro método de estimación, se puede emplear cualquiera de los métodos ampliamente conocidos para las propiedades de captura de una distribución.

35 1. Calificación del estado inmunológico de una muestra de un sujeto

Los valores de diversidad de secuencias de AIR y distribución de secuencias de AIR para cada muestra se pueden utilizar para evaluar el estado inmunológico de las muestras. Puede emplearse cualquiera de una amplia variedad de sistemas de calificación simples, ponderados y/o sofisticados, ya que pueden depender de la diversidad y los métodos de estimación de la distribución que se utilicen. Preferiblemente y en ciertas realizaciones no limitantes, se asigna una calificación baja a la muestra de un sujeto de prueba en la que un pequeño número de secuencias reordenadas únicas en referencia a un umbral predeterminado tiene una frecuencia combinada de aparición de no más del 50 por ciento del número total de secuencias reordenadas observadas. Se asigna una calificación del sujeto de prueba más alta a una muestra en la que un número mayor de secuencias reordenadas únicas en referencia a un umbral predeterminado tiene una frecuencia combinada de aparición de no más de 50 por ciento del número total de secuencias reordenadas observadas. En otras palabras, la calificación es menor cuando un número menor de clones diferentes representa 50 por ciento del número total de secuencias reordenadas observadas, como sería el caso en el que están presentes uno o unos pocos clones dominantes u oligocolonialidad. En realizaciones similares pero relacionadas, se asigna una calificación del sujeto de prueba inferior a una muestra en la que un número menor de secuencias reordenadas únicas tiene una frecuencia combinada de aparición de no más de 40, 30, 20 o 10 por ciento del número total de secuencias reordenadas observadas, y se asigna una calificación del sujeto de prueba más alta a una muestra en la que un mayor número de secuencias reordenadas únicas tienen, respectivamente, una frecuencia combinada de aparición de no más de 40, 30, 20 o 10 por ciento del número total de secuencias reordenadas observadas en la muestra.

En algunas realizaciones, las calificaciones asignadas se pueden comparar a continuación con las calificaciones de sujetos de control generadas a partir de muestras de ADN de células linfoides de control obtenidas a partir de un segundo sujeto con un estado inmunológico conocido. En ciertas realizaciones, el segundo sujeto tiene un estado inmunológico conocido, comprometido, como define un experto en la técnica. En otras realizaciones, el segundo sujeto puede ser un individuo de control sano con un estado inmunológico conocido no comprometido de acuerdo con los criterios establecidos en la técnica (p.ej., Rich et al., Clinical Immunology: Principles and Practice, 3ª edición, Mosby, St. Louis). En algunas realizaciones, el sujeto de prueba puede categorizarse por tener un estado inmunológico comprometido en cada uno de dichos puntos temporales en el que la calificación del sujeto de prueba

es menor, de manera estadísticamente significativa, que la calificación del sujeto de control, de manera que el estado inmunológico del sujeto de prueba se determina de ese modo. Tal como se menciona en la presente memoria, un "sujeto de control" puede referirse a una población de sujetos de control que comparten cada uno un fenotipo clínico relevante.

5 Por ejemplo, y en ciertas realizaciones preferidas, un sujeto de prueba puede categorizarse por tener un estado inmunológico comprometido y/o un estado inmunitario no saludable cuando una puntuación de diversidad de secuencia de TCR o IG para una muestra del sujeto de prueba está, con significación estadística, dos desviaciones típicas por debajo de la de una muestra de un sujeto de control, en donde se sabe que dicho sujeto de control tiene
10 un estado inmunológico no comprometido o un estado inmunitario saludable. De manera similar, en ciertas realizaciones preferidas se puede considerar que un sujeto de prueba tiene un estado inmunológico comprometido y/o un estado inmunitario no saludable cuando una puntuación de distribución de la secuencia de TCR o IG (entropía) para una muestra del sujeto de prueba está, con significación estadística, dos desviaciones típicas por
15 debajo de la de una muestra de un sujeto de control, en donde se sabe que dicho sujeto de control tiene un estado inmunológico no comprometido o un estado inmunitario saludable. La categorización del estado puede entonces informar sobre el diagnóstico, el pronóstico y/o las estrategias de tratamiento.

Por ejemplo y a modo de ejemplo no limitante, se puede detectar la disminución relacionada con la edad en las capacidades del sistema inmunitario adaptativo de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, de
20 forma que los pacientes de edad avanzada se pueden perfilar inmunológicamente para predecir si es probable o no que respondan inmunológicamente a una vacuna. Como otro ejemplo no limitante, los receptores de trasplante de células hematopoyéticas pueden analizarse periódicamente después del trasplante para determinar si las células trasplantadas han reconstituido o no la inmunidad adaptativa, de forma que las terapias antiinfecciosas profilácticas (p.ej., antibióticos, antivirales, etc.) y/o inmunosupresoras (p.ej., para tratar la enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA)) se puedan ajustar en función del estado del sistema inmunitario adaptativo de cada paciente en lugar de en
25 función de un régimen fijo. Como otro ejemplo no limitante, el repertorio inmunitario y la inmunocompetencia de receptores de trasplante de órganos sólidos (p.ej., un receptor de todo o parte de un hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, corazón o piel trasplantados) puede analizarse periódicamente para determinar si el sistema inmunitario adaptativo del anfitrión puede verse involucrado en el rechazo del injerto y en qué medida. A partir de
30 dichos resultados de prueba, el médico puede ajustar las terapias inmunosupresoras según sea necesario, por ejemplo, para paliar el rechazo o para reducir o evitar los efectos secundarios potencialmente nocivos de la terapia inmunosupresora excesiva.

En otro ejemplo no limitante, la inmunocompetencia se puede evaluar como se describe en la presente memoria en
35 receptores de inmunoterapia candidatos tales como pacientes de oncología, con el fin de predecir qué pacientes es probable que respondan positivamente a la inmunoterapia y cuales es poco probable que lo hagan.

Como también se observa en otra parte de la presente memoria, utilizando los métodos descritos actualmente, se ha
40 determinado que las muestras de tejido tumoral obtenidas de pacientes en los que el repertorio de TCR (TCRB) exhibía una diversidad de secuencia de TCR relativamente alta y una alta clonalidad de la distribución de secuencias de TCR (es decir, evidencia de la migración de células T al tumor y proliferación clonal dentro del tumor) fueron más propensas a beneficiarse de la inmunoterapia diseñada para inhibir los reguladores negativos de los mecanismos relacionados con la inmunidad adaptativa (p.ej., anticuerpos anti-PD-1). Dichos pacientes respondieron de manera
45 beneficiosa a la inmunoterapia y tuvieron mejores resultados clínicos que fueron atribuibles a la respuesta inmunitaria robusta dentro del tejido tumoral como se detectó por los métodos presentes (Figura 10, Figura 11). Por lo tanto, en el estudio PD-1, se determinó que los respondedores tienen muchas más células T infiltrantes que los que no responden. (es decir, hay más células T infiltrantes totales presentes), pero esas células T se distribuyen de manera bastante desigual (es decir, alta clonalidad).

50 En un estudio diferente, se observó adicionalmente que en un subconjunto de sujetos no respondedores, hubo una disminución en la diversidad de secuencia de TCRB y en la entropía de distribución de secuencia poco después de administrar por primera vez la inmunoterapia (con anticuerpo anti-CTLA-4), indicando respuestas diferenciales a la inmunoterapia que pueden medirse con los métodos actuales (Figura 8, Figura 9).

55 2. Amplificación y cebadores

De acuerdo con estas realizaciones y realizaciones relacionadas de los métodos descritos en la presente memoria, el método incluye amplificar ADN extraído o generado a partir de la muestra en una PCR multiplexada utilizando (1)
60 una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento V de AIR y (2) una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento J de AIR o una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento C de AIR. Estos cebadores también los describen en detalle Robins et al., 2009 Blood 114, 4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64; Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001; Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61; documento U.S.A.N. 13/217.126, documento U.S.A.N. 12/794.507, documento WO/2010/151416, documento WO/2011/106738 (PCT/US2011/026373), documento WO2012/027503

(PCT/US2011/049012), documento U.S.A.N. 61/550.311 y documento U.S.A.N. 61/569.118. Cada uno de la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento V puede independientemente hibridar específicamente con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de la región V de AIR de mamífero, en donde cada cebador del segmento V comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que es complementaria a al menos un segmento génico que codifica AIR funcional y en donde la pluralidad de cebadores del segmento V hibridan específicamente sustancialmente con todos los segmentos génicos funcionales que codifican V de AIR que están presentes en la muestra. Cada uno de la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento J independientemente es capaz de hibridar específicamente con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de la región J de AIR de mamífero, en donde cada cebador del segmento J comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que es complementaria a al menos un segmento génico que codifica J de AIR funcional y en donde la pluralidad de cebadores del segmento J hibridan específicamente sustancialmente con todos los segmentos funcionales o segmentos génicos J de AIR que están presentes en la muestra. Además, cada uno de la pluralidad de cebadores oligonucleotídicos del segmento C es capaz independientemente de hibridar específicamente con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de la región C de mamífero, en donde cada cebador del segmento C comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos contiguos que es complementaria a al menos un segmento de gen codificante de C de AIR funcional y en donde la pluralidad de cebadores del segmento C hibrida específicamente sustancialmente con todos los segmentos que codifican C de AIR o génicos funcionales que están presentes en la muestra. En algunas realizaciones, los cebadores de los segmentos V y J o C son capaces de promover la amplificación en dicha reacción de cadena de polimerasa múltiple (PCR) de sustancialmente todas las regiones que codifican CDR3 de AIR reordenadas en la muestra para producir dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenado amplificado a partir de una población de células del sistema inmunitario adaptativo en la muestra, siendo dicha pluralidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas suficiente para cuantificar la diversidad de la región que codifica CDR3 de AIR en la población de células T. Alternativamente, el método puede implicar simplemente el análisis de secuencia de los datos de secuencia de ADN amplificados antes mencionados suficientes para caracterizar la muestra con respecto al número absoluto y/o relativo de clones distintos presentes en la muestra. Según se utiliza en la presente memoria, un segmento génico que codifica AIR funcional se refiere a un segmento génico que codifica TCR o IG que ha experimentado un reordenamiento en el ADN de una célula linfoide y que se expresa productivamente, por ejemplo, de manera que en realizaciones preferidas no se incluyen los reordenamientos que implican pseudogenes, ni son reordenamientos que dan como resultado un polipéptido AIR fuera de marco o terminado prematuramente.

Los métodos de amplificación, secuenciación y los cebadores se comentan con más detalle en la presente memoria.

3. Estratificación de poblaciones de pacientes

De acuerdo con ciertas realizaciones relacionadas descritas en la presente memoria, se proporciona un método para estratificar una población de pacientes de acuerdo con la probabilidad relativa de responder a la inmunoterapia, que comprende las siguientes etapas:

- (a) identificar, en al menos una muestra (p.ej., una muestra de tumor sólido) que contiene ácido nucleico de células linfoides de cada uno de una pluralidad de pacientes que son receptores de inmunoterapia candidatos, información de secuencia nucleica para cada una de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas que codifican un polipéptido receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR), y de ahí determinar un número total de secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido AIR reordenado único en cada paciente para cuantificar la diversidad de la secuencia de AIR en el sujeto;
- (b) cuantificar, en cada uno de la pluralidad de pacientes, la frecuencia de aparición de cada secuencia nucleica reordenada única identificada en (a) como un porcentaje del número total de secuencias nucleicas que codifican el polipéptido AIR reordenado para determinar la distribución de la secuencia de AIR en el sujeto;
- (c) calificar cada uno de la pluralidad de pacientes de acuerdo con el número total de secuencias reordenadas únicas en el paciente de (a) y de acuerdo con la frecuencia de aparición de cada secuencia reordenada única en el paciente de (b), proporcionando calificaciones de clonalidad inferiores a pacientes en quienes la entropía de Shannon (calculada a partir de la distribución de la frecuencia de cada AIR reordenado único y normalizada al intervalo [0-1] dividiendo por el logaritmo del número de AIR reordenados únicos) es alta (es decir, indicando un repertorio AIR con poca expansión clonal específica) y otorgando calificaciones de clonalidad más altas a pacientes en los que la entropía de Shannon (calculada a partir de la distribución de la frecuencia de cada AIR reordenado único y normalizada al intervalo [0-1] dividiendo por el logaritmo del número de AIR reordenados únicos) es baja (es decir, indicando un repertorio de AIR con amplia expansión clonal específica); y
- (d) categorizar a un paciente que tiene una clasificación de clonalidad más baja (medida a partir de una muestra de tumor sólido) que tiene una menor probabilidad relativa de responder a la inmunoterapia que un paciente con una clasificación de clonalidad más alta y estratificar la población de pacientes de acuerdo con la probabilidad relativa de responder a la inmunoterapia. En algunas realizaciones, la al menos una muestra

es una muestra de tumor sólido.

Al poner en práctica estas etapas del método se emplean composiciones y metodologías similares a las descritas en otra parte de la presente memoria.

5

4. Determinación del estado inmunológico para gestionar el tratamiento

De acuerdo con ciertas otras realizaciones relacionadas, se proporciona un método para determinar el estado inmunológico para gestionar el tratamiento de un sujeto de prueba sometido a inmunoterapia, que comprende los siguientes pasos:

10

(a) identificar, en una o más muestras que contienen ADN de células linfoides obtenidas de un sujeto de prueba en cada uno de uno o una pluralidad de puntos temporales antes de la inmunoterapia y en cada uno de uno o una pluralidad de puntos temporales durante o después de la inmunoterapia, información de la secuencia de ácido nucleico para cada una de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas que codifican un polipéptido receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR), y a partir de ellas determinar un número total de secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido AIR reordenado único en el sujeto de prueba en cada uno de dichos uno o una pluralidad de puntos temporales para cuantificar la diversidad de la secuencia de AIR en el sujeto;

15

(b) cuantificar, en cada una de las una o más muestras, la frecuencia de aparición de cada secuencia de ácido nucleico reordenada única identificada en (a) como un porcentaje del número total de secuencias de ácido nucleico que codifican el único polipéptido AIR reordenado en el sujeto de prueba en cada uno de dichos uno o una pluralidad de puntos temporales para determinar la distribución de la secuencia de AIR en el sujeto en cada uno de dichos uno o una pluralidad de puntos temporales;

20

(c) calificar cada una de las una o más muestras de acuerdo con el número total de secuencias reordenadas únicas determinadas en (a) y de acuerdo con la frecuencia de aparición de cada secuencia reordenada única cuantificada en (b), y utilizar la distribución de frecuencias de AIR para extrapolar el número de secuencias de AIR únicas totales en el sujeto en cada uno de dichos uno o una pluralidad de puntos temporales, para obtener un perfil de diversidad de secuencia de AIR a lo largo del tiempo en el sujeto de prueba, y (d) asignar un curso alterado de inmunoterapia al sujeto basado en la diversidad de secuencia de AIR total extrapolada, en donde la diversidad alta de la secuencia de AIR extrapolada indica una mayor probabilidad de que el sujeto tenga un estado inmunológico saludable y pueda eliminar infecciones con éxito y la diversidad de secuencias de AIR extrapoladas bajas indica una mayor probabilidad de que el sujeto tenga un estado inmunológico no saludable y no podrá eliminar infecciones con éxito.

25

30

35

Al poner en práctica estas etapas del método se emplean composiciones y metodologías similares a las descritas en otra parte de la presente memoria.

40 IV. Inmunoterapia e inmunocompetencia

La inmunocompetencia se puede entender útilmente para incluir la capacidad o el potencial del sistema inmunitario adaptativo de un individuo para armar una respuesta inmunitaria eficaz, tal como una respuesta inmunitaria que se dirige a un tumor concreto o a un patógeno (p.ej., una bacteria, virus, hongo u otro agente microbiano infeccioso o causante de enfermedades) de manera que el tumor o patógeno se erradica o neutraliza. De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente descripción, se describen métodos para evaluar la inmunocompetencia, cuyos métodos pueden ser predictivos de la probabilidad de que un individuo responda de una manera clínicamente beneficiosa a la inmunoterapia.

45

Por lo tanto y como también se describe en otra parte de la presente memoria, un sistema inmunitario adaptativo inmunocompetente, tal como el de un individuo normal, o población de individuos, clínicamente sano que se sabe por criterios clínicos que está libre de cualquier riesgo o presencia de enfermedad o trastorno inmunológico, será caracterizado por un grado relativamente alto de diversidad de la secuencia de AIR y alta entropía de la distribución de la secuencia de AIR en muestras obtenidas de la sangre del sujeto. Por el contrario, en la presente memoria se muestra un sistema inmunitario adaptativo inmunocompetente (p.ej., la capacidad relativamente escasa de un sistema inmunitario adaptativo para armar una respuesta inmunitaria) que se caracteriza por una diversidad de secuencias de AIR relativamente baja y una baja entropía de la distribución de la secuencia de AIR en muestras obtenidas de la sangre del sujeto. La diversidad de secuencias de AIR y la entropía de la distribución de secuencias de AIR se muestran dinámicas a lo largo del tiempo y pueden tender a disminuir con el tiempo correlacionándose con el aumento de la edad, el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad, la disminución de la probabilidad de responder sólidamente a vacunas u otras inmunoterapias, y/u otros criterios clínicamente relevantes.

50

55

60

En algunas realizaciones, en muestras de tumores sólidos obtenidas de pacientes antes y después de la inmunoterapia con un inhibidor de un regulador negativo de la respuesta inmunitaria, un alto nivel de células T

infiltrantes y una alta clonalidad se asociaron con una respuesta positiva a la inmunoterapia. Por el contrario, un bajo nivel de células T infiltrantes y baja clonalidad en tumores sólidos se asociaron con la falta de respuesta al tratamiento.

5 La inmunoterapia puede incluir cualquiera de una variedad de intervenciones mediante las cuales se alteran los niveles de actividad de una o más células del sistema inmunitario adaptativo (p.ej., se regulan al alza o a la baja de una manera estadísticamente significativa). Por ejemplo, la intervención puede inducir, reclutar, aumentar o potenciar de otro modo una respuesta inmunitaria adaptativa, que en realizaciones preferidas será una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede comprender la administración de uno o más anticuerpos específicos que reconocen células del sistema inmunitario adaptativo para alterar la actividad inmunológica de tales células. Otros enfoques inmunoterapéuticos incluyen el uso de citocinas que de manera similar pueden alterar directa o indirectamente la actividad de los inmunocitos; vacunas que provocan respuestas inmunitarias adaptativas tales como respuestas específicas de antígeno a antígenos asociados a tumores; trasplantes de células hematopoyéticas que incluyen trasplantes de médula ósea, trasplantes de sangre del cordón umbilical y trasplantes de células hematopoyéticas autólogas, incluyendo trasplantes de células T autólogas (p.ej., Blume y Thomas, 2000 *Biol. Blood Marrow Transpl.* 6(1):1-12); inhibidores de reguladores negativos de respuestas inmunitarias adaptativas tales como inhibidores de CTLA4/CD152 (p.ej., ipilimumab, tremelimumab; Callahan et al., 2010 *Sem. Oncol.* 37:473), inhibidores de LAG3/CD223 (Huard et al., 1996 *Eur. J. Immunol.* 26:1180; Baixeras et al., 192 *J. Exp. Med.* 176:327; Hannier et al., 1998 *J. Immunol.* 161:4058; Huard et al., 1994 *Eur. J. Immunol.* 24:3216); y otros agentes inmunoterapéuticos que incluyen en algunos casos agentes inmunosupresores (p.ej., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, (12ª edición, Brunton et al., Eds., McGraw Hill, NY, 2011, páginas 909-1099; 1891-1990; Murphy, Janeway's *Immunobiology* (8ª edición), 2011 Garland Science, NY, pág. 669-716).

25 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede comprender el tratamiento con un agente de inmunoterapia, tal como un anticuerpo inmunoterapéutico, una citocina, un trasplante de células hematopoyéticas, un agente inmunosupresor o una vacuna. En ciertas realizaciones, la inmunoterapia comprende el tratamiento con un inhibidor de un regulador negativo de una respuesta inmunitaria. El regulador negativo de una respuesta inmunitaria puede ser uno o más de CTLA4/CD152, LAG3/CD223 y PD-1/CD279. Por ejemplo, el regulador negativo de una respuesta inmunitaria puede ser CTLA-4/CD152 y el inhibidor del regulador negativo de una respuesta inmunitaria es un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab (p.ej., Lyseng-Williamson et al., 2012 *Am. J. Clin. Dermatol.* 13:349; Jeter et al., 2012 *Clin. Med. Insights Oncol.* 6:275; Waitz et al., 2012 *Canc. Res.* 72:430) o tremelimumab (p.ej., Callahan et al., 2010 *Sem. Oncol.* 37:473; Ascieto et al. 2011 *J. Transl. Med.* 9:196; Calabro et al., 2010 *Sem. Oncol.* 37:460; Ribas, 2010 *Sem. Oncol.* 37:450). En ciertas realizaciones, el regulador negativo de una respuesta inmunitaria puede ser PD-1/CD279, y el inhibidor del regulador negativo de una respuesta inmunitaria es un anticuerpo anti-PD-1. En ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede comprender el tratamiento con un agente que se dirige a un potenciador de una respuesta inmunitaria. El potenciador de una respuesta inmunitaria puede ser 41BB/CD137 (Kwon et al., 1989 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:1963), OX40/CD134 (número de registro de GenBank AJ277151) o CD40 (Banchereau et al., 1994 *Ann. Rev. Immunol.* 12:881).

40 En ciertas otras realizaciones, la inmunoterapia puede comprender el tratamiento de una afección inflamatoria o una enfermedad autoinmune con un inhibidor de una ruta inflamatoria. Las afecciones inflamatorias o las enfermedades autoinmunes contempladas incluyen la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Crohn y la artritis idiopática juvenil. Los mecanismos inflamatorios se han caracterizado ampliamente (p.ej., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, (12ª edición, Brunton et al., Eds., McGraw Hill, NY, 2011, páginas 909-1099); 1891-1990; Murphy, Janeway's *Immunobiology* (8ª Ed.), 2011 Garland Science, NY), de manera que en estas realizaciones y realizaciones relacionadas, la vía inflamatoria comprende al menos uno de los factores de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gamma (IFN γ), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8). Por ejemplo, para las vías inflamatorias que incluyen TNF α , se conocen inhibidores de la vía inflamatoria que se unen específicamente al TNF α , tales como los anticuerpos anti-TNF α (p.ej., adalimumab, infliximab) y receptores de TNF α solubles artificiales (p.ej., etanercept).

A. Dianas ilustrativas para la inmunoterapia

55 La capacidad de cuantificar la inmunocompetencia del sistema inmunitario adaptativo de un paciente (definida como diversidad en la sangre o clonalidad en un tejido tumoral, en el caso de tumores sólidos) antes del tratamiento con un fármaco inmunomodulador o régimen de tratamiento es predictiva de la respuesta al tratamiento y correlativa a la supervivencia general.

60 Hay muchas dianas en la cascada inmunitaria que pueden ser consideradas como posibles tratamientos para el cáncer y otras áreas terapéuticas. Algunas se expresan en la superficie de las células T y son reguladores negativos de la respuesta inmunitaria, y algunas se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos y se cree que regulan positivamente la cascada inmunitaria. A continuación, están las dianas ilustrativas en inmunoterapia que se utilizan o se han utilizado en el área clínica (anti-CTLA, ipilimumab) o en ensayos clínicos

activos, y actualmente están siendo utilizados por múltiples fabricantes farmacéuticos después de informar sobre datos iniciales satisfactorios en pacientes. Estas dianas y sus inhibidores o reguladores se pueden utilizar en medidas de inmunoterapia o tratamiento, de acuerdo con los métodos de la invención descritos en la presente memoria.

5 **Anti-CTLA.** Dos proteínas en la superficie de las células T - CD28 y el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) - desempeñan un papel importante en la regulación de la activación y tolerancia inmunológicas. CD28 proporciona señales moduladoras positivas en las primeras etapas de una respuesta inmunitaria, mientras que la señalización de CTLA-4 inhibe la activación de las células T, particularmente durante las respuestas de células T fuertes. El bloqueo de CTLA-4 utilizando la terapia con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 tiene gran atractivo debido a que la supresión de señales inhibitorias da como resultado la generación de una respuesta de células T antitumorales. Los datos clínicos y preclínicos indican que el bloqueo de CTLA-4 da como resultado la activación directa de las células efectoras CD4+ y CD8+, y la terapia con anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 se ha mostrado prometedora en varios cánceres, particularmente melanoma. *Oncologist*. 2008; 13 Suppl 4:2-9. doi: 10.1634/theoncologist.13-S4-2. Existen dos compuestos anti-CTLA4: (i) Yervoy, o ipilimumab (Bristol Myers Squibb (BMS)) y (ii) tremelimumab (Medimmune).

20 **PD-1.** Muerte programada 1 (PD-1) y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, liberan señales inhibitorias que regulan el equilibrio entre la activación, la tolerancia y la inmunopatología de células T. Las respuestas inmunitarias a los antígenos foráneos y a los autoantígenos requieren respuestas específicas y equilibradas para eliminar los patógenos y los tumores y, sin embargo, mantener la tolerancia a los autoantígenos. La inducción y el mantenimiento de la tolerancia de las células T requiere PD-1, y su ligando PD-L1 en células no hematopoyéticas puede limitar las respuestas de células T efectoras y proteger los tejidos del daño tisular mediado por mecanismos inmunes. La vía PD-1:PD-L también ha sido usurpada por microorganismos y tumores para atenuar la inmunidad antimicrobiana o tumoral y facilitar la infección crónica y la supervivencia del tumor. La identificación de B7-1 como un compañero de unión adicional para PD-L1, junto con el descubrimiento de una interacción bidireccional inhibitoria entre PD-L1 y B7-1, revela nuevas formas en que la familia B7:CD28 regula la activación y tolerancia de las células T. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. Existen al menos 5 compuestos de PD-1 conocidos en desarrollo: Merck (MK-3475) o lambrolizumab; BMS (MBS-936558) o nivolumab; Medimmune (MEDI4736); Glaxo (AMP-224); Genentech (MPDL3280A).

35 **4-1BB.** 4-1BB (CD137), un miembro de la superfamilia del receptor de TNF, es una molécula coestimuladora de células T inducida por activación. La señalización a través de 4-1BB regula al alza los genes de supervivencia, mejora la división celular, induce la producción de citocinas y previene la muerte celular inducida por activación en células T. La importancia de la vía 4-1BB se ha subrayado en varias enfermedades, incluido el cáncer. La creciente evidencia indica que los anticuerpos monoclonales anti-4-1BB poseen fuertes propiedades antitumorales, que a su vez son el resultado de sus potentes capacidades de activación de células T CD8 +, producción de IFN- γ e inductora de marcadores citolíticos. Además, la terapia combinada de anti-4-1BB con otros agentes anticancerosos, como la radiación, tiene capacidades robustas de regresión tumoral contra tumores no inmunogénicos o poco inmunogénicos. *Mol Cancer Ther*; 11(5); 1062-70, 2012 AACR. Dos ejemplos de compuestos 4-1BB están siendo desarrollados por Pfizer (PF-05082566) y BMS (BMS-663513).

45 **CD40.** CD40 (CD154) es una proteína coestimuladora que se encuentra en las células presentadoras de antígeno y es necesaria para su activación. La unión de CD154 (CD40L) sobre células T_H a CD40 activa las células presentadoras de antígeno e inducen una variedad de efectos aguas abajo. El receptor de proteína codificado por este gen es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF. Se ha encontrado que este receptor es esencial para mediar en una amplia variedad de respuestas inmunitarias e inflamatorias que incluyen el cambio de clase de inmunoglobulina dependiente de células T, el desarrollo de células B de memoria y la formación de centros germinales. Entrez Gene: CD40 molecule, miembro 5 de la superfamilia del receptor de TNF; [En.wikipedia.org/wiki/CD40_\(protein\)](http://en.wikipedia.org/wiki/CD40_(protein)). Los compuestos CD40 ilustrativos incluyen, entre otros, los siguientes desarrollados por Seattle Genetics/Genentech (dacetuzumab) y Novartis (lucatumumab).

55 **LAG-3.** LAG-3 (CD223) es una molécula de superficie celular expresada en células T activadas (Huard et al. *Immunogenetics* 39:213-217, 1994), células NK (Triebel et al. *J Exp Med* 171:1393-1405, 1990), células B (Kisielow et al. *Eur J Immunol* 35:2081-2088, 2005), y células dendríticas plasmacitoides (Workman et al. *J Immunol* 182:1885-1891, 2009) que juega un papel importante pero no completamente comprendido en la función de estos subconjuntos de linfocitos. Además, se cree que la interacción entre LAG-3 y su ligando principal, MHC Clase II, desempeña un papel en la modulación de la función de la célula dendrítica (Andrae et al. *J Immunol* 168:3874-3880, 2002). Estudios preclínicos recientes han documentado un papel para LAG-3 en el agotamiento de células T CD8 (Blackburn et al. *Nat Immunol* 10: 29-37, 2009), y el bloqueo de la interacción LAG-3/Clase II utilizando una proteína de fusión de Ig LAG-3 se está evaluando en una serie de pruebas clínicas en pacientes con cáncer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011; 344:269-78. doi: 10.1007/82_2010_114. LAG-3 se está desarrollando como una diana, por compañías tales como BMS.

Amplitud de dianas a lo largo de la cascada inmunológica. La modulación inmunológica también puede categorizar en familia de compuestos (frente a la diana específica) en un miembro de la familia de las inmunoglobulinas o de la familia de los TNF. Véase Nature Reviews Drug Discovery 12, 130-146 (febrero de 2013) (doi:10.1038/nrd3877) Esta categorización es útil para resaltar la amplitud de categorías terapéuticas aparte del cáncer que estas dianas pueden alcanzar, y para las cuales una medida de la inmunocompetencia puede ser igualmente relevante.

5

10

Tabla 1. Lista de Ejemplos de Dianas para Inmunoterapia

Nombre	Compañías	Tipo de agente biológico	Vías	Roles	Indicaciones	Fase de prueba
<i>Familia de inmunoglobulinas</i>						
Tremelimumab	Medimmune/ AstraZeneca	IgG2 humana específica de CTLA4	CTLA-B7.1, CTLA-B7.2, B7H2	Cebado y activación de células T	Tumores sólidos	II
Galiximab	Grupo B de cáncer y leucemia (CALGB/ Biogen Idec	IgG1 quimérica específica de B7.1	B7.1	Proliferación de células B	Linfoma	II
BMS-936556	Bristol-Myers Squibb/Medarex	IgG4 humana específica de PD1	PD1-B7H1 PD1-B7DC	Activación y tolerancia de células T	Múltiples cánceres; VHC	III
CT-011	CureTech	IgG1 humanizada específica de PD1	PD1-B7H1, PD1-B7DC	Activación y tolerancia de células	Tumores sólidos avanzados; VHC	II
MK-347S	Merck/Schering-Plough	IgG4 específica de PD1	PD1-B7H1 PD1-B7DC	Activación y tolerancia de células	Tumores sólidos avanzados o metastásicos	I
AMP224	Amplimmune/ GlaxoSmithKline	B7DC y proteína de fusión de IgG1 humana	PD1-B7H1, PD1-B7DC	Activación y tolerancia de células	Múltiples cánceres	I
BMS-936559	Bristol-Myers Squibb	IgG4 humana específica de B7H1	PD1-B7H1	Activación y tolerancia de células	Tumores sólidos avanzados o recurrentes	I
MPDL328A	Genentech/Roche	IgG1 humana modificada genéticamente específica de B7H1	PD1-B7H1	Activación y tolerancia de células	Tumores sólidos	I
MEDI4736	Medimmune/ AstraZeneca	IgG1 humana modificada genéticamente específica de B7H1	PD1-B7H1	Activación y tolerancia de células	Tumores sólidos	I
MEDI570	Medimmune/ AstraZeneca	IgG humana específica de ICOS	ICOS-B7H2	Respuesta de células B dependiente de células T	SLE	I
AMG557	Amgen	IgG humana específica de B7H2	ICOS, CD28, CTLA4	Respuesta de células B dependiente de células T	SLE, psoriasis	I
MGA271	Macrogenics	IgG1 humanizada potenciada con ADCC específica de B7H3	B7H3	Activación y tolerancia de células T	Tumores sólidos	

IMP321	Immutep	LAG3 proteína de fusión de IgG1 humana	LAG3-MCHII	Maduración de CD y activación de células T	Múltiples cánceres	I/II
<i>Familia de TNF</i>						
BMS-663513	Bristol-Myers Squibb	IgG4 humana específica de CD137	CD137	Activación de células T	Tumores sólidos	I/II
PF-05082566	Pfizer	IgG humana específica de CD137	CD137	Activación de células T	Linfoma	I
CDX-1127	Celidex	IgG1 humana específica de CD27	CD137	Activación de células T	Múltiples cánceres	I
Anti-OX40	Providence Health & Services	IgG de ratón específica de OX40	OX40	Activación de células T CD4	Cáncer de próstata	II
huMab OX40L	Genentech/Roche	IgG1 humana específica de OX40L	OX40-OX40L	Activación de células T CD4	Asma	II
TRX518	GITR Inc.	IgG1 humanizada específica de GITR	GITR-GITRL	Activación de células T	Tumores sólidos	I
CP-870.893	Pfizer	IgG1 humana específica de CD40	CD40	Activación de APC y maduración de células B	Múltiples cánceres	I
Lucatumumab	Novartis	IgG1 humana específica de CD40	CD40	Activación de APC y maduración de células B	Linfoma y leucemia	I/II
Dacetuzumab	Seattle Genetics	IgG1 humanizada específica de CD40	CD40	Activación de APC y maduración de células B	Linfoma y mieloma múltiple	II
ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; APC, célula presentadora de antígenos; B7H1, homólogo 1 de B7; BAFFR receptor del factor de activación de células B; BCMA, antígeno de maduración de células B; CTLA4, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos; CD, célula dendrítica; GITR, proteína relacionada con TNF β , inducida por glucocorticoides; GITRL, ligando de GITR; VHC, virus de la hepatitis C; ICOS, co-estimulador inducible; IgG1, inmunoglobulina G1; LAG3, gen 3 de activación de linfocitos; MCHII, complejo mayor de histocompatibilidad clase II; OX40L, ligando OX40; PD1, proteína 1 de muerte celular programada; SLE, lupus eritematoso generalizado; TAC1, activador transmembrana e interactuante con CAML, TNF, factor de necrosis tumoral.						

Nature Reviews Drug Discovery 12, 130-146 (febrero de 2013) (doi: 10.1038/nrd3877).

- 5 **Muestras y sujetos.** El sujeto o la fuente biológica, a partir de la cual se puede obtener una muestra biológica de prueba, puede ser un animal humano o no humano, o un organismo transgénico o clonado o con tejido modificado (incluso a través del uso de células madre). En ciertas realizaciones preferidas de la invención, se puede conocer que el sujeto o fuente biológica tiene, o puede sospecharse que tiene o está en riesgo de tener, cáncer u otra afección maligna, o una enfermedad autoinmune, o una afección inflamatoria, o una infección microbiana bacteriana, viral, fúngica u otra, o el sujeto o fuente biológica pueden ser un receptor de trasplante de órgano sólido (p. ej., receptor de todo o parte de un hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, corazón o piel trasplantados). En algunas realizaciones, o el sujeto o fuente biológica puede ser un receptor de trasplante de células hematopoyéticas (p.ej., receptor de un trasplante de médula ósea, trasplante de sangre del cordón umbilical, trasplante autólogo de células T, etc.). En ciertas realizaciones de la invención, se puede conocer que el sujeto o fuente biológica está libre de riesgo o presencia de dicha enfermedad. La muestra biológica de prueba puede obtenerse del sujeto o fuente biológica en uno o en una pluralidad de puntos temporales, por ejemplo, en uno o en una pluralidad de puntos temporales antes de la administración del tratamiento o terapia (p.ej., inmunoterapia) al sujeto o fuente biológica, y también en uno o en una pluralidad de puntos temporales durante o después de la administración del tratamiento o terapia (p.ej., inmunoterapia) al sujeto o fuente biológica.
- 10
- 15
- 20 Ciertas realizaciones preferidas contemplan un sujeto o fuente biológica que es un sujeto humano tal como un paciente que ha sido diagnosticado de o está en riesgo de desarrollar o adquirir cáncer de acuerdo con criterios de

diagnóstico clínico aceptados en la técnica, tales como los del Instituto Nacional de Cáncer de EE.UU. (Bethesda, MD, EE.UU.) o como describen DeVita, Hellman y Rosenberg *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (2008, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia/Ovid, Nueva York); Pizzo y Poplack, *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (Cuarta edición, 2001, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia/Ovid, Nueva York); Vogelstein y Kinzler, *The Genetic Basis of Human Cancer* (Segunda edición, 2002, McGraw Hill Professional, Nueva York)); Dancey et al. (2009 *Semin. Oncol.* 36 Supl. 3:S46). Ciertas realizaciones contemplan un sujeto humano que se sabe que está libre de riesgo de tener, desarrollar o adquirir cáncer según tales criterios. Los ejemplos de afecciones malignas que se contemplan de acuerdo con ciertas realizaciones presentes pueden incluir tumores sólidos tales como melanoma, sarcoma y carcinoma. Otros también pueden incluir, por ejemplo, melanoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata.

Algunas otras realizaciones contemplan un sujeto no humano o una fuente biológica, por ejemplo, un primate no humano tal como un macaco, chimpancé, gorila, vervet, orangután, mandril u otro primate no humano, incluyendo tales sujetos no humanos que pueden ser conocidos en la técnica como modelos preclínicos, incluyendo modelos preclínicos para tumores sólidos y/u otros cánceres. Algunas otras realizaciones contemplan un sujeto no humano que es un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cerdo, oveja, caballo, bóvido, cabra, jerbo, hámster, cobaya u otro mamífero; muchos de tales mamíferos pueden ser sujetos que se conocen en la técnica como modelos preclínicos para ciertas enfermedades o trastornos, incluyendo tumores malignos hematopoyéticos linfoides y/u otros cánceres (p.ej., Li et al., 2011 *Dis. Model. Mech.* 4:311; von Euler et al., 2011 *Vet. Comp. Oncol.* 9:1; Goldstein et al., *Expert 2010 Rev. Hematol.* 3:301; Diamond et al., 2009 *J. Bone Min. Res.* 24:1150; Macor et al., *Curr. 2008 Pharm. Des.* 14:2023; Talmadge et al., 2007 *Am. J. Pathol.* 170:793; Kerbel, 2003 *Canc. Biol. Therap.* 2 (4 Suppl 1):S134; Man et al., 2007 *Canc. Met. Rev.* 26:737; Céspedes et al., 2006 *Clin. Transl. Oncol.* 8:318). No se pretende que el rango de realizaciones esté tan limitado, sin embargo, de modo que también se contemplan otras realizaciones en las que el sujeto o fuente biológica puede ser un vertebrado no mamífero, por ejemplo, otro vertebrado superior, o un anfibio aviar o especies de reptiles, u otro sujeto o fuente biológica.

Como también se menciona en otra parte de la presente memoria, se han establecido criterios de diagnóstico clínico aceptados en la técnica para estos y otros tipos de cáncer, tales como los promulgados por el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (Bethesda, MD, EE.UU.) o como describen DeVita, Hellman y Rosenberg *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (2008, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia/Ovid, Nueva York); Pizzo y Poplack, *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (Cuarta edición, 2001, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia/Ovid, Nueva York); y Vogelstein y Kinzler, *The Genetic Basis of Human Cancer* (Segunda edición, 2002, McGraw Hill Professional, Nueva York)). Por ejemplo, Ignatiadis et al. (*Pathobiol.* 75:104); Kunz (2008 *Curr. Drug Discov. Technol.* 5:9); y Auman et al. (2008 *Drug Metab. Rev.* 40:303) describen otros ejemplos no limitantes de tipificación y caracterización de cánceres concretos.

Se pueden proporcionar muestras biológicas obteniendo una muestra de sangre, una muestra de biopsia, una muestra de tumor extirpado tal como una muestra de tumor sólido, explante de tejido, cultivo de órgano, fluido biológico o cualquier otro tejido o preparación celular a partir de un sujeto o fuente biológica. Por lo tanto, las células B y las células T pueden obtenerse de una muestra biológica, tal como a partir de una variedad de muestras de tejidos y fluidos biológicos que incluyen médula ósea, timo, glándulas linfáticas, ganglios linfáticos, tejidos y sangre periféricos, y también de tejidos tumorales (p.ej., linfocitos infiltrantes de tumores), pero se accede más fácilmente a la sangre periférica. Se pueden tomar muestras de cualquier tejido periférico para detectar la presencia de células B y T y, por lo tanto, se contempla su uso en los métodos descritos en la presente memoria. Los tejidos y fluidos biológicos a partir de los cuales se pueden obtener células relacionadas con la inmunidad adaptativa incluyen, entre otros, piel, tejidos epiteliales, colon, bazo, secreción de la mucosa, mucosa oral, mucosa intestinal, mucosa vaginal o secreción vaginal, tejido cervical, ganglios, saliva, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula ósea, sangre del cordón umbilical, suero, líquido seroso, plasma, linfa, orina, líquido ascítico, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido abdominal, medio de cultivo, medio de cultivo acondicionado o fluido de lavado. En ciertas realizaciones, células del sistema inmunitario adaptativo (p.ej., células hematopoyéticas de linaje linfóide tales como células T y células B) pueden aislarse a partir de una muestra de aféresis. Las muestras de sangre periférica se pueden obtener por flebotomía de los sujetos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan mediante mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, p.ej., por separación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque®. En ciertas realizaciones, se utilizan PBMC completas para el análisis.

En ciertas realizaciones relacionadas, se pueden preparar preparaciones que comprenden predominantemente linfocitos (p.ej., células T y B) o que comprenden predominantemente células T o predominantemente células B, para utilizarlas como una muestra biológica como se proporciona en la presente memoria, de acuerdo con metodologías establecidas aceptadas en la técnica. En otras realizaciones relacionadas, pueden aislarse subpoblaciones específicas de células T o B antes del análisis utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Diversos métodos y kits disponibles comercialmente para aislar diferentes subpoblaciones de células T y B son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, separación mediante esferas inmunomagnéticas para selección de subconjuntos o clasificación de células mediante inmunocitometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para

uno o más de cualquiera de variedad de marcadores de superficie de células T y B conocidas. Marcadores ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, uno o una combinación de CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD25, CD28, CD45RO, CD45RA, CD54, CD62, CD62L, CDw137 (41BB), CD154, GITR, FoxP3, CD54 y CD28. Por ejemplo, y como es sabido por el experto en la técnica, los marcadores de superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD45RA y CD45RO pueden usarse para determinar los linajes de T, B y monocitos y subpoblaciones en la citometría de flujo. De manera similar, se pueden utilizar marcadores de dispersión de luz frontal, dispersión lateral y/o de superficie celular tales como CD25, CD62L, CD54, CD137, CD154 para determinar el estado de activación y las propiedades funcionales de las células.

Las combinaciones ilustrativas útiles en algunos de los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir CD8⁺CD45RO⁺ (células T citotóxicas de memoria), CD4⁺CD45RO⁺ (T coadyuvantes de memoria), CD8⁺CD45RO⁻ (CD8⁺CD62L⁺CD45RA⁺ (células T citotóxicas del tipo no expuesto previamente a antígeno); CD4⁺CD25⁺CD62L^{hi}GITR⁺FoxP3⁺ (células T reguladoras). Los anticuerpos ilustrativos para su uso en separaciones inmunomagnéticas de células o clasificación de células mediante inmunocitometría de flujo incluyen anti-anticuerpos humanos marcados fluorescentemente, p.ej., CD4 FITC (clon M-T466, Miltenyi Biotec), CD8 PE (clon RPA-T8, BD Biosciences), CD45RO ECD (clon UCHL-1, Beckman Coulter), y CD45RO APC (clon UCHL-1, BD Biosciences). La tinción de PBMC totales puede realizarse con la combinación adecuada de anticuerpos, seguida de lavado de las células antes del análisis. Los subconjuntos de linfocitos se pueden aislar por medio de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), p.ej., mediante un sistema de clasificación de células BD FACSAria™ (BD Biosciences) y analizando los resultados con el soporte lógico FlowJo™ (Treestar Inc.), y también mediante métodos conceptualmente similares que implican anticuerpos específicos inmovilizados en superficies o esferas.

Para la extracción de ácido nucleico, el ADN genómico total se puede extraer de las células utilizando métodos conocidos en la técnica y/o kits comercialmente disponibles, p.ej., mediante el uso del Mini Kit QIAamp® DNA blood (QIAGEN®). La masa aproximada de un solo genoma haploide es 3 pg. Preferiblemente, se utilizan para el análisis al menos 25.000 a 250.000 células, por ejemplo, al menos 50.000 a 125.000 células, o al menos 75.000 a 150.000 células, o al menos 100.000 a 200.000 células. es decir, aproximadamente 0,15 a 1,5 µg, o, por ejemplo, 0,6 a 1,2 µg de ADN de células T o B diploides. El número de células T o B presentes en una muestra puede variar considerablemente cuando la muestra se obtiene de un paciente que tiene una neoplasia maligna hematológica linfocítica, tal como leucemia linfoblástica de células T (ALL-T). Utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un humano adulto normal sano como fuente, el número de células T puede variar y se puede estimar que es aproximadamente 30% del total de células; el número de células B puede variar y se puede estimar que es aproximadamente 5-15% del total de células en una preparación de PBMC.

35 V. Receptores relacionados con la inmunidad adaptativa (AIR)

El TCR nativo es una proteína de superficie celular heterodimérica de la superfamilia de inmunoglobulinas que está asociada a proteínas invariables del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales. Los TCR existen en formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que son estructuralmente similares, pero tienen ubicaciones anatómicas y probablemente funciones bastante distintas. Los ligandos del MHC clase I y clase II, que se unen al TCR, también son proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas, pero están especializados para la presentación de antígenos, con un sitio de unión de péptidos altamente polimórfico que les permite presentar una diversidad de fragmentos de péptidos cortos en la superficie de la célula APC.

Las porciones extracelulares de los TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ heterodiméricos nativos consisten en dos polipéptidos, cada uno de los cuales tiene un dominio constante proximal a la membrana y un dominio variable distal a la membrana. Cada uno de los dominios constantes y variables incluye un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen los bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos. La CDR3 de los TCR $\alpha\beta$ interactúa con el péptido presentado por el MHC, y las CDR 1 y 2 de los TCR $\alpha\beta$ interactúan con el péptido y el MHC. La diversidad de las secuencias de TCR se genera a través del reordenamiento somático de los genes variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes enlazados.

Los loci de los genes de Ig y TCR contienen muchos segmentos génicos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J), que se someten a procesos de reordenamiento durante la diferenciación linfocítica temprana. Las secuencias de segmentos génicos de Ig y TCR V, D y J son conocidas en la técnica y están disponibles en bases de datos públicas tales como GENBANK.

Los reordenamientos V-D-J están mediados por un complejo enzimático de recombinasa en el que las proteínas RAG1 y RAG2 juegan un papel clave al reconocer y cortar el ADN en las secuencias señal de recombinación (RSS), que se localizan aguas abajo de los segmentos del gen V, a ambos lados de los segmentos del gen D, y aguas arriba de los segmentos del gen J. La RSS inapropiada reduce o incluso evita por completo la reorganización. La secuencia señal de recombinación (RSS) consta de dos secuencias conservadas (heptámero, 5'-CACAGTG-3' y nonámero, 5'-ACAAAAACC-3'), separadas por un espaciador de 12 +/- 1 pb ("señal 12") o 23 +/- 1 pb ("señal 23"). Se han identificado varias posiciones de nucleótidos que son importantes para la recombinación, incluido el

dinucleótido de CA en la posición uno y dos del heptámero, y también se ha mostrado que es muy preferible un C en la posición tres del heptámero, así como un nucleótido A en las posiciones 5, 6, 7 del nonámero. (Ramsden et al. 1994 Nucl. Ac. Res. 22:1785; Akamatsu et al. 1994 J. Immunol. 153:4520; Hesse et al. 1989 Genes Dev. 3:1053). Las mutaciones de otros nucleótidos tienen efectos mínimos o inconsistentes. El espaciador, aunque es más variable, también tiene un impacto en la recombinación, y se ha demostrado que las sustituciones de un solo nucleótido tienen un impacto significativo sobre la eficacia de la recombinación (Fanning et al. 1996 Cell. Immunol. Immunopath. 79:1, Larijani et al. 1999 Nucl. Ac. Res. 27:2304; Nadel et al. 1998 J. Immunol. 161:6068; Nadel et al., 1998 J. Exp. Med. 187:1495). Se han descrito los criterios para identificar secuencias de polinucleótidos de RSS que tienen eficacias de recombinación significativamente diferentes (Ramsden et al. 1994 Nucl. Ac. Res. 22:1785; Akamatsu et al. 1994 J. Immunol. 153:4520; Hesse et al. 1989 Genes Dev. 3:1053 y Lee et al., 2003 PLoS 1(1):E1).

El proceso de reordenamiento generalmente comienza con un reordenamiento de D a J seguido de un reordenamiento de V a D-J en el caso de genes de cadena pesada de Ig (IgH), TCR beta (TCRB) y TCR delta (TCRD) o reordenamientos directos de V a J en el caso de genes Ig kappa (IgK), Ig lambda (IgL), TCR alfa (TCRA) y TCR gamma (TCRG). Las secuencias entre los segmentos génicos que se reorganizan generalmente se eliminan en forma de un producto de escisión circular, también denominado círculo de escisión de TCR (TREC) o círculo de escisión del receptor de células B (BREC).

Las muchas combinaciones diferentes de segmentos de genes V, D y J representan el llamado repertorio combinatorio, que se estima que es $\sim 2 \times 10^6$ para moléculas de Ig, $\sim 3 \times 10^6$ para TCR $\alpha\beta$ y $\sim 5 \times 10^3$ para moléculas de TCR $\gamma\delta$. En los sitios de unión de los segmentos del gen V, D y J, la delección y la inserción aleatoria de nucleótidos se produce durante el proceso de reordenamiento, lo que da como resultado regiones de unión muy diversas, que contribuyen significativamente al repertorio total de moléculas de Ig y TCR, que se estima que es $> 10^{12}$.

Los linfocitos B maduros extienden aún más su repertorio de Ig después del reconocimiento del antígeno en los centros del folículo a través de la hipermutación somática, un proceso que conduce a la maduración por afinidad de las moléculas de Ig. El proceso de hipermutación somática se centra en el exón V- (D-) J de los genes de cadena ligera de IgH e Ig y se refiere a mutaciones de un solo nucleótido y, a veces, también a inserciones o delecciones de nucleótidos. Los genes de Ig mutados somáticamente también se encuentran en tumores malignos maduros de células B de origen folicular o posfolicular.

VI. Cebadores de amplificación y PCR múltiple

En ciertas realizaciones preferidas descritas en la presente memoria, se pueden emplear cebadores del segmento V y del segmento J en una reacción de PCR para amplificar regiones de ADN que codifican TCR o Ig reordenadas en una muestra biológica de prueba, en donde cada segmento genético que codifica V de TCR o Ig funcional comprende una secuencia señal de recombinación del gen V (RSS) y cada segmento génico que codifica J de TCR o Ig comprende una RSS del gen J. En estas realizaciones y en realizaciones relacionadas, cada molécula de ADN reordenada amplificada puede comprender (i) al menos aproximadamente 10, 20, 30 o 40 nucleótidos contiguos de una cadena efectora del segmento del gen que codifica V de TCR o Ig, estando al menos aproximadamente 10, 20, 30 o 40 nucleótidos contiguos están situados 5' respecto a la RSS del gen V y/o cada molécula de ADN reordenada amplificada puede comprender (ii) al menos aproximadamente 10, 20 o 30 nucleótidos contiguos de una cadena efectora de J de TCR o Ig que codifica el segmento génico, estando al menos aproximadamente 10, 20 o 30 nucleótidos contiguos situados 3' con respecto a la RSS del gen J. En ciertas realizaciones preferidas, cada región que codifica CDR3 de TCR o Ig amplificada está presente en una molécula de ADN reordenada amplificada que tiene menos de 600 nucleótidos de longitud. Sin desear estar limitados por ninguna teoría, estas características de diseño para amplificar regiones de unión V-J que codifican CDR3 permiten la hibridación de cebadores de segmentos V a sustancialmente todos los segmentos génicos que codifican V de TCR o Ig funcionales, y también permiten la hibridación de cebadores de segmentos J a sustancialmente todos los segmentos que codifican J de TCR o Ig, y también permiten la amplificación de regiones codificantes de CDR3 que son susceptibles de secuenciarse mediante las plataformas de secuenciación de alto rendimiento (HTS) descritas en la presente memoria a la vez que incluyen información de secuencia adecuada para identificar todas las posibles combinaciones V-D-J y V-J.

VII. PCR cuantitativa múltiple

Como se describe en la presente memoria y en vista de Robins et al., 2009 Blood 114, 4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64; Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi:10.1016/j.jim.2011.09.001; Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61; documento U.S.A.N. 13/217.126, documento U.S.A.N. 12/794.507, documento WO/2010/151416, documento WO/2011/106738(PCT/US2011/026373), documento WO/2012/027503 (PCT/US2011/049012), documento U.S.A.N. 61/550.311 y documento U.S.A.N. 61/569.118, de acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, los presentes métodos implican un método de PCR múltiple utilizando un conjunto de cebadores directos que se hibridan específicamente con los segmentos V y un conjunto de cebadores inversos que hibridan específicamente con los segmentos J donde la reacción de PCR múltiple permite la amplificación de todas

las posibles combinaciones V-J (y V-D-J) dentro de una población dada de células T o B.

Se puede extraer ADN o ARN de células en una muestra, tal como una muestra de sangre o linfa u otra muestra de un sujeto que se sabe que contiene células linfoides, utilizando métodos convencionales o kits comercialmente disponibles conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se utiliza ADN genómico. En otras realizaciones, el ADNc se transcribe a partir de ARNm obtenido de las células y luego se utiliza para la PCR múltiple.

Se puede utilizar un sistema de PCR múltiple para amplificar los loci del receptor de células relacionadas con la inmunidad adaptativa reordenados a partir de ADN genómico, preferiblemente de una región CDR3. En ciertas realizaciones, la región CDR3 se amplifica a partir de una región CDR3 de TCR α , TCR β , TCR γ o TCR δ o de manera similar a partir de un locus IgH o IgL (lambda o kappa). Se proporcionan composiciones que comprenden una pluralidad de cebadores del segmento V y del segmento J que son capaces de promover la amplificación en una reacción en cadena de polimerasa múltiple (PCR) de sustancialmente todas las regiones codificantes de CDR3 del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa productivamente reordenadas en la muestra para una clase dada de tales receptores (p.ej., TCR γ , TCR β , IgH, etc.), para producir una multiplicidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas de una población de células T (para TCR) o células B (para Ig) en la muestra. Preferiblemente y en ciertas realizaciones, los cebadores se diseñan de modo que cada molécula de ADN reordenada amplificada en la multiplicidad de moléculas de ADN reordenadas amplificadas tiene menos de 600 nucleótidos de longitud, excluyendo de este modo los productos de amplificación de loci de receptores relacionados con la inmunidad adaptativa no reordenados.

En el genoma humano, actualmente se cree que hay aproximadamente 70 segmentos de genes V α de TCR y aproximadamente 61 J α , aproximadamente 52 segmentos de genes V β de TCR, aproximadamente 2 D β y aproximadamente 13 J β , aproximadamente 9 segmentos de genes V γ de TCR y aproximadamente 5 J γ , y aproximadamente 46 segmentos de genes V H de cadena pesada de inmunoglobulina (IGH), aproximadamente 23 D H y aproximadamente 6 J H . Por consiguiente, cuando se conocen las secuencias genómicas para estos loci de manera que se pueden producir fácilmente sondas moleculares específicas para cada uno de ellos, se cree de acuerdo con la teoría no limitante que las presentes composiciones y métodos se refieren sustancialmente a la totalidad (p.ej., más del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de estos segmentos de genes que codifican las regiones V, D y J del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa reconocidos y fácilmente detectables.

Los genes TCR e Ig pueden generar millones de proteínas distintas a través de la mutación somática. Debido a este mecanismo generador de diversidad, las regiones determinantes de complementariedad hipervariables (CDR) de estos genes pueden codificar secuencias que pueden interactuar con millones de ligandos, y estas regiones están unidas a una región constante que puede transmitir una señal a la célula que indica la unión del ligando relacionado de la proteína. El sistema inmunitario adaptativo emplea varias estrategias para generar un repertorio de receptores de antígenos de células T y B con diversidad suficiente para reconocer el universo de posibles patógenos. En las células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que reconocen principalmente antígenos peptídicos presentados por moléculas del MHC, la mayor parte de esta diversidad de receptores está contenida dentro de la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de las cadenas α y β del receptor de células T (o cadenas γ y δ).

La tecnología de ensayo utiliza dos conjuntos de cebadores para proporcionar una reacción de PCR altamente multiplexada. El primer grupo "directo" (p.ej., a modo de ilustración y sin limitación, los cebadores oligonucleotídicos del segmento V descritos en la presente memoria pueden usarse en ciertas realizaciones preferidas como cebadores "directos" cuando se utilizan cebadores oligonucleotídicos del segmento J como cebadores "inversos" de acuerdo con la terminología de PCR comúnmente utilizada, pero los expertos en la técnica apreciarán que en ciertas otras realizaciones los cebadores del segmento J pueden considerarse cebadores "directos" cuando se utilizan con cebadores "inversos" del segmento V) incluye un cebador oligonucleotídico que es específico (p. ej., que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una única región de secuencia de) cada segmento que codifica la región V (segmento V) en el locus del gen de TCR o Ig respectivo. En ciertas realizaciones, se utilizan cebadores que se dirigen a una región altamente conservada para capturar simultáneamente muchos segmentos V, reduciendo así el número de cebadores requerido en la PCR múltiple. De manera similar, en ciertas realizaciones, los cebadores agrupados "inversos" hibridan con una secuencia conservada en el segmento de unión ("J").

Cada cebador puede diseñarse de manera que se obtenga un segmento de ADN amplificado respectivo que incluya una porción de secuencia de longitud suficiente para identificar cada segmento J inequívocamente basándose en las diferencias de secuencia entre segmentos de genes que codifican la región J en la base de datos del genoma humano, y también para incluir una porción de secuencia a la que se pueda reasociar un cebador específico del segmento J para la resecuenciación. Este diseño de cebadores específicos del segmento V y J permite la observación directa de una gran fracción de los reordenamientos somáticos presentes en el repertorio del gen del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa dentro de un individuo. Esta característica a su vez permite la comparación rápida de los repertorios de TCR y/o Ig (i) en individuos que tienen una enfermedad, trastorno, afección u otra indicación concreta de interés (p.ej., cáncer, una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio u otra

afección) con (ii) los repertorios de TCR y/o Ig de sujetos de control que están libres de tales enfermedades, afecciones, trastornos o indicaciones.

En algunas realizaciones, según se utiliza en la presente memoria, el término "gen" se refiere al segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica tal como la totalidad o una porción de un polipéptido TCR o Ig (p.ej., un polipéptido que contiene CDR3); incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante "líder y tráiler", así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones), y también puede incluir elementos reguladores (p.ej., promotores, potenciadores, sitios de unión represores y similares), y también pueden incluir secuencias señal de recombinación (RSS) como se describe en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos de las presentes realizaciones, a los que también se hace referencia en la presente memoria como polinucleótidos, e incluyendo oligonucleótidos, pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, cuyo ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). Una secuencia codificante que codifica un TCR o una inmunoglobulina o una región de la misma (p.ej., una región V, un segmento D, una región J, una región C, etc.) para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones puede ser idéntica a la secuencia codificante conocida en la técnica para cualquier TCR dado o regiones de genes de inmunoglobulinas o dominios polipeptídicos (p.ej., dominios de la región V, dominios CDR3, etc.), o puede ser una secuencia codificante diferente, que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo TCR o región de inmunoglobulina o polipéptido.

En una realización, la presente descripción proporciona una pluralidad de cebadores de segmentos V y una pluralidad de cebadores de segmentos J, en donde la pluralidad de cebadores de segmentos V y la pluralidad de cebadores de segmentos J amplifica sustancialmente todas las combinaciones de los segmentos V y J de un locus del receptor inmunitario reordenado. En algunas realizaciones, el método proporciona la amplificación de sustancialmente todas las secuencias de AIR reordenadas en una célula linfocítica, y es capaz de cuantificar la diversidad del repertorio de TCR o IG de al menos 10^6 , 10^5 , 10^4 o 10^3 secuencias de AIR reordenadas únicas en una muestra. "Sustancialmente todas las combinaciones" se refiere a al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de todas las combinaciones de los segmentos V y J de un locus del receptor inmunitario reordenado. En ciertas realizaciones, la pluralidad de cebadores del segmento V y la pluralidad de cebadores del segmento J amplifican todas las combinaciones de los segmentos V y J de un locus del receptor inmunitario reordenado.

En general, un sistema de PCR múltiplex puede utilizar al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, y en ciertas realizaciones, al menos 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39, y en otras realizaciones 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o más cebadores directos, en el que cada cebador directo se hibrida específicamente o es complementario a una secuencia correspondiente a uno o más segmentos de la región V. El sistema de PCR múltiplex también utiliza al menos 3, 4, 5, 6 o 7, y en ciertas realizaciones, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 cebadores inversos, en el que cada cebador inverso hibrida específicamente con, o es complementario a, una secuencia correspondiente a uno o más segmentos de la región J. Se pueden utilizar diversas combinaciones de cebadores del segmento V y J para amplificar la diversidad completa de secuencias de TCR e IG en un repertorio. Para obtener detalles sobre el sistema de PCR múltiple, incluidas las secuencias de oligonucleótidos cebadores para amplificar las secuencias de TCR e IG, véanse, p.ej., Robins et al., 2009 Blood 114, 4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64; Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi: 10.1016/j.jim.2011.09.001; Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61; documento U.S.A.N. 13/217.126, documento U.S.A.N. 12/794.507, documento WO/2010/151416, documento WO/2011/106738 (PCT/US2011/026373), documento WO2012/027503 (PCT/US2011/049012), documento U.S.A.N. 61/550.311 y documento U.S.A.N. 61/569.118.

Los oligonucleótidos o polinucleótidos que son capaces de hibridarse o reasociarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico diana mediante la complementariedad de bases de nucleótidos pueden hacerlo en condiciones de rigurosidad moderada a alta. Con fines ilustrativos, las condiciones de rigurosidad moderada a alta adecuadas para la amplificación por PCR específica de una secuencia de ácido nucleico diana serían de entre 25 y 80 ciclos de PCR, consistiendo cada ciclo en una etapa de desnaturalización (p.ej., aproximadamente 10-30 segundos (s) a más de aproximadamente 95°C), una etapa de reasociación (p.ej., aproximadamente 10-30 s a aproximadamente 60-68°C) y una etapa de extensión (p.ej., aproximadamente 10-60 s a aproximadamente 60-72°C), opcionalmente de acuerdo con ciertas realizaciones, combinándose las etapas de reasociación y extensión para proporcionar una PCR en dos etapas. Como reconocería un experto en la técnica, se pueden añadir o cambiar otros reactivos de PCR en la reacción de PCR para aumentar la especificidad de la hibridación y amplificación de cebadores, por ejemplo, alterando la concentración de magnesio, opcionalmente añadiendo DMSO, y/o utilizando cebadores bloqueados, nucleótidos modificados, péptidos-ácidos nucleicos y similares.

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar mecanismos de hibridación de ácido nucleico para evaluar la especificidad de hibridación de los cebadores descritos en la presente memoria. Los mecanismos de hibridación son bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Con fines de ilustración, las condiciones moderadamente

- rigurosas adecuadas para someter a ensayo la hibridación de un polinucleótido según se proporciona en la presente memoria con otros polinucleótidos incluyen prelavado en una solución de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50°C-60°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de un lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene SDS al 0,1%. Un experto en la técnica entenderá que la rigurosidad de la hibridación puede manipularse fácilmente, por ejemplo, alterando el contenido de sal de la solución de hibridación y/o la temperatura a la que se realiza la hibridación. Por ejemplo, en otra realización, las condiciones de hibridación altamente rigurosas adecuadas incluyen las descritas anteriormente, con la excepción de que se aumenta la temperatura de hibridación, p.ej., a 60°C-65°C o 65°C-70°C.
- En ciertas realizaciones, los cebadores están diseñados para no cruzar un límite de intrón/exón. Los cebadores directos en ciertas realizaciones hibridan con los segmentos V en una región de conservación de secuencia relativamente fuerte entre segmentos V con el fin de maximizar la conservación de la secuencia entre estos cebadores. De acuerdo con esto, esto minimiza el potencial de propiedades de apareamiento diferencial de cada cebador, y de modo que la región amplificada entre los cebadores V y J contiene suficiente información de secuencia TCR o IgV para identificar el segmento específico del gen V utilizado. En una realización, los cebadores del segmento J hibridan con un elemento conservado del segmento J y tienen una resistencia a la reasociación similar. En una realización concreta, los cebadores del segmento J se reasocian con el mismo motivo de la región marco conservada.
- Se pueden preparar oligonucleótidos (p.ej., cebadores) mediante cualquier método adecuado, incluyendo la síntesis química directa por medio de un método tal como el método del fosfotriéster de Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90-99; el método del fosfodiéster de Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:109-151; el método de la dietilfosforamida de Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; y el método del soporte sólido de la Patente de Estados Unidos Núm. 4.458.066. Una revisión de los métodos de síntesis de productos conjugados de oligonucleótidos y nucleótidos modificados lo proporcionan Goodchild, 1990, en Bioconjugate Chemistry 1(3): 165-187.
- Un cebador es preferiblemente un ADN monocatenario. La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero típicamente varía de 6 a 50 nucleótidos, o en ciertas realizaciones, de 15-35 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del ácido nucleico molde, sino que debe ser suficientemente complementario para hibridar con el molde. El diseño de cebadores adecuados para la amplificación de una secuencia diana dada es bien conocido en la técnica y se describe en la bibliografía citada en la presente memoria.
- Como se describe en la presente memoria, los cebadores pueden incorporar características adicionales que permiten la detección o inmovilización del cebador, pero no alteran la propiedad básica del cebador, que actúa como un punto de iniciación de la síntesis de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden contener una secuencia de ácido nucleico adicional en el extremo 5' que no se hibrida con el ácido nucleico diana, pero que facilita la clonación, detección o secuenciación del producto amplificado. La región del cebador que es suficientemente complementaria al molde para hibridar se denomina en la presente memoria región de hibridación.
- Según se utiliza en la presente memoria, un cebador es "específico" para una secuencia diana si, cuando se utiliza en una reacción de amplificación en condiciones suficientemente rigurosas, el cebador hibrida principalmente con el ácido nucleico diana. Típicamente, un cebador es específico para una secuencia diana si la estabilidad del dúplex cebador-diana es mayor que la estabilidad de un dúplex formado entre el cebador y cualquier otra secuencia encontrada en la muestra. Un experto en la técnica reconocerá que diversos factores, tales como las condiciones salinas, así como la composición de bases del cebador y la ubicación de los emparejamientos erróneos, afectarán a la especificidad del cebador, y que la confirmación experimental de rutina de la especificidad del cebador será necesaria en muchos casos. Se pueden elegir condiciones de hibridación bajo las cuales el cebador puede formar dúplex estables solo con una secuencia diana. De este modo, el uso de cebadores específicos de la diana en condiciones de amplificación adecuadamente rigurosas permite la amplificación selectiva de aquellas secuencias diana que contienen los sitios de unión del cebador diana.
- En realizaciones concretas, los cebadores para uso en los métodos descritos en la presente memoria comprenden o consisten en un ácido nucleico de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud que tiene la misma secuencia que, o es sustancialmente complementaria a, una secuencia de ácido nucleico contigua del segmento V o J DIANA. Cebadores más largos, p.ej., aquellos de aproximadamente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud que tienen la misma secuencia que, o una secuencia complementaria a, una secuencia contigua del segmento V o J diana, también serán útiles en ciertas realizaciones. Se pueden contemplar diferentes emparejamientos erróneos (1, 2, 3 o más) con la secuencia diana en los cebadores, a la vez que se preserva la complementariedad con el segmento V o J diana. Todas las longitudes intermedias de los cebadores mencionados anteriormente se contemplan para su uso en la presente memoria. Como reconocería el experto en la técnica, los cebadores pueden tener una secuencia adicional añadida

(p.ej., nucleótidos que no pueden ser iguales o complementarios al segmento V o J diana), tal como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, secuencias adaptadoras para la secuenciación, secuencias de códigos de barras, y similares (véanse p.ej., las secuencias de cebador proporcionadas en la presente memoria y en la lista de secuencias). Por lo tanto, la longitud de los cebadores puede ser más larga, tal como 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75 u 80 nucleótidos de longitud o más, dependiendo del uso específico o la necesidad. Por ejemplo, en una realización, los cebadores directo e inverso se modifican ambos en el extremo 5' con la secuencia del cebador directo universal compatible con una secuencia de ácido nucleico de secuenciación de ADN.

También se contempla el uso en ciertas realizaciones de variantes de cebadores oligonucleotídicos del segmento V o del segmento J del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa que pueden compartir un alto grado de identidad de secuencia con los cebadores oligonucleotídicos. Por lo tanto, en estas realizaciones y en realizaciones relacionadas, las variantes de los cebadores oligonucleotídicos del segmento V o del segmento J o del segmento J del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa pueden tener una identidad sustancial con las secuencias de cebadores oligonucleotídicos del segmento V o del segmento J del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa descritas en la presente memoria, por ejemplo, tales variantes de cebadores oligonucleotídicos pueden comprender al menos 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o mayor identidad de secuencia en comparación con una secuencia de polinucleótidos de referencia tal como las secuencias de cebadores oligonucleotídicos descritas en la presente memoria, utilizando los métodos descritos en la presente memoria (p.ej., análisis BLAST utilizando parámetros convencionales). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la capacidad correspondiente de una variante de cebador oligonucleotídico para hibridar a un polinucleótido que codifica un segmento del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa teniendo en cuenta la degeneración de codones, el posicionamiento de los marcos de lectura y similares. Típicamente, las variantes de cebador oligonucleotídico contendrán una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, preferiblemente de manera que la capacidad de reasociación del oligonucleótido variante no disminuye sustancialmente en relación con la de una secuencia de cebador oligonucleotídico del segmento V o del segmento J relacionado con la inmunidad adaptativa que se establece específicamente en la presente memoria. Como también se observa en otra parte de la presente memoria, en realizaciones preferidas los cebadores oligonucleotídicos del segmento V y del segmento J del receptor relacionado con la inmunidad adaptativa se diseñan para que sean capaces de amplificar una secuencia de TCR o IGH reordenada que incluye la región codificante de CDR3.

De acuerdo con ciertas realizaciones contempladas en la presente memoria, los cebadores para su uso en los métodos de PCR múltiple de la presente descripción pueden bloquearse funcionalmente para prevenir el cebado no específico de secuencias de células T o B. Por ejemplo, los cebadores pueden bloquearse con modificaciones químicas como se describe en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. US2010/0167353. De acuerdo con ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, el uso de tales cebadores bloqueados en las presentes reacciones de PCR múltiple implica cebadores que pueden tener una configuración inactiva en la que la replicación del ADN (es decir, extensión del cebador) está bloqueada, y una configuración activada en la que prosigue la replicación del ADN. La configuración inactiva del cebador está presente cuando el cebador es monocatenario o cuando el cebador hibrida específicamente con la secuencia de ADN diana de interés, pero la extensión del cebador permanece bloqueada por un radical químico que está unido a o cerca del extremo 3' del cebador.

La configuración activada del cebador está presente cuando el cebador hibrida con la secuencia de interés de ácido nucleico diana y posteriormente actúa sobre ARNasa H u otro agente de escisión para eliminar el grupo 3' de bloqueo, lo que permite que una enzima (p.ej., una ADN polimerasa) catalice la extensión del cebador en una reacción de amplificación. Sin desear estar limitados por ninguna teoría, se cree que la cinética de la hibridación de tales cebadores es similar a una reacción de segundo orden y, por lo tanto, es una función de la concentración de la secuencia del gen de células T o células B en la mezcla. Los cebadores bloqueados minimizan las reacciones no específicas requiriendo la hibridación con la diana seguida de escisión antes de que pueda proseguir la extensión del cebador. Si un cebador se hibrida incorrectamente a una secuencia que está relacionada con la secuencia diana deseada pero que difiere por tener uno o más nucleótidos no complementarios que dan como resultado emparejamientos erróneos de emparejamiento de bases, se inhibe la escisión del cebador, especialmente cuando hay un emparejamiento erróneo que se encuentra en o cerca del sitio de escisión. Esta estrategia para mejorar la fidelidad de la amplificación reduce la frecuencia de falso cebado en tales ubicaciones, y por lo tanto aumenta la especificidad de la reacción. Como reconocerá el experto en la técnica, las condiciones de reacción, particularmente la concentración de ARNasa H y el tiempo permitido para la hibridación y extensión en cada ciclo, pueden optimizarse para maximizar la diferencia en las eficacias de división entre la división altamente eficiente del cebador cuando éste es correctamente hibridado a su secuencia diana verdadera, y con una escasa escisión del cebador cuando existe un emparejamiento erróneo entre el cebador y la secuencia molde a la que se puede reasociar de forma incompleta.

Como se describe en el documento US2010/0167353, se conocen varios grupos de bloqueo en la técnica que pueden colocarse en o cerca del extremo 3' del oligonucleótido (p.ej., un cebador) para prevenir la extensión. Se puede modificar un cebador u otro oligonucleótido en el nucleótido terminal 3' para prevenir o inhibir la iniciación de

la síntesis de ADN mediante, por ejemplo, la adición de un residuo de 3'-desoxirribonucleótido (p.ej., cordicepina), un residuo de 2',3'-didesoxirribonucleótido, enlaces no nucleotídicos o modificaciones alcano-diol (Patente de Estados Unidos Núm. 5.554.516). Las modificaciones alcano-diol que se pueden utilizar para inhibir o bloquear la extensión del cebador también han sido descritas por Wilk et al., (1990 *Nucleic Acids Res.* 18 (8):2065), y por Arnold et al. (Patente de Estados Unidos Núm. 6.031.091). Los ejemplos adicionales de grupos de bloqueo adecuados incluyen sustituciones 3'-hidroxilo (p.ej., 3'-fosfato, 3'-trifosfato o diésteres 3'-fosfato con alcoholes tales como 3-hidroxiopropilo), 2',3'-fosfato cíclico, sustituciones hidroxilo 2' de una base de ARN terminal (p.ej., fosfato o grupos estéricamente voluminosos tales como triisopropilsililo (TIPS) o terc-butildimetilsililo (TBDMS)). Los grupos 2'-alquilsililo tales como TIPS y TBDMS sustituidos en el extremo 3' de un oligonucleótido son descritos por Laikhter et al., Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. Ser. 11/686.894. Los sustituyentes voluminosos también pueden incorporarse a la base del residuo 3'-terminal del oligonucleótido para bloquear la extensión del cebador.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede comprender un dominio de escisión que se localiza aguas arriba (p.ej., 5' a) del grupo de bloqueo utilizado para inhibir la extensión del cebador. Como ejemplos, el dominio de escisión puede ser un dominio de escisión de ARNasa H, o el dominio de escisión puede ser un dominio de escisión de ARNasa H2 que comprende un único residuo de ARN, o el oligonucleótido puede comprender la sustitución de la base de ARN con uno o más nucleósidos alternativos. Se describen dominios ilustrativos de escisión adicionales en el documento US 2010/0167353.

Por lo tanto, un sistema PCR múltiple puede utilizar 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o más cebadores directos, en donde cada cebador directo es complementario a un solo segmento V de TCR o Ig funcional o una pequeña familia de segmentos V de TCR o Ig funcionales, p.ej., un segmento V β de TCR, o (véanse p.ej., los cebadores de TCR expuestos en la Lista de Secuencias) y, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más cebadores inversos, cada uno específico para un segmento J de TCR o Ig, tal como el segmento J β de TCR (véase p.ej., la Lista de Secuencias). En otra realización, una reacción de PCR múltiple puede utilizar cuatro cebadores directos cada uno específico para uno o más segmentos V de TCR γ funcionales y cuatro cebadores inversos, cada uno específico para uno o más segmentos J de TCR γ . En otra realización, una reacción de PCR múltiple puede utilizar 84 cebadores directos cada uno específico para uno o más segmentos V funcionales y seis cebadores inversos, cada uno específico para uno o más segmentos J. Por consiguiente, se pueden utilizar diversas combinaciones de cebadores para V y J en una reacción de PCR múltiple.

En algunas realizaciones, los cebadores del segmento V y J se utilizan para producir una pluralidad de amplicones a partir de la reacción de PCR múltiple. En ciertas realizaciones, los amplicones varían en tamaño desde 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 a 1600 nucleótidos de longitud. En realizaciones preferidas, los amplicones tienen un tamaño entre 50-600 nucleótidos de longitud.

De acuerdo con la teoría no limitante, estas realizaciones explotan la comprensión actual en la técnica (también descrita anteriormente) de que una vez una célula relacionada con la inmunidad adaptativa (p.ej., un linfocito T o B) ha reordenado sus genes que codifican el receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (p.ej., TCR o Ig), sus células progenie poseen el mismo reordenamiento del gen que codifica el receptor relacionado con la inmunidad adaptativa, lo que da lugar a una población clonal que puede ser identificada de forma única por la presencia en ella de segmentos del gen V y J (p.ej., que codifican CDR3) reordenado que pueden amplificarse mediante una combinación de pares específica de cebadores oligonucleotídicos específicos de V y J como se describe en la presente memoria.

La práctica de ciertas realizaciones de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales en técnicas de microbiología, biología molecular, bioquímica, genética molecular, biología celular, virología e inmunología que están dentro de los conocimientos de la técnica, y se hace referencia a continuación a algunos de los cuales con el propósito de ilustración. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, p.ej., Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); *Current Protocols in Immunology* (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards y Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie y Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols* (*Methods in Molecular Biology*) (Park, Ed., 3^a Edition, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL

Press, 1986); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir y CC Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols* (*Methods in Molecular Biology*) (Kurstad Turksen, Ed., 2002); *Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization* (*Methods in Molecular Biology*) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); *Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models* (*Methods in Molecular Biology*) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); *Human Embryonic Stem Cell Protocols* (*Methods in Molecular Biology*) (Kurstad Turksen Ed., 2006); *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols* (*Methods in Molecular Biology*) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, y Bruce A. Bunnell Eds., 2008); *Hematopoietic Stem Cell Protocols* (*Methods in Molecular Medicine*) (Christopher A. Klug, y Craig T. Jordan Eds., 2001); *Hematopoietic Stem Cell Protocols* (*Methods in Molecular Biology*) (Kevin D. Bunting Ed., 2008) *Neural Stem Cells: Methods and Protocols* (*Methods in Molecular Biology*) (Leslie P. Weiner Ed., 2008).

VIII. Sistema informático

La FIG. 12 es un diagrama de bloques de alto nivel que ilustra un ejemplo de una computadora 1200 para su uso en el análisis de analitos moleculares, de acuerdo con una realización. Se ilustran al menos un procesador 1202 acoplado a un conjunto de chips 1204. El conjunto de chips 1204 incluye un concentrador de controlador de memoria 1220 y un concentrador de controlador de entrada/salida 1222. Una memoria 1206 y un adaptador de gráficos 1212 están acoplados al concentrador de controlador de memoria 1220, y un dispositivo de visualización 1218 está acoplado al adaptador de gráficos 1212. Un dispositivo de almacenamiento 1208, un teclado 1210, un dispositivo de señalización 1214 y un adaptador de red 1216 están acoplados al concentrador de controlador I/O 122. Otras realizaciones de la computadora tienen 1200 diferentes arquitecturas. Por ejemplo, la memoria 1206 está directamente acoplada al procesador 1202 en algunas realizaciones.

El dispositivo de almacenamiento 1208 es un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio, tal como un disco duro, una memoria de solo lectura de disco compacto (CD-ROM), DVD, o un dispositivo de memoria de estado sólido. La memoria 1206 contiene instrucciones y datos utilizados por el procesador 1202. El dispositivo señalador 1214 se utiliza combinado con el teclado 1210 para introducir datos en el sistema informático 1200. El adaptador gráfico 1212 muestra imágenes y otra información en el dispositivo de visualización 1218. En algunas realizaciones, el dispositivo de visualización 1218 incluye una capacidad de pantalla táctil para recibir entradas y selecciones del usuario. El adaptador de red 1216 acopla el sistema informático 1200 a la red. Algunas realizaciones de la computadora 1020 tienen componentes diferentes y/u otros componentes de los que se muestran en la Figura 12. Por ejemplo, el servidor puede estar formado por servidores blade múltiples y carecer de un dispositivo de visualización, teclado y otros componentes.

La computadora 1200 está adaptada para ejecutar módulos de programas informáticos para proporcionar la funcionalidad descrita en la presente memoria. Según se utiliza en la presente memoria, el término "módulo" se refiere a las instrucciones del programa de computadora y otra lógica utilizada para proporcionar la funcionalidad especificada. Por lo tanto, un módulo puede implementarse en el equipo, el soporte lógico inalterable y/o el soporte lógico. En una realización, los módulos de programa formados por instrucciones de programa de ordenador ejecutables se almacenan en el dispositivo de almacenamiento 1208, se cargan en la memoria 1206 y se ejecutan por el procesador 1202.

En algunas realizaciones, la computadora 1200 está diseñada para ejecutar un algoritmo de aprendizaje automático para predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto de prueba. El sistema 1200 permite que el soporte lógico lleve a cabo acciones para un método implementado por computadora para determinar el estado inmunológico de un sujeto de prueba.

En algunas realizaciones, el método implementado por computadora incluye etapas para almacenar datos para un sujeto de control obtenido de una pluralidad de muestras en diversos puntos temporales, comprendiendo dichos datos para cada muestra, información de secuencia de ácido nucleico para una pluralidad de secuencias de ácido nucleico reordenadas únicas en dicha muestra, una puntuación de diversidad de secuencia de AIR para dicha muestra, una frecuencia de aparición de cada secuencia de ácido nucleico reordenada única en dicha muestra, y un estado inmunológico determinado para dicho sujeto.

El método implementado por computadora incluye etapas para determinar reglas por un procesador para evaluar un estado inmunológico de un sujeto de prueba en base a dichos datos de dicho sujeto de control; introducir datos para un sujeto de prueba para una pluralidad de muestras obtenidas en diversos momentos antes y después de la inmunoterapia, comprendiendo dichos datos para cada muestra, información de secuencia de ácido nucleico para una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos únicas reordenadas en dicha muestra, una puntuación de diversidad de secuencia de AIR para dicha muestra, y una frecuencia de aparición de cada secuencia única de ácido

nucleico reordenada en dicha muestra; y recibir una determinación de un estado inmunológico de dicho sujeto de prueba.

El método implementado por computadora comprende determinar una respuesta pronosticada a la inmunoterapia de dicho sujeto de prueba. En una realización, los datos para dicho sujeto de control comprenden información de la secuencia de ácido nucleico obtenida de dicho sujeto de control en un punto temporal anterior al tratamiento de inmunoterapia. En otra realización, los datos para dicho sujeto de control comprenden información de la secuencia de ácido nucleico obtenida de dicho sujeto de control en un punto temporal después del tratamiento de inmunoterapia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diversidad del receptor de células T después del trasplante de sangre del cordón umbilical como predictor de la mortalidad por infección

Este ejemplo describe un estudio clínico en el que 34 pacientes con tumores malignos hematológicos de alto riesgo fueron sometidos a mieloablación y a continuación trasplantados con unidades dobles de sangre del cordón umbilical (CU). Se tomaron muestras de sangre a los 0, 28, 56, 100, 180 y 360 días del trasplante. En cada punto temporal, se aplicó el ensayo de secuenciación del receptor de células T (TCR) de alto rendimiento Immunoseq™ (Adaptive Biotechnologies Corp., Seattle, WA) a todas las muestras. Los datos de Immunoseq™ se utilizaron para analizar el sistema inmunitario adaptativo a una profundidad sin precedentes, de modo que la expansión y contracción clonal de células T de cientos de miles de clones de células T se rastreó a lo largo del tiempo y se midió directamente la diversidad del repertorio de TCR. Utilizando la capacidad de rastrear clones, se demostró que la reconstitución del sistema inmunitario adaptativo oscilaba salvajemente con un repertorio casi completamente nuevo que aparece al menos una vez al mes tras el trasplante de CU. Los clones más grandes de la extracción de sangre previa cayeron por debajo de niveles detectables en semanas, en contraste con los datos de control donde los clones superiores en pacientes sanos no solo se observaron todos en el siguiente punto temporal, sino que se mantuvieron los clones de frecuencia más alta. También se describe en la presente memoria una demostración de que la diversidad del repertorio de células T es una medida de inmunocompetencia, como una aplicación clínica de la secuenciación de alto rendimiento. De los 34 pacientes, seis pacientes murieron entre el día 100 y el día 360 de causa infecciosa. Tanto en el Día 56 como en el Día 100, la diversidad del repertorio de células T de cada uno de estos seis pacientes fue muy inferior al promedio de los pacientes restantes (valor $P = 0,015$). Dos meses después del trasplante, la diversidad de TCR predijo con precisión el riesgo de muerte debido a una infección.

Los pacientes que se someten a un trasplante de células hematopoyéticas (TCH) tienen un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad temprana después del trasplante por complicaciones infecciosas secundarias al período prolongado de pancitopenia y desregulación inmunológica que resulta del régimen de acondicionamiento. Los receptores de trasplante de sangre del cordón umbilical (TSC) parecen estar aún en mayor riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante temprano; de hecho, un estudio reciente demostró que la mortalidad sin recaída (MSR) es la más alta en los receptores de doble TSC (dTSC) en comparación con los receptores de donantes no relacionados compatibles y no compatibles. Múltiples estudios también han demostrado que la reconstitución inmunitaria después de TSC se retrasa significativamente en comparación con las fuentes de células madre de donantes convencionales (PB y BM), contribuyendo adicionalmente al aumento del riesgo de complicaciones infecciosas potencialmente mortales en esta población de pacientes, y consecuentemente los receptores de TSC tienen una mayor incidencia de infecciones oportunistas (IO) el primer año después del trasplante [6-8]. Complicaciones adicionales son la escasez de ensayos que puedan medir adecuadamente la reconstitución del sistema inmunitario adaptativo, lo que dificulta abordar directamente el papel de la inmunidad retrasada en los resultados del TSC en el contexto de muchas otras variables participantes (p.ej., edad, compatibilidad HLA, intensidad del régimen, terapia inmunosupresora simultánea para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA)). Este ejemplo demuestra la capacidad de medir con mayor precisión la reconstitución inmunitaria funcional en pacientes sometidos a TCH y determinar así el riesgo consiguiente de mortalidad por complicaciones infecciosas, lo que tendrá un impacto positivo en la toma de decisiones médicas directas destinadas a reducir este riesgo, especialmente en el contexto de la terapia inmunosupresora para la prevención y el tratamiento de EICA.

En la sangre de un adulto sano, una célula T individual expresa principalmente uno de millones de TCR diferentes, y un clon es el conjunto de células T que expresan el mismo TCR^{1,2}. Se sabe que la diversidad del repertorio de TCR es necesaria para una protección adecuada contra patógenos foráneos. Esto es evidente en seres humanos con enfermedades de inmunodeficiencia primarias o adquiridas (p.ej., SCIDS, CVID y VIH), en el envejecimiento y después del trasplante de células hematopoyéticas, donde la pérdida de diversidad de TCR se ha visto implicada en el aumento de la morbilidad y la mortalidad por infección que se observa en estos pacientes.

Debido al gran número de clones de células T diferentes en el cuerpo humano, las estimaciones de la diversidad del repertorio de TCR en general se han extrapolado solo de forma indirecta y con baja sensibilidad. Como tales, las

estimaciones convencionales de diversidad son insuficientes para la toma de decisiones clínicas o para la evaluación de la salud del sistema inmunitario adaptativo celular, por ejemplo, como una guía del riesgo del paciente para complicaciones infecciosas relacionadas con un nivel de inmunocompetencia o para determinar el nivel de inmunocompetencia *per se*. Con el fin de abordar estas deficiencias de enfoques anteriores, en la presente memoria se describe la aplicación de un método de alto rendimiento para secuenciar millones de TCR a partir de una sola muestra, permitiendo la determinación directa de la diversidad de un repertorio de células T para medir directamente la salud del sistema inmunitario adaptativo celular. Esta información proporciona una guía para la toma de decisiones clínicas en el contexto de la inmunosupresión adquirida o congénita.

Como se describe en la presente memoria, la diversidad del repertorio de células T proporciona una medición directa de la reconstitución inmunitaria después del TSC mieloablativo. La diversidad de TCR se midió en receptores de TSC en los puntos temporales 28, 56 y 100 días después del trasplante, y se mostró que es predictiva de mortalidad sin recaída (MSR). Además, para comprender mejor la dinámica de la reconstitución inmunitaria, se obtuvieron datos cuantitativos de distribución y diversidad de secuencia de TCR en cada punto temporal y se usaron para rastrear la expansión y contracción de cientos de miles de clones de células T simultáneamente.

Métodos

Diseño del estudio. Los pacientes sometidos a una TSC simple o doble mieloablativa fueron elegibles para este análisis retrospectivo (de los datos recopilados de forma prospectiva). Todos los pacientes proporcionaron el consentimiento firmado para participar en el estudio que fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del estudio.

Pacientes, regímenes de tratamiento y atención de apoyo postrasplante. Los pacientes con neoplasia maligna hematológica, con edad ≤ 45 años, recibieron TSC mieloablativo si carecían de un donante compatible o no relacionado compatible con HLA adecuado. La enfermedad subyacente de los pacientes se clasificó como convencional o de alto riesgo según los criterios descritos anteriormente [17]. Los pacientes recibieron un injerto SC simple o doble según lo determinado por los criterios de prioridad institucionales. Todas las unidades SC fueron tipificadas para HLA a nivel de resolución intermedia para HLA-A y HLA-B y nivel de alelo (alta resolución) para HLA-DRB 1, y se requirió que todas las unidades SC coincidieran con el receptor a ≥ 4 de los 6 loci de HLA. Los pacientes sin muestras de sangre previas al trasplante almacenadas para el análisis de TCR o que murieron antes del día 28 fueron excluidos.

El acondicionamiento mieloablativo consistió en ciclofosfamida (Cy) (120 mg/kg en total), irradiación corporal total (ICT) hiperfraccionada durante 4 días (13,2 Gy en total) y fludarabina (Flu) (75 mg/m² en total) o Treosulfan (Treo) (42 gm/m² en total), Flu (150 mg/m² en total), y una sola fracción de 2 Gy de ICT. Todos los pacientes recibieron inmunoprolifaxis de EICA con ciclosporina-A (CSA) y micofenolato de mofetilo (MMF) a partir del día -3. Todos los pacientes recibieron agentes antimicrobianos y antimicóticos profilácticos convencionales durante el seguimiento [18] y permanecieron en la institución durante un mínimo de 100 días después del trasplante. Los pacientes fueron observados al menos una vez por semana para la evaluación y el seguimiento clínicos. La EICA aguda se calificó utilizando criterios convencionales basados en las etapas de afectación orgánica y se categorizó como grados agudos de EICA 0-IV [16].

Ensayo ImmunoSeq™ y evaluación de la reconstitución inmunitaria posterior al trasplante. Se recogió sangre periférica los días 28, 56, 80-100, 180 y uno y dos años después del trasplante, así como antes del trasplante, para el análisis retrospectivo de la recuperación inmunitaria utilizando el ensayo ImmunoSeq™ para la secuenciación de alto rendimiento de TCR β (TCRB) a partir de ADN genómico extraído de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se realizó la secuenciación de la región CDR3 de genes TCR β de aproximadamente 250.000 PBMC de cada punto temporal en pacientes supervivientes inscritos en la prueba. La región CDR3 de TCR β se definió de acuerdo con la colaboración IMG³, comenzando con la segunda cisteína conservada codificada por la porción 3' del segmento del gen V β y terminando con la fenilalanina conservada codificada por la porción 5' del segmento del gen J β . El número de nucleótidos entre estos codones determinó la longitud y, por lo tanto, el marco de la región CDR3. Las regiones CDR3 de TCR β se amplificaron y secuenciaron utilizando los protocolos descritos anteriormente (Robins et al., 2009 Blood 114, 4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med. 2:47ra64; Robins et al., 2011 J. Immunol. Meth. doi: 10.1016/j.jim.2011.09. 001; Sherwood et al. 2011 Sci. Translat. Med. 3:90ra61; documento U.S.A.N. 13/217.126, documento U.S.A.N. 12/794.507, documento WO/2010/151416, documento WO/2011/106738 (PCT/US2011/026373), documento WO2012/027503 (PCT/US2011/049012). Brevemente, se empleó un método de PCR multiplexado para amplificar todas las posibles secuencias de TCR β genómicas reordenadas utilizando 52 cebadores directos, cada uno específico para un segmento V β de TCR, y 13 cebadores inversos, cada uno específico para un segmento J β de TCR. Se obtuvieron lecturas de secuencia de 60 pb de longitud utilizando el sistema Illumina HiSeq™ (Illumina, Inc., San Diego, CA). Los datos de la secuencia Raw HiSeq™ se pre-procesaron para eliminar errores en la secuencia principal de cada lectura, y para comprimir los datos. Se usó un algoritmo del vecino más próximo para integrar los datos en secuencias únicas fusionando secuencias estrechamente relacionadas, para eliminar los errores tanto de PCR como de secuenciación.

Consideraciones estadísticas Debido a las limitaciones del tamaño de la muestra (34 pacientes, incluidos seis MSR después del día 56), el modelo convencional de riesgos proporcionales de Cox no sería informativo. Dado el tamaño de la muestra, el estudio fue potenciado para probar la hipótesis de que en muestras de sangre de pacientes sometidos a TSC simple o doble mieloablative, una menor diversidad del repertorio de células T del paciente en el día 56 (o Día 100) era predictiva de muerte por MSR. Debido a que la distribución del tamaño del repertorio de TCR entre los pacientes no estaba bien caracterizada, se utilizó una prueba de U de Mann-Whitney no paramétrica de una cola para determinar si los pacientes que finalmente padecían MSR tenían valores más bajos de diversidad del repertorio de TCR. No se pudieron evaluar todos los posibles factores de confusión en un modelo multivariado, pero cada posible factor de confusión se analizó por separado. Se utilizó una prueba exacta de Fisher de dos colas para los datos binarios, y se utilizó una prueba U de Mann-Whitney de dos colas para datos continuos.

Resultados

Cohorte de estudio. Los pacientes (N = 34) y las características del donante se resumen en la Tabla 2. Los pacientes fueron trasplantados para el tratamiento de tumores malignos hematológicos de alto riesgo, principalmente leucemias linfoblásticas o mieloblásticas (N = 26), con 12 pacientes en CR1 y 14 en CR2 o superior. La Tabla 2 resume la demografía, los diagnósticos y el curso clínico del paciente. El régimen de tratamiento para todos los pacientes fue similar durante los primeros 56 días posteriores al trasplante. De los 34 pacientes, 31 tenían EICA, con seis grados III-IV; en consecuencia, todos los pacientes fueron tratados profilácticamente con corticosteroides.

Tabla 2: Características de la cohorte de 34 pacientes incluidos en el análisis

Edad del Paciente, Mediana de Años (intervalo)	27 (1 - 58)
Seguimiento, Mediana de años (intervalo)	369 (34 - 1657)
Mediana del peso del receptor en kg (intervalo)	75,3 (22,5 - 114,4)
Enfermedad, Núm. (%)	
ALL	16 (47)
AML	10 (29)
MDS/MPD	6 (18)
Otras	2 (6)
Enfermedad Residual Mínima	17 (50)
Tipo de Trasplante, Núm. (%)	
FLU/CY/TBI 1320 cGy †	24 (71)
TREO/FLU/TBI 200 cGy ††	10 (29)
Profilaxis EICA, Núm. (%)	
Ciclosporina/Micofenolato	34 (100)
Estado Serológico CMV del Receptor, Núm. (%)	
Positivo	22 /64
Negativo	12 (36)
Disparidad HLA, Núm. (%) §	
4/6	20 (60)
5/6	11 (31)
6/6	3 (9)
Número de unidades de CS infundidas por paciente	
1	2 (6)
2	32 (94)
EICA Aguda	
Grado II o menos	25 (73)
Grado III-IV	6 (18)

En la Tabla 2, ALL = leucemia linfoblástica aguda; AML = leucemia mieloide aguda; MDS/MPD = enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; FLU = fludarabina; CY = citoxan; ICT = irradiación corporal total; TREO = treosulfan; EICA = enfermedad de injerto contra anfitrión; CMV = citomegalovirus; SC = sangre del cordón umbilical; RC = remisión completa; ERM = Enfermedad residual mínima. † = Fludarabina 75 mg/m², Citoxan 120 mg/kg, ICT 1320 cGy. †† = Treosulfan 42 gm/m², Fludarabina 150 mg/m², ICT 200 cGy. § = compatibilidad HLA refleja la menor compatibilidad HLA de las 2 unidades.

Recopilación de muestras. Todos los pacientes incluidos en este estudio recibieron extracciones de sangre antes y después del trasplante los días + 28, 56, 80-100, 180 y al año para los que sobrevivieron. Se enviaron alícuotas de más de un millón de PBMC de cada extracción de sangre a Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA) para la secuenciación profunda del ADN de TCR utilizando el ensayo ImmunoSeq™. Se introdujo una cantidad fija de ADN en el ensayo ImmunoSeq™ para permitir la comparación directa entre las muestras. Además, se evaluaron los

porcentajes y números absolutos de células T, B y NK, y los niveles de inmunoglobulina para cada muestra.

Dinámica de reconstitución inmunitaria del sistema inmunitario adaptativo celular. Dada la enorme cantidad de reordenamientos potenciales para los genes de TCR, se dio a entender que cada clon tenía una secuencia de TCR prácticamente única. Estas secuencias fueron identificadores moleculares para cada clon, por lo que la expansión y la contracción clonal podrían rastrearse a lo largo del tiempo, además de determinar las propiedades de la distribución clonal en cada punto temporal fijo.

Solapamiento con el repertorio de pretratamiento. Usando la secuencia de TCR como etiqueta molecular, se rastrearon cientos de miles de clones de células T a lo largo del tiempo. Los 34 pacientes se sometieron a un procedimiento mieloablato antes del trasplante, por lo que se asumió que un subconjunto muy limitado del repertorio de pretratamiento persistiría después de la mieloablación. Sorprendentemente, la proporción de clones restantes después del tratamiento mieloablato varió ampliamente; en tres de los 34 pacientes, 10% o más del repertorio de TCR el día 180 se obtuvo del sistema inmunitario previo al tratamiento (anfitrión).

Sin embargo, en la mayoría de los pacientes, pocos o ningún clon preexistente permanecieron después del trasplante. La Figura 1 muestra la proporción de repertorio de TCR portado después del trasplante entre pacientes y puntos temporales. La fracción de clones previos al trasplante persistentes después del trasplante fue estable a lo largo del tiempo, como lo demuestra una fuerte correlación entre la proporción de clones previos al trasplante observados en cada punto temporal posterior al trasplante (p.ej., $r = 0,9$ entre la proporción de remanentes el día 28 y el día 100), y para la mayoría de los pacientes fue de aproximadamente 0,001, lo que indica que, de promedio, aproximadamente una célula T por cada mil fue parte de un clon observado antes del trasplante. El análisis de los clones utilizando el ensayo de secuenciación de TCR de alto rendimiento Immunoseq™ produjo resultados diferentes a los del microquimerismo medido por métodos previos. El procedimiento de reordenamiento de TCR hizo improbable que la identidad clonal sustancial a nivel de ADN pudiera observarse por casualidad en ausencia de células T anfitrionas supervivientes. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que el método de secuenciación de TCR de alta calidad Immunoseq™ detectó microquimerismo en algunos pacientes que previamente se pensaba que no albergaban ninguna célula T del anfitrión.

Seguimiento de clones después del trasplante. Con el fin de evaluar la estabilidad del sistema inmunitario adaptativo reconstituyente a lo largo del tiempo, se investigó la persistencia de clones de TCR encontrados en puntos temporales tempranos en muestras posteriores. Utilizando solo pacientes con muestras recolectadas y secuenciadas a los 28, 56, 100, 180 y 365 días del trasplante, los 10 clones superiores de TCR se determinaron por frecuencia en cada paciente en los puntos temporales de 28, 56, 100 y 180 días y las secuencias de cada uno de estos clones se clasificaron como persistentes o transitorias. Se consideró que uno de los diez clones superiores de TCR (con cualquier frecuencia) en un punto temporal posterior era persistente, y los clones que nunca se observaron nuevamente en las muestras del mismo paciente se consideraron transitorios.

La Figura 2 muestra la mediana del número de clones transitorios de TCR en los 10 superiores, en cada punto temporal posterior al trasplante. A los 28 y 56 días del trasplante, se observaron repertorios de TCR dinámicos y altamente inestables en los que muchos clones de TCR que estaban presentes a alta frecuencia en una muestra temprana nunca se volvieron a observar posteriormente. A partir de los 100 días posteriores al trasplante, este patrón comenzó a disminuir y los repertorios de TCR de los pacientes se volvieron más estables. Para confirmar que este patrón era altamente inusual, las muestras de PBMC se secuenciaron a partir de cuatro sujetos de control sanos durante el mismo período de tiempo. La mediana del número de clones de TCR transitorios en los 10 superiores fue 0 para estos controles sanos en cada punto temporal, confirmando la suposición de que la alta prevalencia de clones de TCR transitorios después del trasplante era indicativa de un repertorio de TCR inusualmente inestable. Se ha demostrado previamente que prevalecía una alta tasa de apoptosis en las células T después del trasplante de células madre.⁴ Aquí, se demostró que este proceso apoptótico no era aleatorio con respecto a las células T que constituían un clon, sino que se producía como una rápida expansión y contracción de clones completos.

Cambios en la diversidad clonal de las células T después del trasplante. La distribución de clones de células T se utilizó para estimar el límite inferior en la diversidad en la sangre completa utilizando un análisis de especies no observadas (Robins et al., 2009 Blood 114, 4099). La estimación de diversidad se calculó para cada punto temporal.

La figura 3 presenta un resumen de la reconstitución inmunitaria medida por el repertorio de TCR durante el primer año postrasplante en esta cohorte. La media geométrica de la métrica de diversidad se muestra en cada punto temporal y es ilustrativa del curso general de reconstitución. Los regímenes de acondicionamiento mieloablato dieron como resultado en una gran caída en la diversidad de TCR de los valores previos al trasplante. La diversidad disminuyó desde los valores previos al trasplante hasta el día 28, que estuvo cerca del tiempo promedio para el injerto en la mayoría de los pacientes (el tiempo de injerto varió de 7 a 45 días con una media de 24). En esta cohorte de pacientes, la diversidad de TCR alcanzó su valor más bajo a los 56 días después del trasplante antes de comenzar una lenta recuperación hasta un aumento sustancial en la diversidad del repertorio de TCR un año

después del trasplante. Sin embargo, a pesar de esta recuperación, los repertorios de TCR pacientes todavía tenían una diversidad mucho menor que los repertorios sanos al final del estudio de un año.

Algunos de los cambios observados en la diversidad de TCR se pueden explicar por las variaciones en los recuentos absolutos de células T. En el extremo, si un paciente tenía muy pocas células T, la diversidad de TCR de dicho paciente era limitada. El día 56, varios de los pacientes tenían recuentos muy bajos de CD3 y, por lo tanto, baja diversidad. Sin embargo, la correlación entre la diversidad y el recuento absoluto de CD3 fue débil para la cohorte restante ($r = 0,05$, Figura 5). Por ejemplo, hubo pacientes en esta cohorte que tenían recuentos absolutos de CD3 más altos pero poca diversidad, secundaria al repertorio de TCR altamente oligoclonal (un pequeño número de clones muy expandidos).

Diversidad de TCR como predictor de mortalidad por infección. De los 34 pacientes en el presente estudio, 15 murieron el primer año después del trasplante. La única causa de muerte en 6 de estos pacientes fue la enfermedad recidivante, con muerte principalmente por causas infecciosas en los nueve pacientes restantes. Las complicaciones infecciosas posteriores al trasplante no fueron inesperadas o poco comunes. Sin embargo, antes de la presente descripción, no había una medida concreta que tuviera un fuerte valor predictivo para evaluar qué pacientes tenían un mayor riesgo de morir por infecciones potencialmente mortales después del trasplante. Dicha capacidad predictiva puede cambiar el tratamiento médico de los pacientes después del trasplante de células madre. Por lo tanto, se analizó la presente medición directa de la diversidad de TCR por su potencial como un predictor informativo de la capacidad del sistema inmunitario adaptativo para combatir las infecciones. La diversidad del repertorio de células T en los primeros momentos después del trasplante (Día 56 y Día 100) fue de hecho un fuerte predictor de mortalidad por causas sin recaída. La medición de la diversidad de células T pretrasplante tendió a un valor predictivo, pero no alcanzó significación estadística en esta cohorte. Los datos del día 28 también carecían de un valor predictivo significativo, presumiblemente debido al hecho de que la diversidad del repertorio de TCR en este momento estaba probablemente dominada por las células T del injerto que se diferenciaron antes de la infusión y por lo tanto no reflejaban la verdadera reconstitución inmunitaria. Sin embargo, los pacientes que eventualmente murieron por causas sin recaída más allá del día 100 mostraron una diversidad de TCR significativamente reducida tan pronto como 56 días después del trasplante (Véase la Figura 4). Los datos de los pacientes que murieron por MSR (mortalidad sin recaída) arrojaron sistemáticamente una menor estimación de la diversidad de TCR en cada punto temporal medido, pero esta relación solo alcanzó significación estadística (calculada mediante una prueba U de Mann-Whitney de una cola, $p = 0,0153$) el día 56, cuando la reconstitución inmunitaria de los pacientes había comenzado plenamente después del injerto. Una diferencia significativa en la diversidad de TCR de pacientes que morirían de MSR persistió a los 100 días postrasplante ($p = 0,0153$). Vale la pena señalar que cinco de los seis pacientes que estaban vivos el día 56 pero que finalmente fallecieron por causas infecciosas sobrevivieron hasta el día 180, lo que indica que la identificación clínica de alto riesgo entre los 28 y 56 días posteriores al trasplante permitiría suficiente tiempo para la intervención clínica profiláctica.

Otros factores como predictores de mortalidad por infección. La recuperación inmunitaria posterior al trasplante está influenciada por muchos factores, el más significativo es el uso de la terapia inmunosupresora (TIS) para la prevención y el tratamiento de la EICA, en particular el uso de esteroides. Con el fin de determinar la utilidad de la medición directa de la diversidad de TCR para predecir el riesgo de infección, se evaluaron los roles de los posibles factores de confusión, centrándose en las diferencias en el tratamiento con TIS y los recuentos de CD3 absolutos totales. Hubo 27 pacientes que desarrollaron EICH en una mediana de 23 días después del trasplante. Estos pacientes fueron tratados inicialmente con prednisona.

Otro importante factor de confusión en la correlación de las mediciones de diversidad de TCR con el resultado clínico fue la recuperación de las células CD3+ totales. Una correlación de la diversidad de TCR con el resultado clínico tendría utilidad limitada si simplemente reiterara un resultado obtenido contando células T totales en sangre periférica. La cinética de recuperación de células T medida por las células CD3+ absolutas/ μl se midió en la sangre periférica al mismo tiempo que la medición de la diversidad de TCR. La Figura 5 muestra que el recuento absoluto de CD3+ se correlacionó muy débilmente con la diversidad estimada del repertorio de TCR, lo que indica que estas dos métricas fueron esencialmente independientes. Esta correlación fue impulsada principalmente por muestras cercanas al límite inferior de recuentos absolutos de células CD3+, ya que los recuentos totales de células T sustancialmente deprimidos necesariamente darían como resultado la determinación de un repertorio de TCR que tendría baja diversidad. Sin embargo, a mayores recuentos absolutos de CD3+, seguía siendo posible que una población de células T oligoclonales tuviera, sin embargo, una diversidad de TCR muy baja y, por lo tanto, no habría proporcionado protección contra patógenos oportunistas.

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos al analizar los recuentos de CD3+ junto con la métrica de diversidad de TCR, utilizando datos del día 56 y 100 después del trasplante. En la Tabla 3, cada muestra se asignó a un grupo alto (en o por encima de la mediana) o bajo (por debajo de la mediana) para ambas métricas, y se comparó el número de muertes por MSR que caen en cada categoría (de las seis que sobrevivieron hasta día 56). Además, la Tabla 3 presenta los resultados de un valor de p de una cola para una prueba U de Mann-Whitney de la hipótesis de que los pacientes que mueren de MSR tienden a tener valores más bajos de recuentos absolutos de CD3+ o diversidad de

TCR. La métrica de diversidad de TCR fue un predictor del resultado clínico tan pronto como el día 56 después del trasplante, mientras que los recuentos absolutos de CD3+ no fueron informativos en ese momento. Además, la diversidad se correlacionó más significativamente con el resultado clínico que los recuentos de CD3+ a los 100 días después del trasplante. También se analizaron los repertorios de los seis pacientes que murieron por recaída solo. Ni el recuento absoluto de CD3 ni la diversidad del repertorio de TCR predijeron la muerte por recaída en esta cohorte.

Tabla 3. Comparación de los recuentos de CD3+ (células T totales) y el tamaño del repertorio de TCR estimado los días 56 y 100 después del trasplante.

Mortalidad sin recaída, recuentos de CD3+ v. Tamaño del repertorio de TCR			
Células CD3+/cm ³	Alto	Bajo	valor p
56 días después del trasplante	3/15	3/14	0,139
100 días después del trasplante	1/15	5/14	0,021
Tamaño estimado del repertorio de TCR	Alto	Bajo	valor p
56 días después del trasplante	1/15	5/14	0,015
100 días después del trasplante	1/15	5/14	0,015

Los números para cada métrica representan el número de muertes sin recaídas (n = 6) que caen en las categorías alta (en o por encima de la mediana) o baja (por debajo de la mediana). A la derecha se muestra el valor p de una prueba U de Mann-Whitney de una cola. Los recuentos totales de células T no fueron predictivos del resultado clínico a los 56 días del trasplante, y fueron un predictor más débil del resultado clínico que el tamaño del repertorio de TCR estimado a los 100 días pos-trasplante.

Además del tratamiento de la EICA y los recuentos totales de CD3+, la correlación de la medición de la diversidad de TCR con el resultado clínico también podría haber sido impulsada por cualquier cantidad de otras variables. La Tabla 3 presenta una comparación de los 6 pacientes que vivieron hasta el día 56 pero finalmente murieron por causas sin recaída frente a los otros 25 pacientes que estaban vivos el día 56. Se evaluaron varias medidas entre estos grupos de la misma manera que la medida de diversidad de TCR (se utilizó la prueba exacta de Fisher para datos categóricos y una prueba U de Mann-Whitney para datos continuos). Ninguna alcanzó significación estadística en esta cohorte, pareciendo que muchas no están correlacionadas con MSR. Los 6 pacientes con MSR fueron algo mayores que los demás (p = 0,051), lo que puede indicar una débil correlación con la MSR, actuando o no la diversidad de TCR como intermediario. Estos resultados indicaron que, en esta cohorte, en la que la diversidad del repertorio de TCR era un predictor estadísticamente significativo de mortalidad sin recaída, la mortalidad sin recaída no podía predecirse fácilmente por ninguna de las otras variables que examinaron los autores de la presente invención.

Este estudio utilizó una medida de reconstitución inmunitaria basada en secuencia de TCR directa que se correlaciona con resultados clínicos adversos, en particular el mayor riesgo de complicaciones infecciosas en pacientes sometidos a trasplante de sangre de cordón mieloablativo. Los receptores de TSC tenían un mayor riesgo de retraso de la recuperación hematopoyética e inmunitaria, y la mejoría en la supervivencia global para estos pacientes dependía de estrategias que pudieran mejorar la cinética de la recuperación de los neutrófilos y el sistema inmunitario. Las medidas directas de recuperación hematopoyética son simples y están bien establecidas al obtener recuentos sanguíneos completos. Sin embargo, ha faltado una medida directa de la recuperación del sistema inmunitario, especialmente con respecto a la función de las células T en oposición al número de células T, antes de la presente descripción. Por lo tanto, existen normas de cuidado con respecto a los medicamentos para la prevención y el tratamiento de la EICA. Sin embargo, no todos los pacientes tienen el mismo riesgo de desarrollar complicaciones después del trasplante y no todos los pacientes responderán por igual a las intervenciones médicas. Nuevas medidas de recuperación inmunitaria, como se describe en la presente memoria utilizando el ensayo ImmunoSeq™, permiten adaptar el tratamiento médico de pacientes individuales no solo con respecto a la profilaxis antimicrobiana, sino también con respecto al manejo de TSI si se identifica que los pacientes tienen un mayor riesgo de MSR de infecciones. Una medida directa de este riesgo cambiaría drásticamente la gestión médica.

Aquí, se demostró una correlación significativa entre la medición de la reconstitución inmunitaria mediante la secuenciación de receptores de células T de alto rendimiento y la mortalidad sin recaída en una cohorte de 34 pacientes. Compatible con este resultado es la comprensión de que la reconstitución inmunitaria retardada, medida por la baja diversidad de reordenamientos de TCR en las células T circulantes, pone a los pacientes en alto riesgo de complicaciones por enfermedades infecciosas. Estos resultados no pueden ser trivialmente replicados por los recuentos de células CD3+ o por cualquiera de diversas otras variables que se midieron en la cohorte pequeña. Los presentes resultados se obtuvieron analizando el compartimento de células T completo, aunque se sabe que la cinética y las implicaciones clínicas de la reconstitución inmunitaria difieren entre subconjuntos de células T (p.ej.,

células T CD4+ v. CD8+).⁵ Por lo tanto, la investigación de la reconstitución de subconjuntos de células T utilizando HTS puede proporcionar información adicional.

5 Los presentes resultados demostraron que la alta diversidad de TCR se asociaba con mejores resultados en muestras de sangre tomadas de pacientes sometidos a trasplante de sangre de cordón mieloablato. Como tal, la diversidad de TCR es una medida muy útil para estratificar a los pacientes poco después del trasplante en función del riesgo de futuras complicaciones infecciosas. Por lo tanto, si un paciente no ha alcanzado un nivel umbral de diversidad de TCR entre dos y tres meses después del trasplante, ese paciente puede beneficiarse al abandonar la TIS más rápidamente en la medida en la que se tolere, y/o puede tratarse más agresivamente con profilaxis antimicrobiana, y/o puede mantenerse en observación durante un período más prolongado hasta que la reconstitución inmunitaria haya alcanzado los niveles adecuados. Dado que la disminución de la diversidad de TCR precedió a la mortalidad sin recaída durante varios meses en el presente estudio, esta medida debería permitir suficiente tiempo para tales medidas profilácticas. Además de identificar pacientes de alto riesgo, la medida robusta de la reconstitución inmunitaria descrita en este momento también puede ayudar a determinar cuándo los pacientes 10 lograron una reconstitución inmunitaria suficiente para interrumpir el tratamiento profiláctico, en lugar de administrar un régimen de la misma duración a cada paciente. 15

Ejemplo 2: Distribución del repertorio de células T como predictor de los respondedores a la inmunoterapia

20 La diversidad y distribución del receptor de células T se determinaron como se describió anteriormente en muestras de sangre y tumores sólidos, obtenidas antes y después del inicio de la inmunoterapia, de pacientes con cáncer que eran candidatos a recibir un inhibidor de CTLA-4 o un inhibidor de PD-1. La eficacia de cada agente de inmunoterapia se evaluó de forma independiente mediante criterios clínicos oncológicos convencionales (clasificando a los sujetos como respondedores o no respondedores) y se demostró que la capacidad relativa del sistema inmunitario adaptativo de cada paciente para responder de forma beneficiosa a la inmunoterapia se predijo mediante un cálculo de entropía modificado de la distribución del repertorio de TCR antes de la inmunoterapia. 25

30 Antes del inicio de la inmunoterapia (mAb anti-CTLA-4), los respondedores exhibieron una diversidad de secuencias de TCR relativamente mayor en linfocitos presentes en sangre y muestras tumorales y una mayor entropía de distribución de secuencia de TCR, observada como un perfil de distribución de TCR más plano, en comparación con los no respondedores.

35 Como se muestra en la Figura 6, los resultados de secuenciar cuantitativamente el ADN que codifica TCR de muestras de sangre muestran que una baja clonalidad del repertorio de TCR, indicativa de una mayor diversidad de secuencias de TCR y una mayor entropía de distribución de secuencias de TCR, era un predictor del estado respondedor a la inmunoterapia (mAb anti-CTLA-4). La Figura 6 también muestra que la alta clonalidad del repertorio de TCR, indicativa de una menor diversidad de secuencia de TCR y una menor entropía de distribución de secuencia de TCR, fue un factor de predicción del estado no respondedor a la inmunoterapia.

40 La Figura 7 muestra los resultados de la secuenciación cuantitativa del ADN que codifica TCR a partir de muestras de tejido tumoral. La Figura 7 ilustra un aumento en la clonalidad de TCR en linfocitos presentes en muestras de tejido tumoral sólido obtenidas después de la administración de inmunoterapia (mAb anti-CTLA-4) (DT) en relación con el nivel de clonalidad de TCR detectado en muestras tumorales obtenidas antes de la inmunoterapia (AT). La muestra se obtuvo a partir de un sujeto respondedor. La Figura 7 demuestra que el tratamiento de inmunoterapia tuvo un impacto notable en el repertorio de células T del sujeto. 45

50 En la Figura 8, la dinámica de las representaciones clonales de TCR individuales se investigó como una función del tiempo en muestras de sangre y en muestras tumorales obtenidas antes de la inmunoterapia (tratamiento con ipilimumab (un mAb anti-CTLA-4)) y después de la inmunoterapia. Los puntos temporales A, B y C son puntos temporales tomados de muestras de sangre. El punto temporal A es anterior a la inmunoterapia, y los puntos temporales B y C son dos puntos temporales después de comenzar el régimen de inmunoterapia. Los puntos temporales AT, BT, CT son pares de muestras tumorales (AT es antes de la inmunoterapia, y los puntos temporales BT y CT son dos puntos temporales después de comenzar el régimen de inmunoterapia). Cada línea de puntos de datos sigue un solo clon. La flecha en el punto temporal CT indica un único clon que no fue notable en su abundancia relativa antes de la terapia, pero cuya frecuencia relativa aumentó en las muestras tumorales después de la terapia, para representar 10% del repertorio en el momento CT. La abundancia relativa de dos clones (X1 y X2) que representaban 7-9% de secuencias de TCR en sangre en los puntos temporales A y B posteriormente disminuyeron significativamente, mientras que varias secuencias de receptor de células T que inicialmente tenían frecuencias muy bajas en sangre aumentaron significativamente en el punto temporal C. Los tres clones más numerosos en las muestras tumorales en el punto temporal A disminuyeron significativamente en su representación 60 relativa posterior, como se determinó en los puntos temporales posteriores.

En un estudio separado con el mismo agente inmunoterapéutico utilizado para las Figuras 6-8, se determinaron la diversidad de secuencias de TCR y las entropías de distribución en muestras de sangre obtenidas antes del inicio de

la inmunoterapia (puntos temporales A) y después (puntos temporales B y C). Los resultados se resumen en la Figura 9, que muestra la dinámica de representaciones clonales de TCR individuales a lo largo del tiempo. La flecha indica un único clon que no estuvo altamente representado antes de la inmunoterapia, pero cuya preponderancia aumentó después de la terapia para representar más de 10% del repertorio en el punto temporal C.

5 Como se muestra en las Figuras 8 y 9, un efecto secundario de un tratamiento de inmunoterapia puede ser una proliferación de un solo clon o de pocos clones en la sangre de un sujeto, de manera que la frecuencia de aparición del único clon o de pocos clones es estadísticamente significativamente mayor que las frecuencias de aparición de los otros clones en el repertorio. En algunas realizaciones, se determina que la frecuencia de aparición de un único clon es mayor que un umbral predeterminado, tal como mayor que el cuartil superior de las frecuencias de aparición de los clones en el repertorio. En las Figuras 8 y 9, el único clon que representa más de 10% del repertorio después del tratamiento con inmunoterapia es estadísticamente significativamente diferente y es un indicador de respuesta deficiente del sujeto. Por ejemplo, una frecuencia de clon que es inferior a 1% en la frecuencia de aparición antes de la inmunoterapia y los picos en la frecuencia a más del 1% de la frecuencia de aparición en el repertorio es un indicador de mal resultado en el sujeto. Esto presenta una situación de expansión de un solo clon (alta clonalidad) y baja diversidad del repertorio, lo que conduce a una respuesta y resultados deficientes. En situaciones donde un clon o pocos clones exhiben una frecuencia de aparición estadísticamente mayor en comparación con el repertorio, se pueden hacer ajustes al tratamiento del sujeto, incluido el uso de corticosteroides o inmunosupresores para disminuir la respuesta inmunitaria (p.ej., inflamación, etc.).

20 Ejemplo 3: Clonalidad del receptor de células T como predictor de la respuesta a la inmunoterapia

En otro ejemplo, se realizó un estudio utilizando secuenciación de alto rendimiento del locus del gen TCRB para caracterizar el repertorio de linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) en pacientes con melanoma metastásico en estadio tardío sometidos a inmunoterapia (tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1). El objetivo del estudio fue determinar si la caracterización del repertorio intratumoral de células T mediante secuenciación de alto rendimiento es suficiente para predecir el resultado clínico (es decir, respuesta al fármaco) utilizando perfiles inmunológicos (mediante secuenciación TCRB) de una biopsia tumoral previa al tratamiento.

30 La diversidad y distribución del receptor de células T se determinaron como se describió anteriormente en muestras de tumores sólidos, obtenidas antes del inicio de la inmunoterapia, a partir de pacientes con melanoma metastásico que eran candidatos para recibir un inhibidor de PD-1 (Lambrolizumab). La PD-1 (proteína de muerte celular programada 1) es una proteína de membrana de tipo 1, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, y se cree que desempeña un papel en la diferenciación de células B.

35 La eficacia del tratamiento de inmunoterapia se evaluó independientemente mediante criterios clínicos oncológicos convencionales. Los sujetos se caracterizaron de la siguiente manera: respondedores (separados en "respuesta parcial" que indica una reducción en la carga tumoral del paciente y "enfermedad estable" que indica falta de progresión sin disminución de la carga tumoral) o no respondedores (progresión continuada de la enfermedad). La capacidad relativa del sistema inmunitario adaptativo de cada paciente para responder de manera beneficiosa a la inmunoterapia se predijo mediante un cálculo de entropía modificado de la distribución del repertorio de TCR antes de la inmunoterapia.

45 Se utilizó un cálculo de entropía modificado ("clonalidad") en el que la entropía de distribución de secuencias de TCR de cada muestra tumoral se normalizó al intervalo (0 - 1) teniendo en cuenta el número de reordenamientos de TCR únicos observados en esa muestra tumoral y se invirtió de forma que una alta entropía normalizada se convierte en una baja clonalidad y viceversa. Antes del inicio de la inmunoterapia, los pacientes que responderían a la inmunoterapia mostraron una clonalidad de distribución de la secuencia de TCR relativamente más alta en los linfocitos presentes en las muestras de biopsia tumoral, en comparación con los que no respondieron.

50 Brevemente, se prepararon muestras de tejido congelado de biopsias de lesiones malignas para 12 pacientes antes de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 (administrado como un agente inmunoterapéutico para pacientes con melanoma metastásico). También se recolectaron muestras de tejido (biopsias de lesiones de melanoma) durante y después de la inmunoterapia anti-PD-1. Posteriormente, se extrajo ADN genómico de estas muestras de tejido. Usando la plataforma ImmunoSEQ para la secuenciación de TCRB de alto rendimiento, se caracterizó el repertorio de los LIT en cada muestra para determinar (1) la extensión de la infiltración intratumoral de linfocitos, y (2) la estructura clonal del repertorio intratumoral de linfocitos.

60 De los 12 pacientes estudiados, 8 respondieron al tratamiento (enfermedad estable o respuesta parcial), mientras que 4 no respondieron (progresión de la enfermedad). Los resultados de secuenciar cuantitativamente el ADN que codifica TCR a partir de biopsias de tejido tumoral congelado se muestran en la Figura 10A.

La Figura 10A muestra que la alta clonalidad del repertorio de TCR intratumoral, indicativa de un repertorio de TCR caracterizado por un pequeño número de clones de células T altamente expandidos (baja diversidad de secuencia de AIR), fue un factor predictivo estadísticamente significativo del estado de respuesta a la inmunoterapia en este

estudio retrospectivo de una Cohorte de 12 pacientes. La media y la desviación típica de la clonalidad del repertorio de TCR (una métrica modificada basada en la entropía de distribución de secuencias de TCR normalizada al intervalo (0 - 1) al contar el número de secuencias únicas de TCR presentes en cada muestra) se presentan de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia. La clonalidad de la distribución de la secuencia de TCR fue significativamente mayor en los 8 pacientes que respondieron en comparación con los 4 pacientes que no respondieron ($p = 0,015$ mediante la prueba t de dos colas no pareada).

En la Figura 10B, se evaluó la infiltración de células T en la cohorte de 12 pacientes. La media y la desviación típica de la infiltración de células T (medida como reordenamientos del receptor de células T por genoma diploide) se presentan de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia. Los niveles de infiltración de linfocitos T fueron más altos en los 8 pacientes que respondieron en comparación con los 4 pacientes que no respondieron ($p = 0,056$ mediante prueba t de dos colas no pareada).

Los datos de la primera cohorte (12 pacientes con biopsias tumorales previas y posteriores al tratamiento) sugirieron que dos factores de las biopsias tumorales previas al tratamiento (bajos niveles de infiltración de células T y un repertorio de células T infiltrante muy diverso) se asociaron con la falta de respuesta al tratamiento (es decir, estado de enfermedad progresiva en oposición a estable o mejora; Figs. 10A, 10B).

En un segundo estudio, se evaluó una cohorte confirmatoria de 13 pacientes adicionales, en la que solo se secuenciaron las biopsias tumorales previas al tratamiento. En la Figura 11A, la clonalidad del repertorio de TCR y la respuesta a la inmunoterapia se evaluaron para las cohortes 1, 2 y la cohorte combinada. La media y la desviación típica de la clonalidad del repertorio de TCR (una métrica modificada basada en la entropía de la distribución de secuencias de TCR normalizada en el intervalo (0 - 1) teniendo en cuenta número de secuencias únicas de TCR presentes en cada muestra) se muestra de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia en la cohorte 1 (cuadrado simple), la cohorte 2 (cuadrado de rayas oblicuas) y en los datos combinados (cuadrado de rayas rectas). La clonalidad en la distribución de la secuencia de TCR fue mayor en los pacientes que respondieron en comparación con los pacientes que no respondieron ($p = 0,00065$ en los datos combinados mediante una prueba t de dos colas no pareada).

En la Figura 11B, se evaluó la infiltración de células T en los grupos de pacientes. La media y la desviación típica de la infiltración de células T (medida como reordenamientos del receptor de células T por genoma diploide) se muestra de acuerdo con la respuesta a la inmunoterapia en la cohorte 1 (cuadrado simple), la cohorte 2 (cuadrado de rayas inclinadas) y en los datos combinados (cuadrado de rayas rectas). Los niveles de infiltración de linfocitos T son más altos en los pacientes que respondieron en comparación con los pacientes que no respondieron ($p = 0,0015$ en los datos combinados mediante una prueba t de dos colas no pareada).

La Figura 11C muestra una comparación del intervalo de cada paciente (de un total de 25 pacientes) para el nivel de infiltración de células T y la clonalidad del repertorio de TCR. En comparación con los respondedores (rombo), los no respondedores (círculo) tienden simultáneamente hacia una baja clonalidad del repertorio de TCR y niveles bajos de linfocitos T infiltrantes.

Los datos de la segunda cohorte de 13 pacientes estuvieron en concordancia casi perfecta con los datos iniciales de la cohorte de 12 pacientes (Figuras 11A-C). Sin embargo, estos datos demuestran que los resultados de secuenciar los productos infiltrados de células T en biopsias de tumores de melanoma antes de la inmunoterapia están altamente correlacionados con la respuesta del paciente a la inmunoterapia, proporcionando un biomarcador potencial para predecir el efecto de la inmunoterapia paciente por paciente.

Lista de referencias

1. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 351:2265-2275.
2. Wagner JE, Barker JN, Defor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment related-mortality and survival. *Blood* 2001; 100:1611-1618.
3. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97:2962-2971.
4. Grewal SS, Barker JN, Wagner JE, et al. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003; 101:4233-4244.
5. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 351:2276-2285.
6. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host-disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; 96:2703-2711.
7. Barker JN, Hough RE, van Burik JA, et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:362-37.

8. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyns H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in paediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leukocyte Biol.* Prepublished on March 2nd, 2011.
9. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood.* 2007;110(8):3064-3070.
- 5 10. Cornetta K, Laughlin M, Carter S, et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2005; 11:149-160.
- 10 11. Long GD, Laughlin M, Madan B, et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2003; 9:772-780.
12. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clinical immunology.* 2008;127: 286-297.
13. Sauter C, Abboud M, Barker JN, et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2011; 17:1460-71.
- 15 14. Guérin-El Khourouj V, Dalle JH, Pédrón B, et al. Quantitative and Qualitative CD4 T Cell Immune Responses Related to Adenovirus DNAemia in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17:476-85.
- 15 15. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* Prepublished on January 1, 2011.
- 20 16. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94:1465-1470.
17. Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M, et al. Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. *Blood* 2009; 113:2888-2894.
- 25 18. Nakamae H, Kirby KA, Sandmaier BM, et al. Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15:694-703.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir una respuesta de un sujeto de prueba a una inmunoterapia, que comprende:

- 5 (a) obtener información de secuencias de ácido nucleico de una o más muestras de tumor sólido obtenidas del sujeto de prueba, en donde las una o más muestras de tumores sólidos comprenden ácidos nucleicos de células linfoides del sujeto de prueba, y en donde la información de secuencia de ácido nucleico comprende secuencias para una pluralidad de secuencias de ácido nucleico reordenadas únicas, codificando cada una un polipéptido receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR);
- 10 (b) cuantificar una puntuación de diversidad de secuencia de AIR para las una o más muestras de tumor sólido basándose en el número total de secuencias de ADN reordenadas únicas en las una o más muestras de tumor sólido, en donde la puntuación de diversidad de secuencia de AIR se cuantifica utilizando la información de secuencia de ácido nucleico;
- 15 (c) cuantificar una puntuación de distribución de la secuencia de AIR para las una o más muestras de tumor sólido calculando la frecuencia de aparición de una pluralidad de secuencias de ADN reordenadas únicas en las una o más muestras de tumor sólido, en donde la puntuación de distribución de la secuencia de AIR se cuantifica utilizando la información de secuencia de ácido nucleico;
- (d) determinar una puntuación de calificación del sujeto de prueba para el sujeto de prueba en base a la puntuación de diversidad de secuencia de AIR y dicha puntuación de distribución de secuencia de AIR; y
- 20 (e) predecir una respuesta del sujeto de prueba a la inmunoterapia en base a la puntuación de calificación del sujeto, en donde una puntuación de calificación del sujeto de prueba **caracterizada por** una baja puntuación de diversidad de secuencia y una baja puntuación de distribución de secuencia AIR es indicativa de una elevada clonalidad de TCR y es predictiva de una respuesta positiva a dicha inmunoterapia.

25 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de obtener información de secuencia de ácido nucleico comprende amplificar secuencias de ácido nucleico obtenidas de al menos una de dichas muestras de tumor sólido en un ensayo de PCR múltiple usando (i) una pluralidad de receptores inmunitarios adaptativos (AIR) cebadores oligonucleotídicos de segmento V y (ii) una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos de segmento J de AIR o uno o más cebadores oligonucleotídicos de segmento C de AIR.

30 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dichos ácidos nucleicos comprenden ADN genómico, ADNc o ARNm.

35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho polipéptido receptor relacionado con la inmunidad adaptativa (AIR) es un polipéptido AIR de mamífero y se selecciona entre un polipéptido receptor gamma de células T (TCRG), un polipéptido receptor beta de células T (TCRB), un polipéptido receptor alfa de células T (TCRA), un polipéptido receptor delta de células T (TCRD), un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina (IGH) y un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina (IGL), opcionalmente en donde: (i) dicho polipéptido IGH se selecciona entre una IgM, un polipéptido de IgA, un polipéptido de IgG, un polipéptido de IgD y un polipéptido de IgE; (ii) dicho polipéptido de IGL se selecciona entre un polipéptido IGL-lambda y un polipéptido IGL-kappa; o (iii) dicho polipéptido AIR de mamífero se selecciona entre un polipéptido AIR humano, un polipéptido AIR de primate no humano, un polipéptido AIR de roedor, un polipéptido AIR de cánido, un polipéptido AIR de felino y un polipéptido AIR de ungulado.

45 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adicionalmente:

- (i) cuantificar el nivel de infiltración de células T para una o más muestras de tumor sólido calculando el número de reordenamientos de TCR por genoma diploide; y
- 50 (ii) predecir una respuesta del sujeto de prueba a la inmunoterapia basada en el nivel de infiltración de células T, en donde un alto nivel de infiltración de células T es predictivo de una respuesta positiva a la inmunoterapia.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho sujeto de prueba es un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una afección maligna, opcionalmente en donde: (i) dicha afección maligna se selecciona entre una neoplasia maligna hematológica, un melanoma, un sarcoma y un carcinoma; o (ii) dicha afección maligna se selecciona entre melanoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata.

60 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha inmunoterapia comprende:

- (i) un anticuerpo inmunoterapéutico, una citocina, un agente inmunosupresor o una vacuna;
- (ii) un inhibidor de un regulador negativo del sistema inmunitario, opcionalmente en donde (a) dicho regulador negativo se selecciona entre un grupo que consiste en CTLA-4, LAG3 y PD-1, o (b) dicho inhibidor es un

anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-CTLA-4, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; o

(iii) un agente que se dirige a un potenciador de una respuesta inmunitaria, opcionalmente en donde dicho potenciador de una respuesta inmunitaria se selecciona entre 41BB / CD137, OX40 / CD134 y CD40.

5
8. Una inmunoterapia para su uso en el tratamiento de una afección maligna, en donde la inmunoterapia se administra a un sujeto de prueba que se predice que tiene una respuesta positiva a la inmunoterapia mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y en donde la inmunoterapia comprende: (i) un anticuerpo inmunoterapéutico, una citocina, un agente inmunosupresor o una vacuna; (ii) un inhibidor de un regulador negativo del sistema inmunitario, opcionalmente en donde (a) dicho regulador negativo se selecciona entre un grupo que
10 consiste en CTLA-4, LAG3 y PD-1, o (b) dicho inhibidor es un anti -PD-1 anticuerpo o un anticuerpo anti-CTLA-4, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab; o (iii) un agente que se dirige a un potenciador de una respuesta inmunitaria, opcionalmente en donde dicho potenciador de una respuesta inmunitaria se selecciona entre 41BB / CD137, OX40 / CD134 y CD40.

15
9. La inmunoterapia de la reivindicación 8, en donde la afección maligna se selecciona entre: (i) una neoplasia maligna hematológica, un melanoma, un sarcoma y un carcinoma; o (ii) un melanoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata.
20

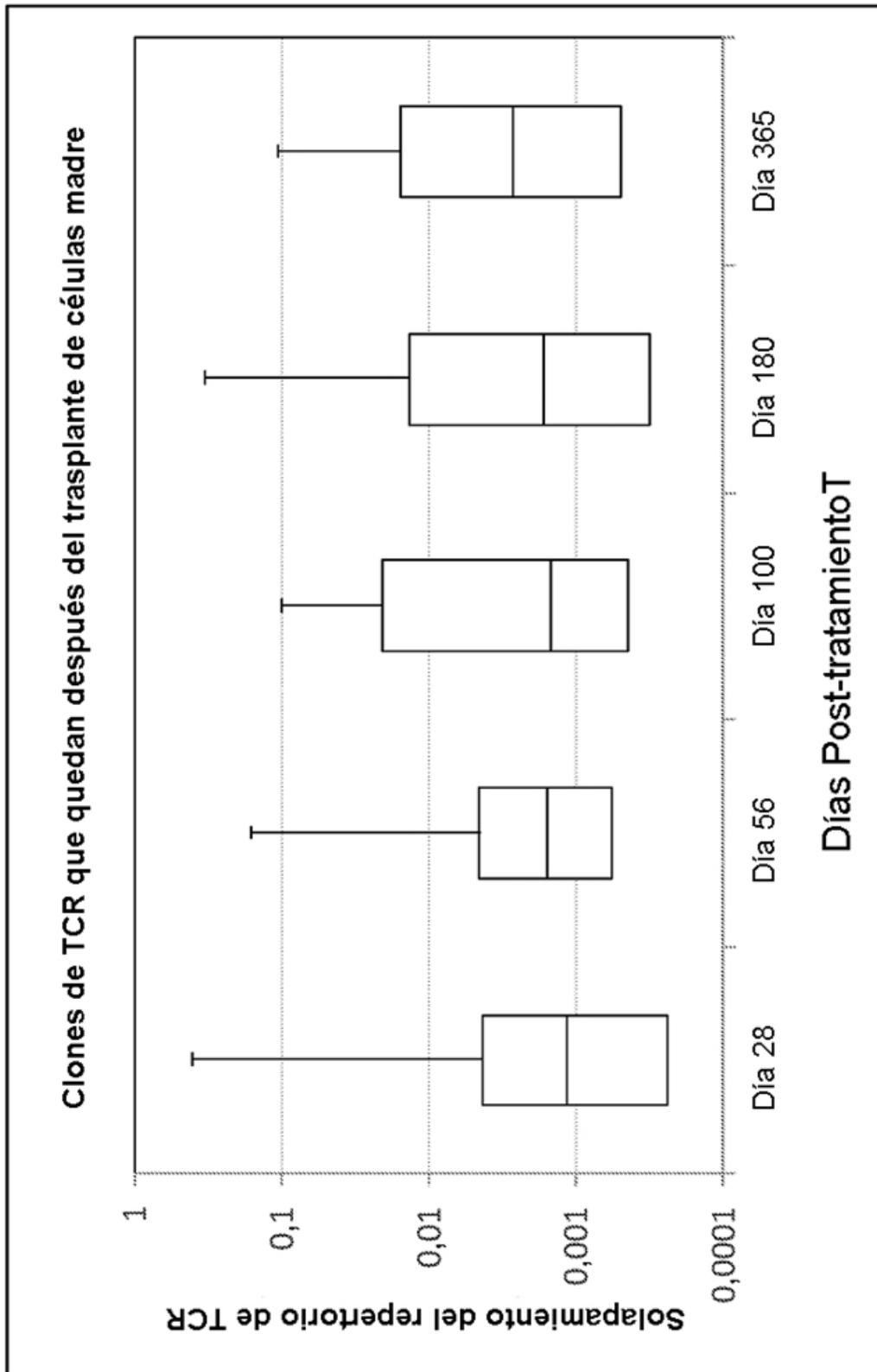


FIGURA 1

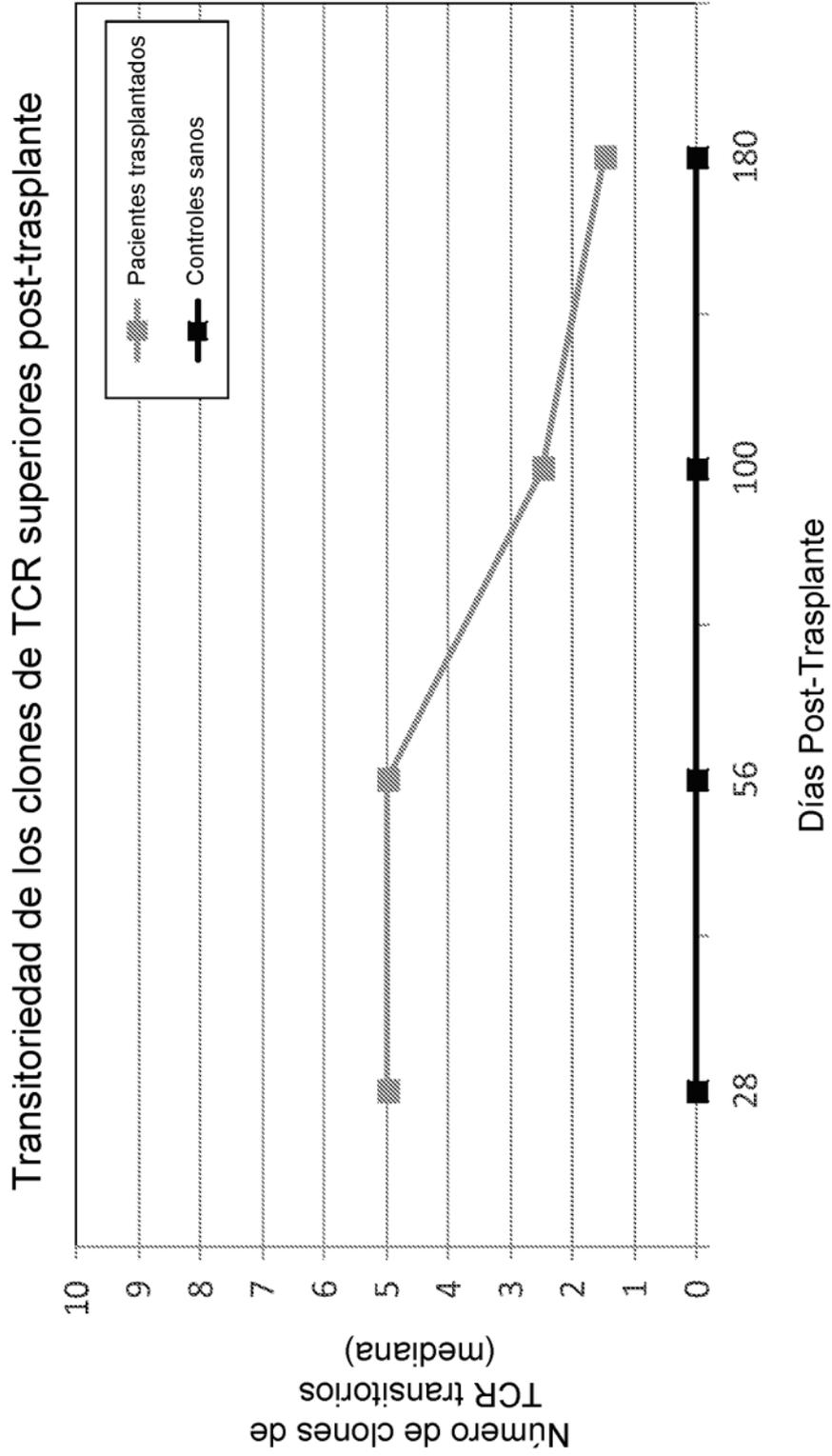


FIGURA 2

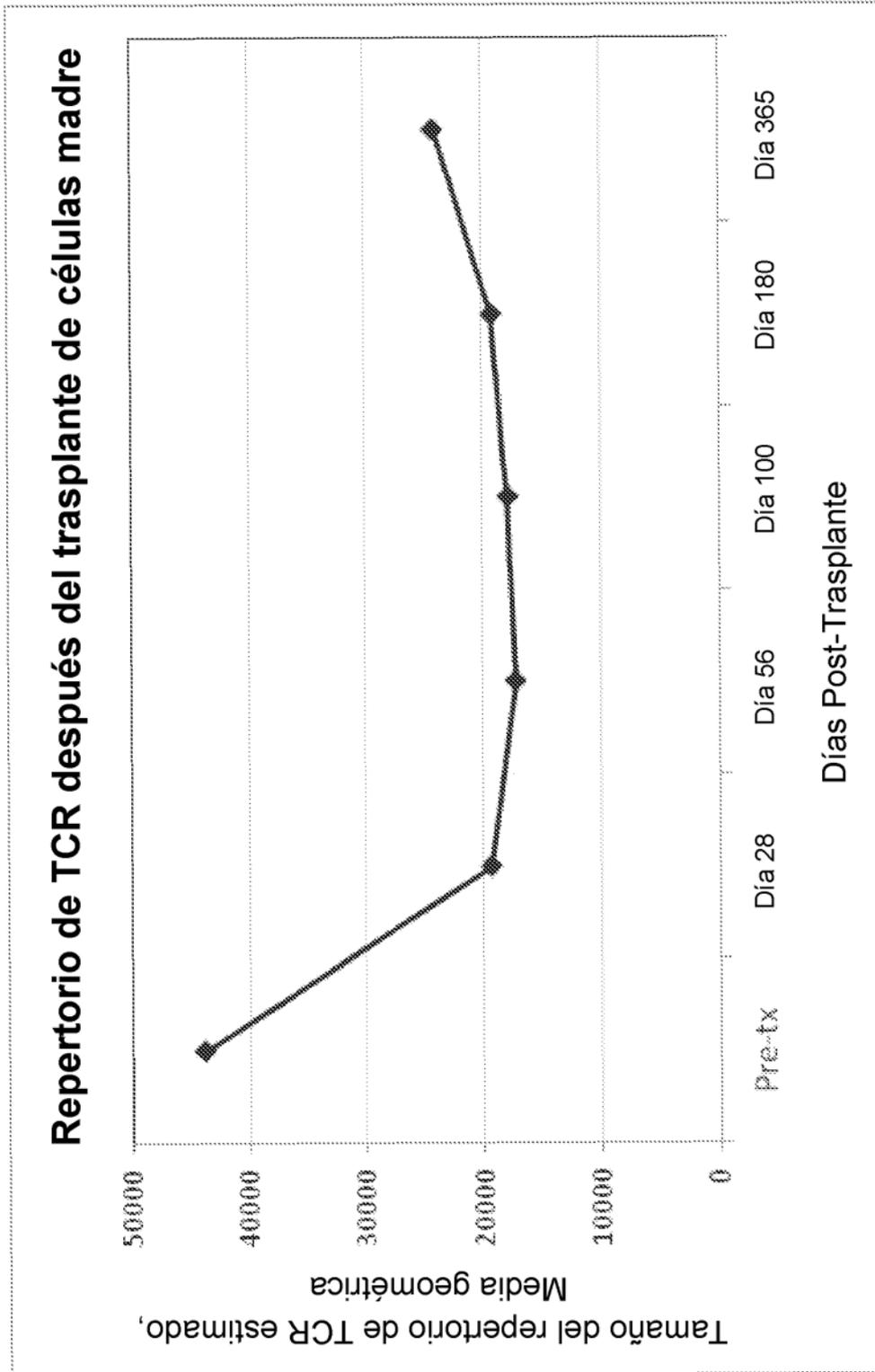


FIGURA 3

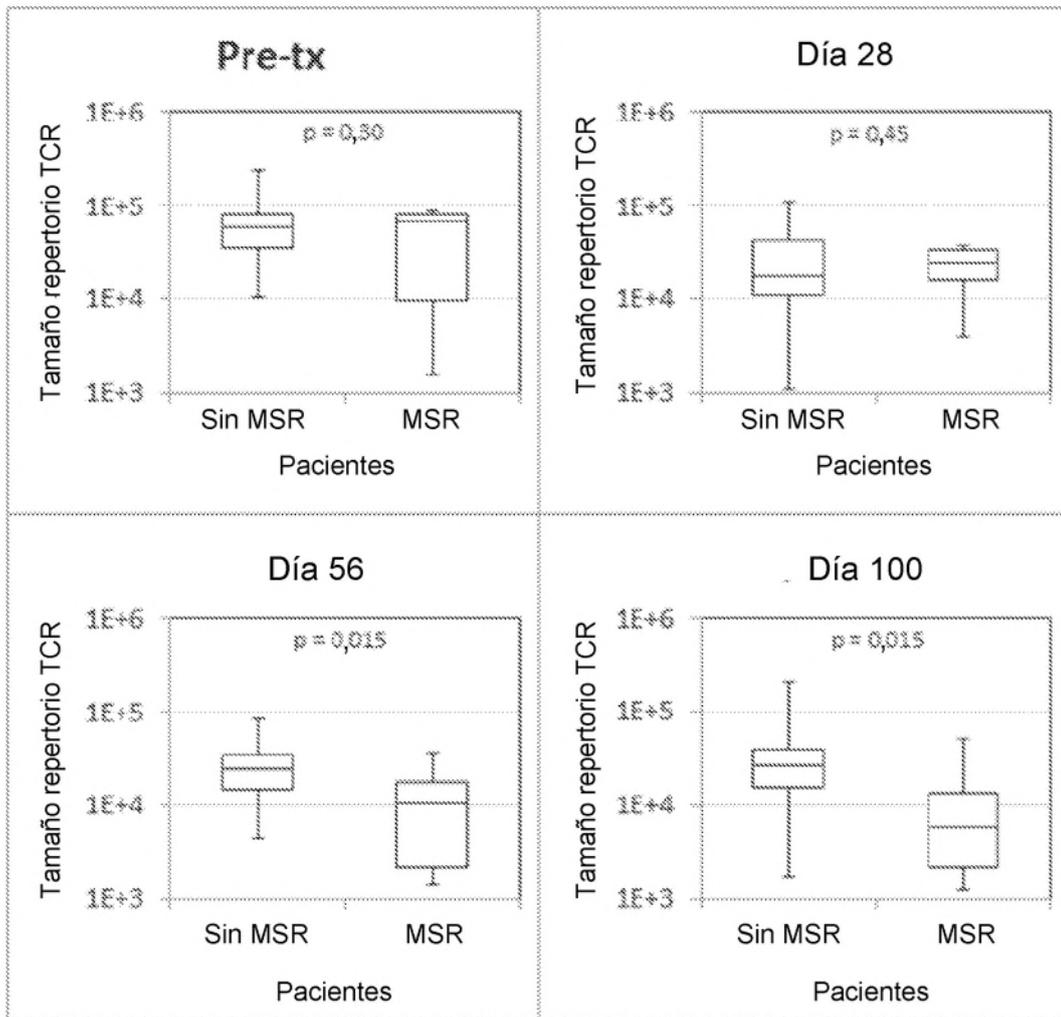


FIGURA 4

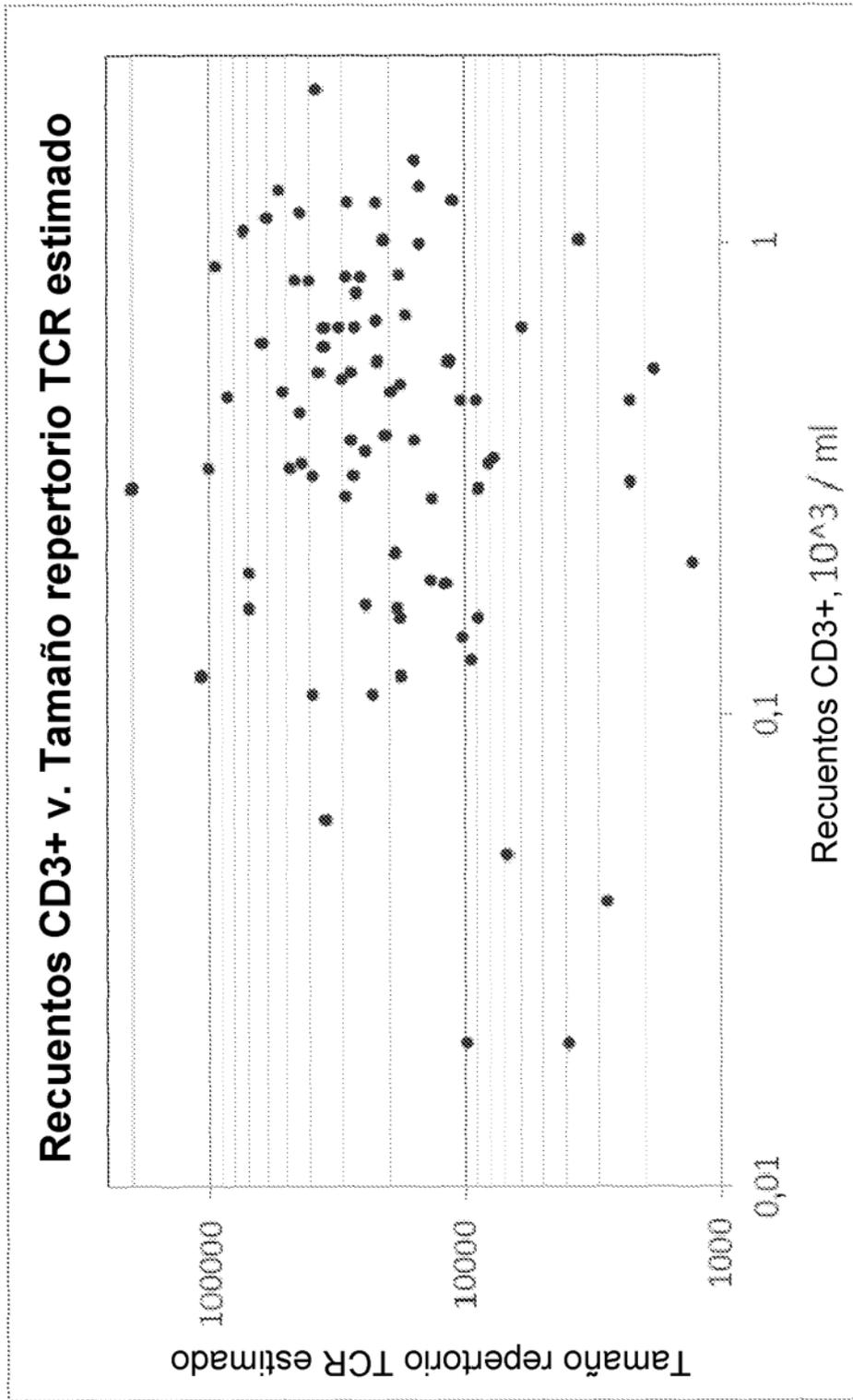


FIGURA 5

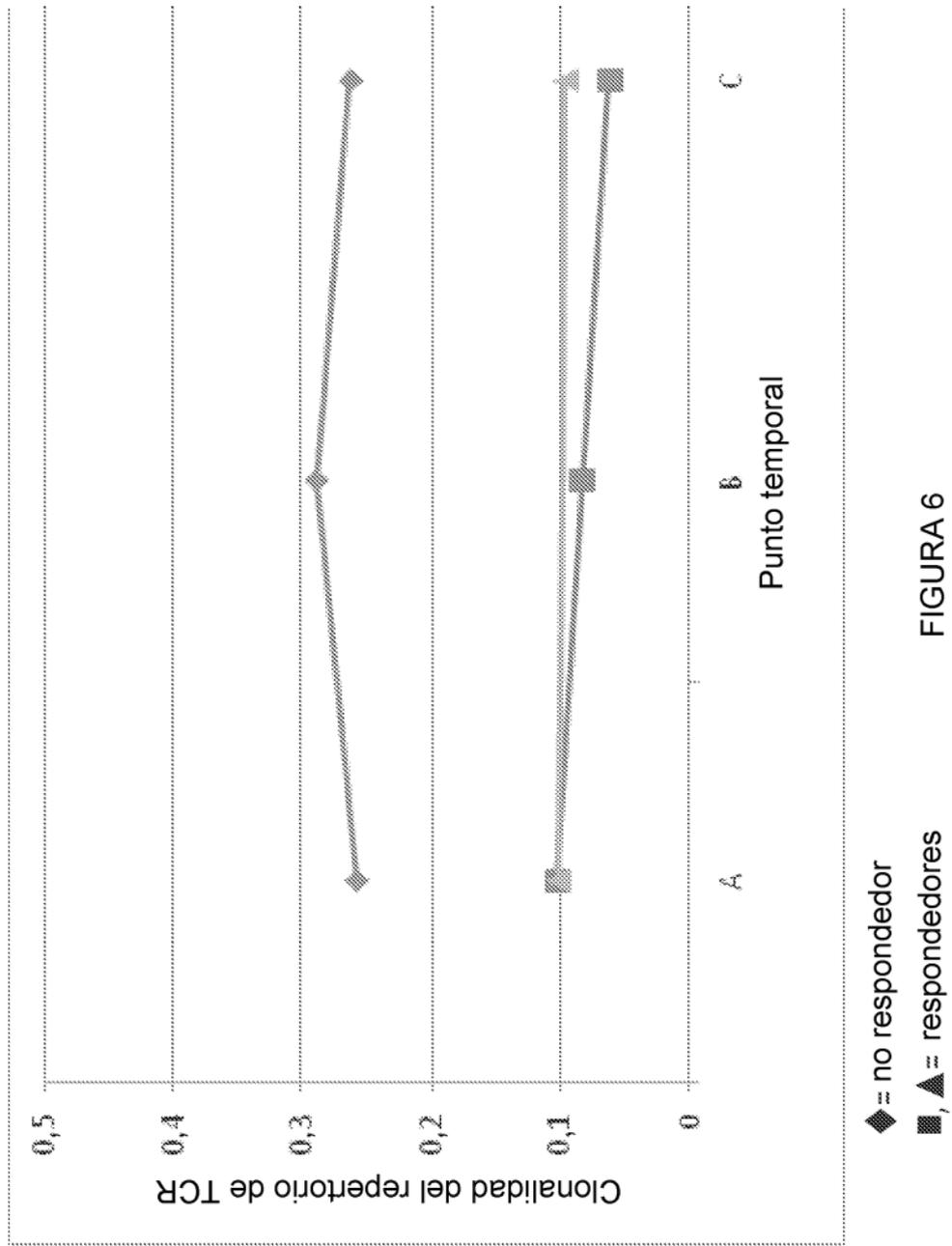


FIGURA 6

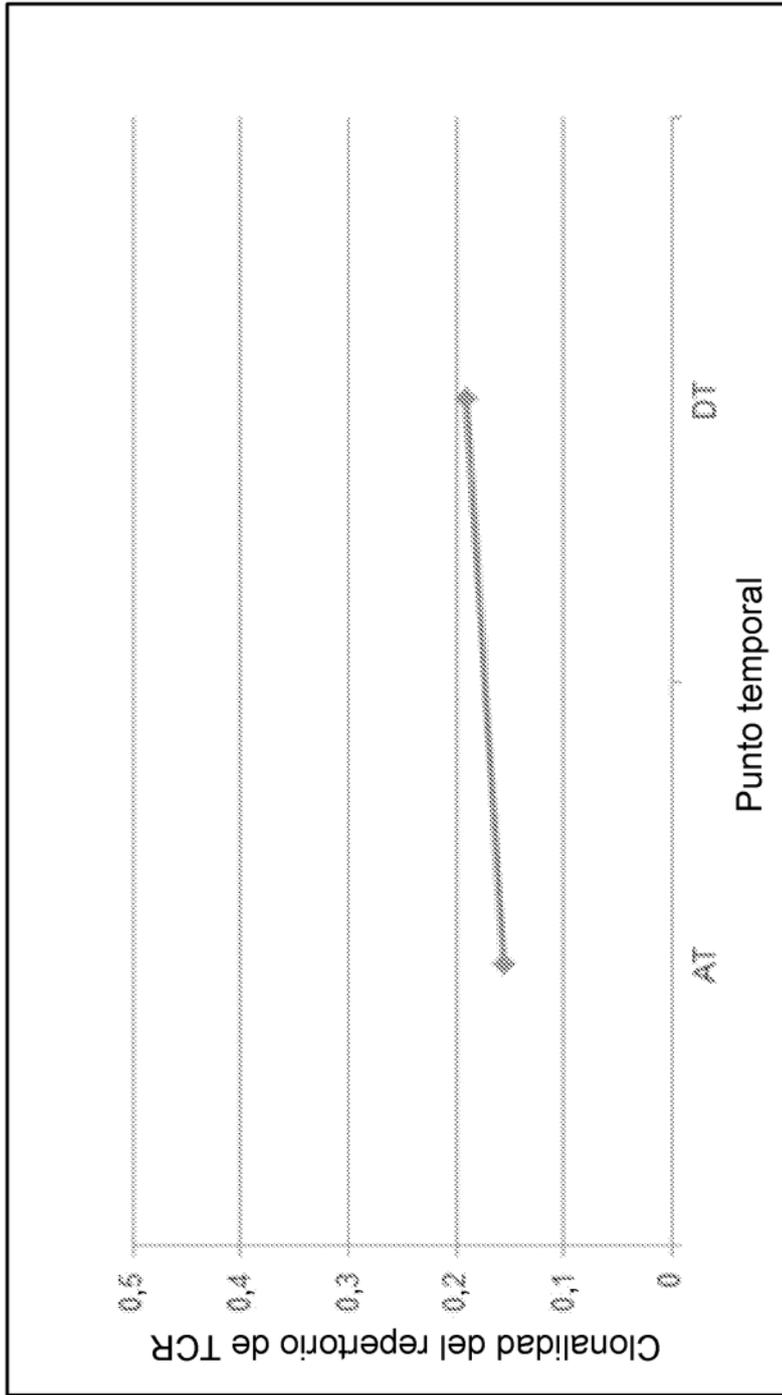
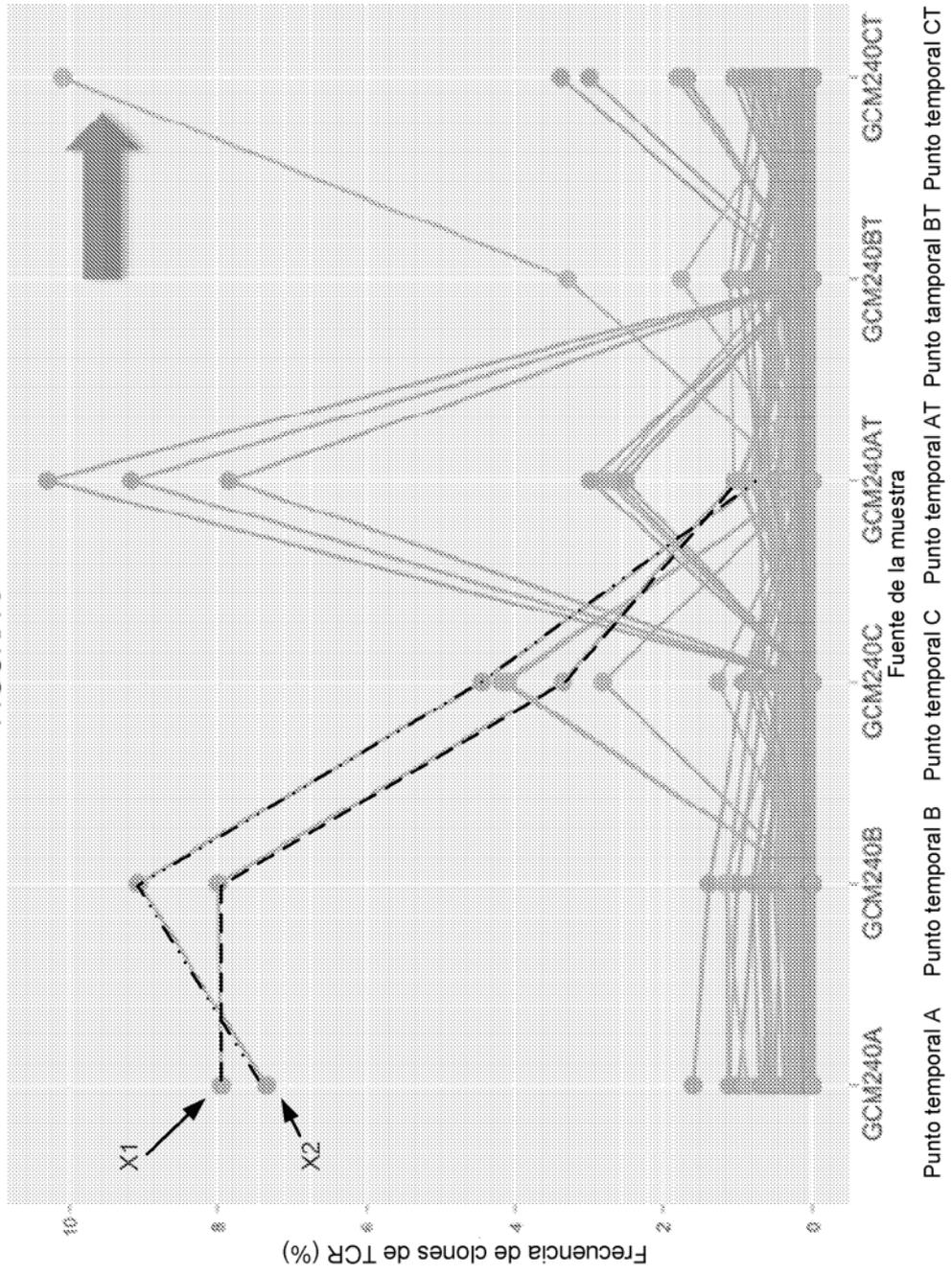


FIGURA 7

FIGURA 8



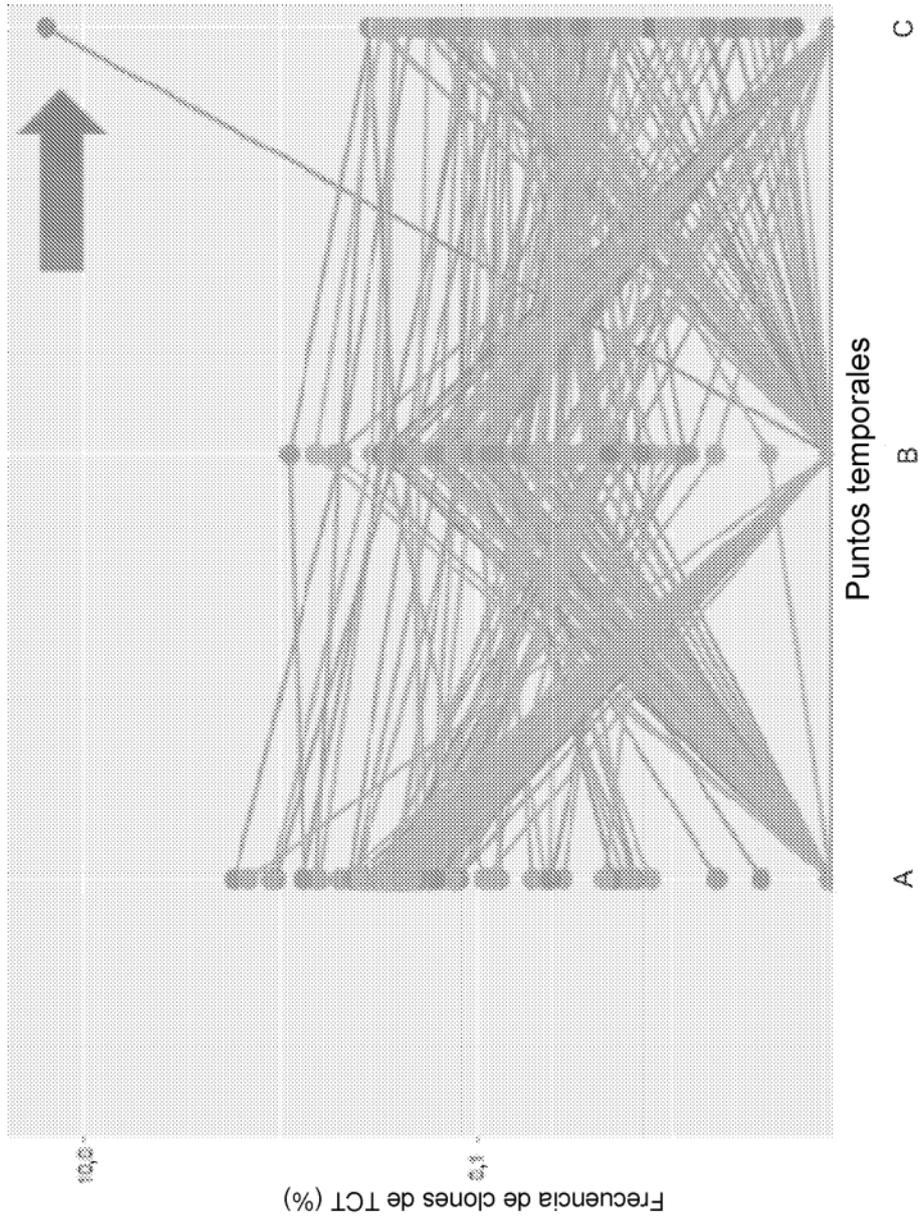


FIGURA 9

FIGURA 10A

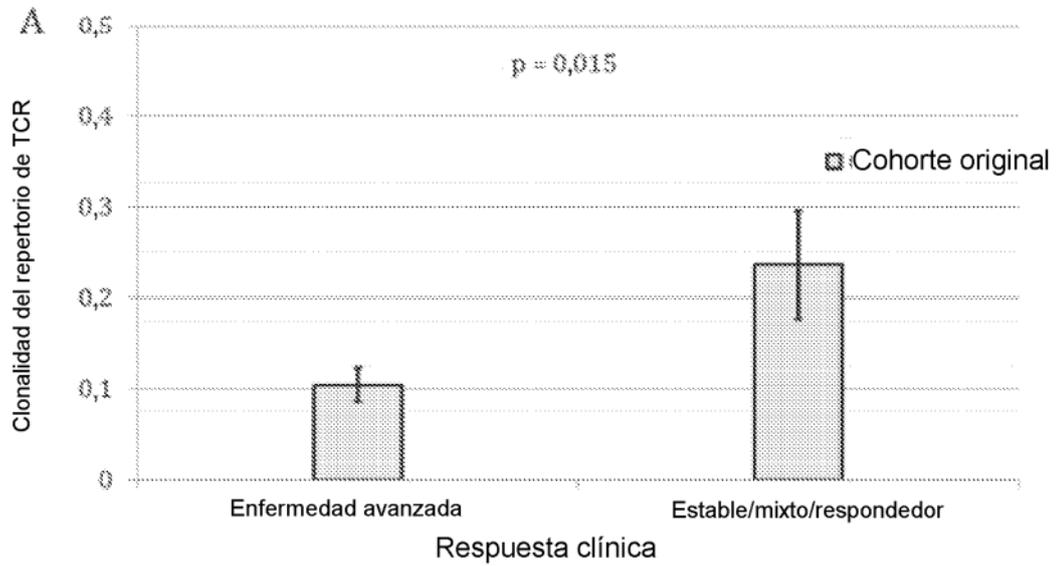
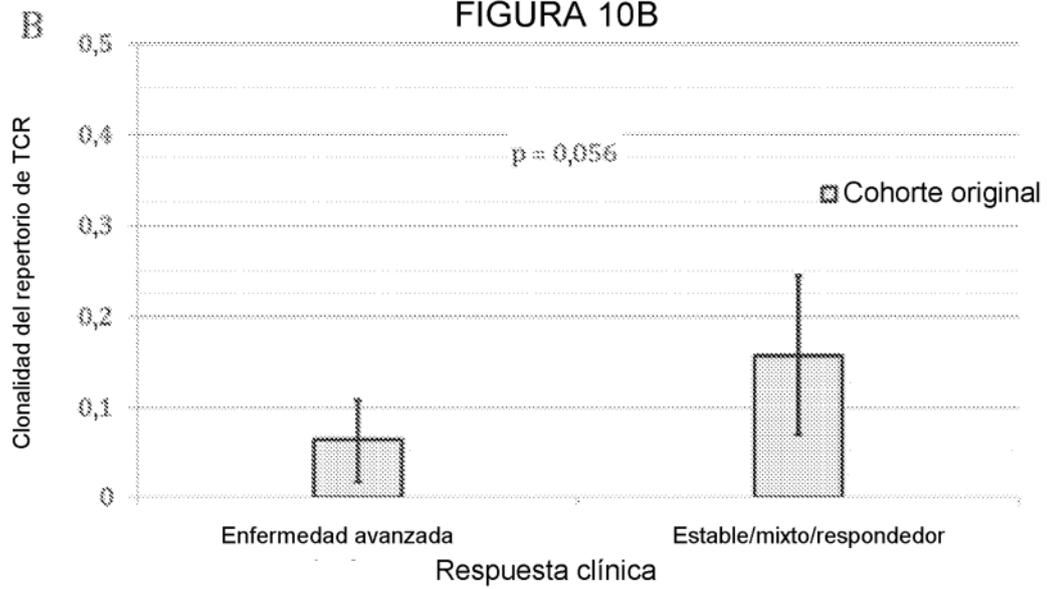


FIGURA 10B



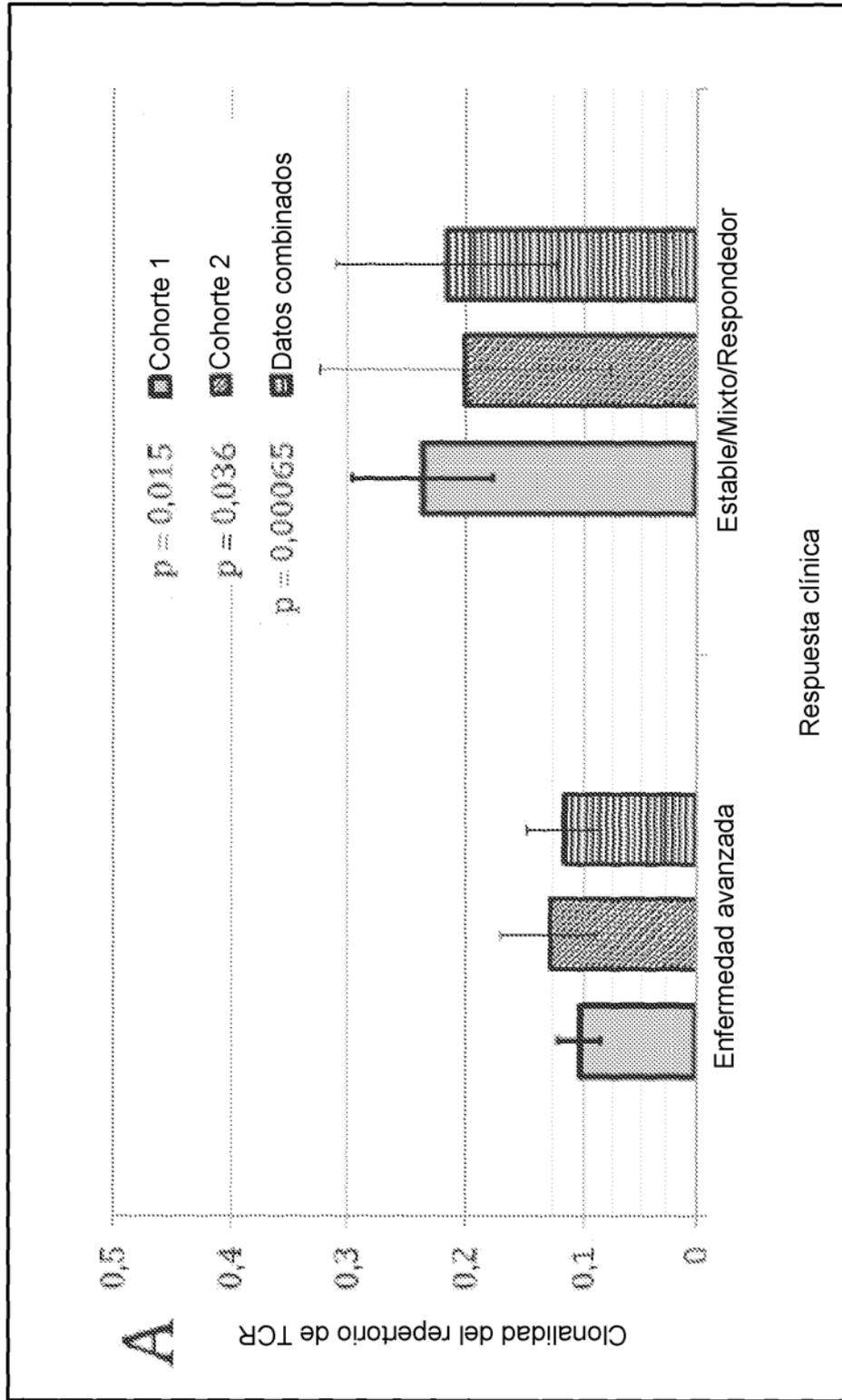
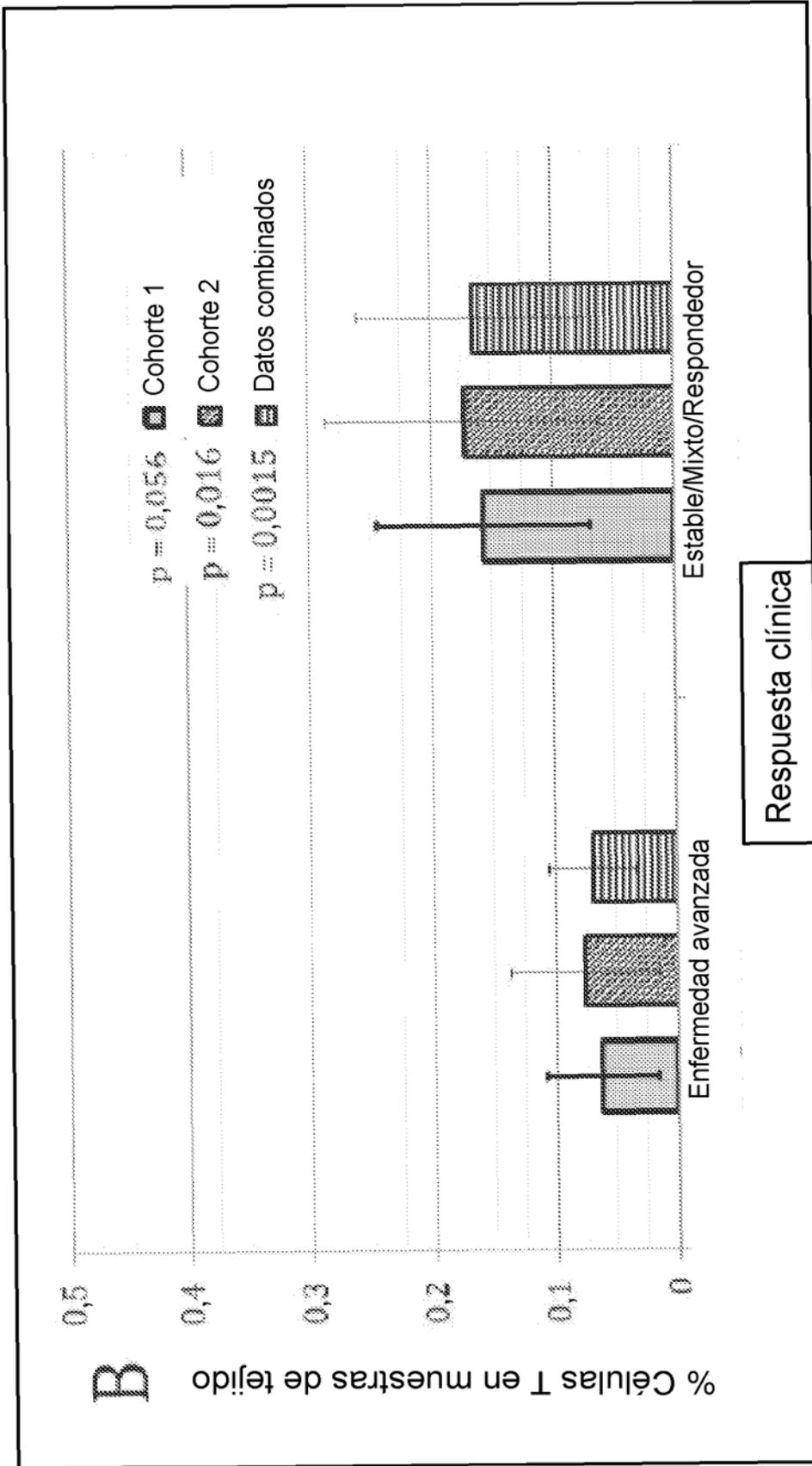


FIGURA 11A



Respuesta clínica

FIGURA 11B

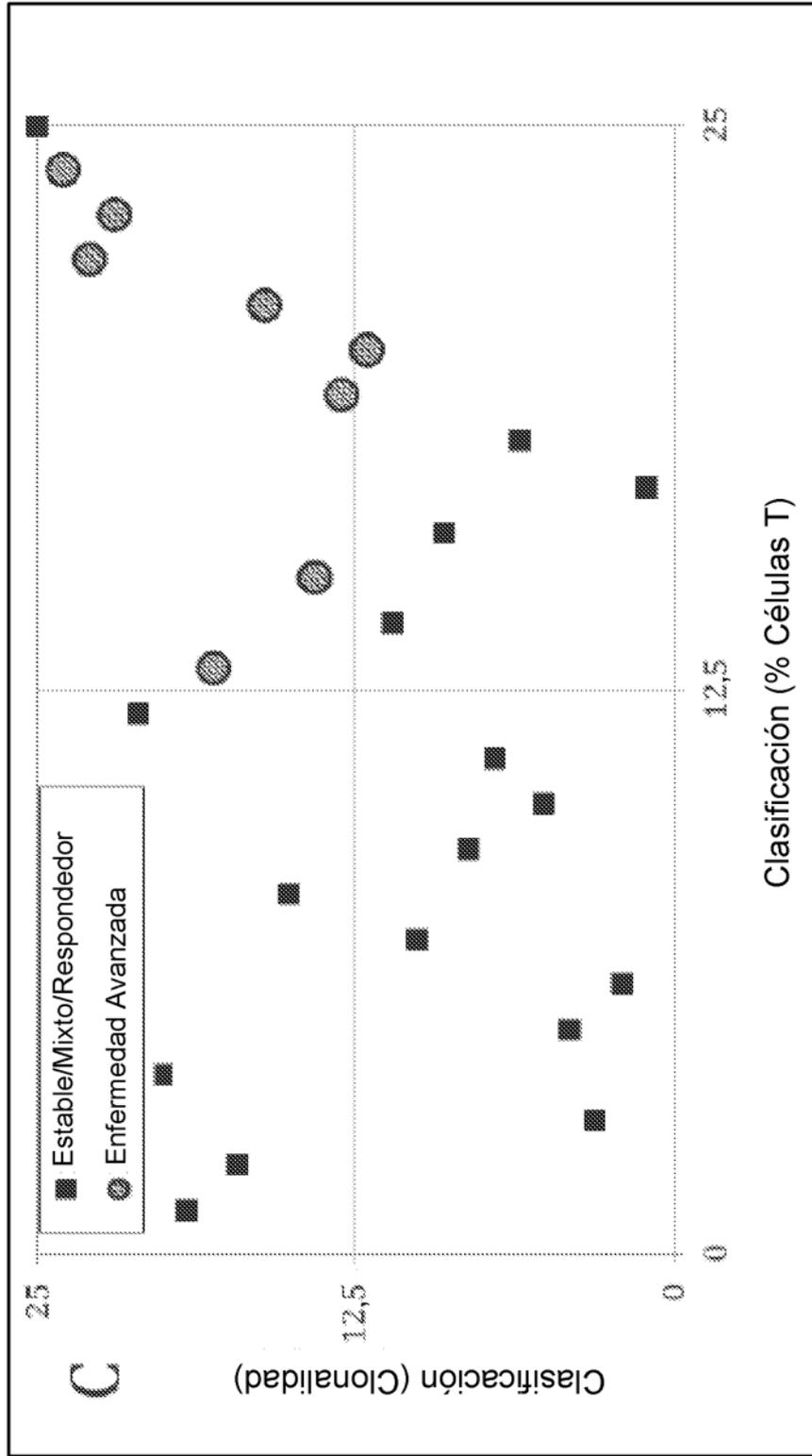


FIGURA 11C

