

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.06.13	(73) Titular(es): MERCK PATENT GMBH FRANKFURTER STRASSE 250 64293 DARMSTADT DE
(30) Prioridade(s): 2002.06.13 EP 02013423	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.03.09	
(45) Data e BPI da concessão: 2009.08.05 218/2009	(72) Inventor(es): WOLFGANG STRITTMATTER HEIDRUN MOLL BURKHARD SCHARM DE DE DE
	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE ALO-ANTIGÉNIOS E SUA UTILIZAÇÃO PARA TERAPIA DE CANCRO E TRANSPLANTE**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE ALO-ANTIGÉNIOS E SUA UTILIZAÇÃO PARA TERAPIA DE CANCRO E TRANSPLANTE"

A presente invenção proporciona um novo conceito com respeito à definição geral de alo-antigénios que accionam a reacção do enxerto contra o tumor (GVT) e/ou a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD). O novo método de identificação de alo-antigénios, a qual era até à data um problema técnico por resolver, convida ainda para novas estratégias em imunoterapia. Uma vez que a análise de proteínas de ligação à HLA pode ser agora efectuada com alo-antigénios para os quais é conhecida a correspondente sequência de aminoácidos, a presente invenção também permite a separação de células T alo-reactivas que reconhecem apenas as células tumorais entre aquelas que medeiam a GVHD. Os antigénios definidos com a nova tecnologia são especialmente úteis para diagnóstico e vacinação no cancro e doenças relacionadas com transplante.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE ALO-ANTIGÉNIOS E SUA UTILIZAÇÃO PARA TERAPIA DE CANCRO E TRANSPLANTE"

Sumário da invenção

A presente invenção proporciona um novo conceito com respeito à definição geral de alo-antigénios que accionam a reacção do enxerto contra o tumor (GVT) e/ou a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD). O novo método de identificação de alo-antigénios, a qual era até à data um problema técnico por resolver, convida ainda para novas estratégias em imunoterapia.

Uma vez que a análise de proteínas de ligação à HLA pode ser agora efectuada com alo-antigénios para os quais é conhecida a correspondente sequência de aminoácidos, a presente invenção também permite a separação de células T reactivas a tumores que reconhecem apenas células tumorais entre aquelas que medeiam a GVHD. Os antigénios definidos com a nova tecnologia são especialmente úteis para diagnóstico e vacinação no cancro e doenças relacionadas com transplante.

Antecedentes da invenção

Sabe-se na técnica que uma grande parte dos tumores expressam níveis elevados de auto-proteínas por vezes alteradas, as quais podem ser vistas como alvos potenciais para respostas imunológicas. Além disso foi demonstrado que o braço celular do sistema imunitário (linfócitos T) é capaz de reconhecer células cancerosas em modelos experimentais e indivíduos humanos, não obstante os tumores crescem progressivamente.

Uma hipótese para explicar este paradoxo é que os linfócitos T não funcionam adequadamente no hospedeiro portador de tumor. A outra alternativa é a capacidade dos tumores para regular negativamente a maquinaria de apresentação de antígenos, tornando-se assim invisíveis aos linfócitos T. Por conseguinte, permanece incerto se a proteína sobre-expressa ou alterada pode estimular linfócitos T citotóxicos reactivos a tumores (CTLs) e contribuir para a imunovigilância do crescimento de tumores. Além do mais, a maioria das proteínas do tumor são proteínas expressadas de modo ubíquo e elas provavelmente medeiam a supressão de CTLs específicos do repertório autólogo de células T. As células T auto-reactivas são normalmente suprimidas numa fase imatura do seu desenvolvimento por apoptose induzida por antígenos ou selecção negativa. Além do antígeno, a selecção negativa pode ser modulada por conjuntos diferentes de sinais co-estimuladores derivados de (APC) (MacKinnon *et al.*, *Br. J. Haematol.* 2000, 110: 12-17), levando à formação de um sistema imunitário que é tolerante para auto-antígenos. Apesar destas observações desfavoráveis, existe um grande interesse e expectativa que a vacinação contra tumores possa funcionar e viabilize tratamentos para superar os inconvenientes das actuais abordagens terapêuticas.

A quimioterapia em associação com a radioterapia e transplante de medula óssea (BMT) tem sido explorada ao longo dos últimos 20-30 anos para alguns distúrbios metabólicos e hematopoiéticos, e tornou-se evidente que o efeito terapêutico é provocado apenas parcialmente pela erradicação de células de leucemia utilizando quimioterapia de doses elevadas e irradiação. Um grande número de observações clínicas proporciona evidência mais do que

convvincente que, além disso, as respostas imunológicas (células T do doador) contribuem consideravelmente para a eliminação de células cancerosas residuais e, em especial, para o sucesso subsequente a longo prazo das terapias à base de BMT. Em retrospectiva, a estratégia terapêutica corrente no BMT avalia exageradamente o potencial anticancerígeno mesmo de doses muito elevadas de quimioterapia e radioterapia e subestima a eficácia da imunoterapia mediada por Linfócitos alogênicos do doador derivados de BMT.

Os sucessos clínicos observados após o tratamento de distúrbios hematopoiéticos (leucemia) com transplantes de medula óssea alogênica (alo-BMT) têm, em grande medida, preenchido os princípios fundamentais de uma imunoterapia curativa.

O termo alogênico é utilizado para descrever uma situação na qual o doador e o receptor são indivíduos diferentes, por comparação com o termo singênico no qual o doador e o receptor são gêmeos idênticos e têm um tipo de tecido idêntico uma vez que a sua constituição genética é a mesma. Os transplantes autólogos são derivados de um indivíduo que mais tarde no processo recebe de volta as suas próprias células. Mas, falando rigorosamente, isto não é um transplante uma vez que não existem nenhuma barreiras imunológicas do transplante.

Existem dois tipos de doadores alogênicos: doadores familiares, geralmente irmãos, e não familiares, geralmente encontrados em grupos grandes de voluntários e que condizem com um determinado tipo de tecido que é o mesmo do doente.

O transplante alogénico, de um doador familiar ou não familiar, difere do transplante singénico ou autólogo por existir potencial para rejeição imunológica das células estaminais doadas pelo receptor (efeito do hospedeiro contra o enxerto) e a reacção imunológica das células imunitárias do doador contra os tecidos do receptor (doença do enxerto contra o hospedeiro).

A rejeição imunológica é geralmente evitada por tratamento intensivo do receptor antes do transplante (condicionamento) para suprimir o sistema imunitário. Os esquemas de condicionamento variam de acordo com o centro de transplante e a malignidade envolvida. Por exemplo, no tratamento de leucemia, o doente é submetido a condicionamento mieloablativo compreendendo uma associação de ciclofosfamida de dose elevada e irradiação de corpo inteiro antes de BMT. Após transplante a reacção imunológica é combatida dando fármacos imunossuppressores, incluindo metotrexato, hormonas glucocorticóides (esteróides), ciclosporina ou uma microemulsão desta (Neoral®), tacrolimus (Prograf®) e micofenolato de mofetil (Cellcept®), durante um período de tempo limitado para prevenir ataque agudo e lesão dos tecidos do doente. Melhoramentos dos cuidados de apoio juntamente com imunossupressão controlada reduziram consideravelmente a toxicidade do condicionamento e a reacção imunológica pós-BMT. No entanto, continuam a ocorrer complicações graves na orofaringe, aparelho gastrointestinal, fígado, pulmões, pele, rim, aparelho urinário e sistema nervoso e, consequentemente, o alo-BMT está restringido a doentes mais jovens, em boa condição clínica.

Na técnica, é geralmente aceite que os cancros hematológicos não podem ser sempre erradicados apenas por condicionamento com doses elevadas de quimioterapia-radiação, mas precisam além disso de alo-BMT. Assim, as terapias convencionais à base de alo-BMT tornaram-se um procedimento corrente para o tratamento de muitas malignidades hematológicas humanas e proporcionam o modelo para todas as imunoterapias - a possibilidade de uma "cura".

Os doadores de alo-BMT são seleccionados segundo a sua expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC): os antígenos de leucócitos humanos (HLA). Os tipos de HLA são determinados geneticamente. Assim, o tipo de HLA de um indivíduo é herdado dos seus pais. Existem três genes principais num conjunto que parecem ser particularmente importantes no transplante: HLA-A, HLA-B e HLA-DR. Cada indivíduo é portador de duas cópias de cada um dos genes no conjunto HLA. Além disso, muitas versões alélicas correspondem a cada um dos genes HLA.

Para se obter uma combinação ideal de 6 de 6, duas pessoas têm de ser portadoras dos mesmos alelos em cada um dos seus dois genes HLA-A, HLAB e HLA-DR e existe uma probabilidade de 1 em 200 que um pai e uma criança condigam em termos de HLA.

Quando não existe um familiar que condiga em termos de HLA e exista tempo para realizar uma investigação, é geralmente tido em consideração um doador não familiar. A probabilidade de que quaisquer 2 indivíduos não familiares condigam para todos os 6 genes HLA é de 1 em um milhão. Devido ao polimorfismo dos sistemas HLA, às origens étnicas

e à idade média no diagnóstico, os transplantes de doadores familiares que condigam em termos de HLA estão presentemente disponíveis para 15-60% dos doentes em que são diagnosticados novos casos. Os doadores alternativos incluem familiares com graus menores de incompatibilidade e voluntários não familiares compatíveis em termos de HLA. A probabilidade de encontrar doadores não familiares adequados, condizentes ou parcialmente discordantes, tem aumentado com o desenvolvimento de uma rede de registos contendo agora mais de 4,7 milhões de doadores em todo o mundo e com o acesso a outras fontes tal como o sangue do cordão umbilical.

Um transplante de medula óssea consiste principalmente de células estaminais hematopoiéticas as quais podem ser obtidas da medula óssea, sangue ou sangue do cordão umbilical. As células estaminais hematopoiéticas são geralmente aspiradas da medula óssea. Um procedimento alternativo envolve um tratamento de 3 a 5 dias de doadores com factor estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF) para mobilizar as células estaminais e as células progenitoras da medula para o sangue. As células apropriadas são então recolhidas do doador por leucaferese.

O sangue contido na placenta e no cordão umbilical de recém-nascidos está a aparecer como uma nova fonte de células estaminais. O sangue do cordão contém números significativos de células estaminais; tem vantagens em relação ao BMT ou ao transplante de células estaminais sanguíneas do adulto para determinados doentes e podem ser tidas em consideração se não estiver disponível um doador não familiar, condizente de células estaminais de medula. Uma vantagem de utilizar sangue do cordão umbilical é que

não precisa de uma combinação perfeita de tecido com o receptor.

Os doentes pré-condicionados como descrito acima recebem o preparado de células estaminais e, duas a cinco semanas após o transplante, o enxerto de células doadas torna-se evidente pelo aparecimento de glóbulos brancos normais no sangue do doente. São efectuadas transfusões periódicas de glóbulos vermelhos e plaquetas até ser restabelecida a função da medula pelas células estaminais transplantadas. O tempo até à recuperação hematopoiética é mais curto com células estaminais sanguíneas do que com células de medula óssea. Algumas das células imunitárias quiméricas novas reconhecem o hospedeiro como estranho e produzem um efeito do enxerto contra a leucemia, doravante referido como actividade enxerto contra tumor (GVT) a qual é geralmente acompanhada de doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD). A reacção GVHD ocorre quando as células imunitárias do doador, especialmente os linfócitos T, reconhecem que as células hospedeiras são diferentes delas mesmo.

A GVHD induzida por alo-BMT é uma função imunológica relacionada de perto com a GVT, a qual pode ocorrer pouco depois das células transplantadas começarem a aparecer no receptor. Ambos os tipos de respostas imunológicas são mediadas por células T que reconhecem as células que não são geneticamente idênticas e isto poderia explicar a observação histórica que os transplantes entre gémeos idênticos são menos bem-sucedidos do que aqueles entre irmãos condizentes no tratamento de leucemia mieloide crónica (CML) (Gale *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 1994, 120: 646-652). No caso do transplante de células estaminais, as células do doador inspeccionam cuidadosamente as células do

tecido do receptor para sinais de diferenças e atacam-nas se encontrarem variações significativas. Por exemplo, na fase inicial após transplante estão presentes APC residuais derivadas do doente, que serão perscrutadas por células T derivadas do doador em relação a diferenças com base em genes polimórficos. Será iniciada uma resposta citotóxica, se as células T doadas reconhecerem as células hospedeiras que apresentam antigénios estranhos, que são basicamente todas as células imunitárias. Se a resposta das células T se torna numa GVHD terrível ou numa GVT benéfica é determinado pelo facto de as diferenças geneticamente manifestadas serem apresentadas no contexto de células que pertencem aos tecidos ou órgãos cancerosos ou, pior, fazem parte de órgãos essenciais, não doentes tais como pele, articulações, pulmão, fígado ou rim. Dependendo da importância do órgão afectado, a GVHD varia em gravidade desde uma pequena irritação até uma doença potencialmente fatal. Duma maneira geral, o alo-BMT permanece uma abordagem algo rudimentar, com uma morbilidade e mortalidade relacionadas com o transplante significativas. Uma compilação recente de relatórios coloca o risco de morte em 20-41%, e, apesar da disponibilidade de fármacos imunossuppressores potentes, até 70% dos doentes tratados continua a sofrer de GVHD. A identificação genérica de alo-antigénios que são responsáveis por um processo promotor de doença, bem como a definição de alo-antigénios que são úteis pela opção de combate da doença é, por conseguinte, o aspecto central da presente invenção.

Não obstante, a imunoterapia com base em BMT oferece até 70% dos doentes uma sobrevivência isenta de leucemia após transplante (Clift *et al.* *Haematol.* 1997, 10: 319-336). No entanto, mais de 60% dos doentes com CML não recebem alo-

BMT devido ao estado da doença, idade avançada ou falta de um doador adequado.

O BMT e/ou o transplante de células estaminais são opções de tratamento aceites para a leucemia mielóide aguda (AML) em primeiro lugar ou após remissão completa, recidiva precoce ou insucesso por indução de AML, leucemia linfoblástica aguda (ALL) em primeiro lugar ou após remissão completa, ALL em recidiva precoce ou insucesso por indução, CML, mielodisplasia, anemia aplástica, recidiva sensível e resistente da doença de Hodgkin, recidiva sensível e resistente de linfoma agressivo e linfoma de baixo grau.

A reacção do enxerto contra o hospedeiro resulta quando as células imunitárias do doador, especialmente os linfócitos T, sentem que as células hospedeiras são diferentes de si mesmas. As diferenças podem envolver um espectro largo de proteínas que não são detectadas pela tipagem HLA, ou podem existir diferenças ligeiras no tipo de HLA que permitem o transplante mas não sem gerar a reacção. As diferenças reflectem um polimorfismo mais limitado em códãos individuais das moléculas HLA correspondentes fora dos códãos utilizados para tipagem e definição da correspondência do HLA. Sabe-se que, à excepção dos gémeos idênticos, existirá alguma incompatibilidade mesmo que o teste de HLA indique similaridade suficiente para permitir que um transplante seja bem-sucedido. Os métodos de tipagem de HLA cobrem apenas polimorfismos que foram empiricamente seleccionados como importantes. Com a informação crescente que vem da sequenciação de HLA estão continuamente a serem descobertas variantes alélicas que podem ser reconhecidas, em parte, como estranhas. As variações também se tornam

evidentes quando o doador e o receptor têm um sexo diferente. Em resumo, a gravidade das reacções imunológicas, tal como a GVHD, depende do tipo e grau de diferenças proteicas definidas molecularmente entre o doente e o doador que são apresentadas pelas células do doente.

A actividade GVT tem sido melhor estudada em doentes com CML, onde o reconhecimento e erradicação de células tumorais residuais por células imunitárias do doador (CTLs) parecem ser essencial para induzir remissão molecular duradoura. Uma melhor compreensão dos mecanismos da regulação na CML foi ganha com a observação de que existe um risco acrescido de recidiva após diminuição das células T dos enxertos. O risco de recidiva também está aumentado na ausência de GVHD (Goldman *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 1988, 108: 806-814; Horowitz *et al.*, *Blood* 1990, 75: 555-562.). Além disso, o BMT singénico entre gémeos é muito menos eficaz do que o BMT entre irmãos condizentes. No seu conjunto, estas observações indicam que o reconhecimento de células tumorais por células T é um pré-requisito essencial do efeito terapêutico.

Quando a doença reaparece após um transplante aparentemente bem-sucedido, a remissão completa pode ser conseguida por suspensão dos fármacos imunossupressores ou, mais impressionantemente, por infusão adicional de linfócitos T do doador. Assim, o efeito GVT relacionado com o alo-BMT representa a evidência mais conclusiva de que o sistema imunitário pode curar cancro em seres humanos e tem de ser acentuado pelo efeito poderoso antileucemia gerado por células T citotóxicas transferidas para o receptor.

Os linfócitos T do doador destroem as células leucémicas recorrentes pelo efeito GVT e, presumivelmente, as células T de ambas as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ no aloenxerto contribuem para este fenómeno. As células T CD4⁺ têm frequentemente uma função auxiliar para as respostas imunológicas mediadas por anticorpos células e restringem-se ao MHC de classe II. As células T CD8⁺ têm frequentemente uma função citotóxica e restringem-se geralmente ao MHC de classe I. Os antígenos relevantes (antígenos expressados pelo tumor, os antígenos de histocompatibilidade do receptor ou ambos) ainda não foram identificados e é o objectivo da presente invenção identificar e definir os antígenos envolvidos.

É surpreendente que os enxertos empobrecidos em células T estejam associados a um maior risco de recidiva na CML (Goldman *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 1988, 108: 806-814; Horowitz *et al.*, *Blood* 1990, 75: 555-562). Como descrito acima, os efeitos antileucemia podem ser gerados por alo-BMT, quando é realizada a infusão de linfócitos do doador (DLI). Neste cenário, a DLI pode restabelecer uma remissão molecular resistente em até 70% dos casos. No entanto, a DLI também pode estar associada a toxicidade significativa provocada por respostas do enxerto contra o hospedeiro, as quais acompanham frequentemente um efeito do enxerto contra a leucemia, com mortalidade significativa de aplasia da medula e/ou GVHD sistémica que ocorrem em 50-90% dos casos (S. MacKinnon, *Br. J. Haematol.* 2000, 110: 12-17).

Para superar as lacunas relacionadas com a toxicidade do protocolo alo-BMT "tradicional", foi sugerido um modelo de condicionamento compreendendo imunossupressão com micofenolato de mofetil (Cellcept®) e ciclosporina em

associação com irradiação de corpo inteiro de dose baixa minimamente tóxica. No entanto, devido ao condicionamento menos rigoroso, foi observada uma resposta acentuada do enxerto contra o hospedeiro. Nesta situação, a redução de células T no transplante antes da infusão pode evitar a GVHD. Um tipo modificado de procedimento de transplante, por vezes chamado "minitransplante", é presentemente desenvolvido com base nestas observações. Os riscos de rejeição do enxerto e uma maior taxa de recidiva podem ser evitados mantendo apenas uma porção das células T no enxerto. A selecção positiva de células CD34⁺ de preparações de sangue periférico proporciona uma redução de aproximadamente 1000 vezes nas células T. Estas células CD34⁺ purificadas contendo células estaminais pluripotentes e comprometidas são adequadas para transplante alogénico. Na CML, a administração de doses incrementalmente crescentes de células T foi utilizada para contornar parcialmente o problema da GVHD (MacKinnon *et al.*, *Blood* 1995, 86: 1261-1268) e, ao mesmo tempo, para aumentar o efeito GVT.

Em resumo, o futuro das abordagens de aloenxerto compreenderá minitransplantes empobrecidos em células T em associação com uma imunossupressão moderada após enxerto para controlar a rejeição de enxerto e a GVHD. Espera-se que isto reduza dramaticamente as toxicidades agudas dos alo-enxertos e, deste modo, o alo-BMT pode ser realizado em doentes anteriormente inelegíveis, em grande medida num cenário de doente externo. Espera-se que este desenvolvimento futuro facilite estratégias com base em imunoterapia alogénica para o tratamento de uma variedade de malignidades humanas.

A maior parte das actividades de investigação relacionadas com a discriminação imunológica entre o próprio e não próprio tem-se focado nas moléculas MHC extremamente polimórficas, em particular as moléculas HLA em seres humanos e os antigénios H-2 em ratos. No entanto, tem de ser mantido em mente que na maioria dos casos de BMT, o doador foi seleccionado pelo critério de que o seu tipo de HLA é muito condizente ou perfeitamente condizente com o HLA do receptor. Nos doadores de HLA condizente, tem-se presumido que a origem de GVHD e GVT esteja relacionada com moléculas polimórficas diferentes dos HLA. Investigação recente na tentativa de resolver a origem molecular das respostas imunológicas GVHD e GVT no BMT tirou, por conseguinte, partido das reacções específicas orientadas por linfócitos T, em que os CTLs reconhecem péptidos derivados de antigénios apresentados pelos HLA de classe I do receptor. Estas células T foram isoladas e utilizadas para identificar alo-antigénios. Constatou-se que disparidades em antigénios polimórficos diferentes do HLA entre o doador e o receptor parecem ser relevantes para o desenvolvimento de GVT e GVHD orientadas por linfócitos T. Assim, a chave para compreender a resposta imunológica GVHD e GVT consiste em compreender que antigénios estão envolvidos. Investigação na área das respostas imunológicas alogénicas tem considerado os aspectos supramencionados e está orientada para a identificação de outras moléculas importantes: os chamados antigénios de histocompatibilidade "menores" (mHAGs). Até à data o grande número destas proteínas extremamente diversas em combinação com a função biológica complicada e diversa dos antigénios tem frustrado as tentativas para uma caracterização completa.

Por definição, os mHAg são capazes de desencadear uma resposta imunológica (Lewalle *et al*, *Br. J. Haematol.* 1996, 92: 587-594) e eles são apresentados ao sistema imunitário de células T como péptidos ligados a moléculas HLA específicas. Deste modo, apenas as células T os podem reconhecer rapidamente, e tem-se suspeitado que os mHAg desempenham um papel importante na indução de reactividade CTL contra a leucemia e os auto-antígenos após BMT alogénico. Infelizmente, a maioria dos poucos mHAg que foram identificados até à data não são específicos para a leucemia e também são expressados por tecidos normais. A expressão relativa nos tecidos dos mHAg conhecidos não foi determinada, devido à falta de reagentes disponíveis. No entanto, as análises funcionais utilizando CTLs sugerem que muitos mHAg têm uma distribuição restringida em tecidos e, desse modo, apenas determinados tecidos podem estar em risco de rejeição. Também é de interesse a observação de que, no BMT, o quadro clínico de GVHD induzida por mHAg se assemelha a várias doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistémico e esclerodermia, sugerindo que os sintomas de GVHD crónica são de tipo autoimune.

Por definição, os mHAg são codificados fora da região HLA do cromossoma 6 humano, mas mesmo assim são capazes de desencadear uma resposta imunológica excepcional. Apesar do mecanismo da GVHD não ter sido ainda completamente elucidado, é bem aceite que os CTLs derivados do doador específicos para os mHAg do doente desempenham um papel importante na reacção citotóxica orientada por linfócitos T contra os órgãos alvo principais (incluindo pele, intestino, fígado, pulmão e articulações) e a manifestação resultante de GVHD que, em casos graves, pode ser fatal. Enquanto o mecanismo de GVHD parece estar razoavelmente bem

investigado, o papel de mHAgS na indução de GVT está menos definido. Isto poderia ser devido ao facto de terem sido identificados e analisados apenas muito poucos antigénios do espectro completo de mHAg e de as tecnologias presentemente disponíveis carecerem de um método eficaz para reconhecer os antigénios de uma maneira compreensiva. Por outro lado, os antigénios são um pré-requisito para isolar e caracterizar os clones de CTL responsáveis por mediar um efeito curativo ou adverso. Assim, a abordagem BMT curativa permanece uma disciplina empírica relativamente à especificidade da resposta imunológica envolvida.

Doente e transplantador estão normalmente focados, de modo exclusivo, no resultado da terapia, o que funciona razoavelmente bem para a maioria dos doentes, como esboçado acima.

Nos seres humanos, embora árduos de identificar, foram sugeridos mHAgS relacionados com a indução de GVHD, mas o seu número total e complexidade permanecem incertos. Experiências genéticas realizadas em ratos indicam muitos mHAgS, mas foram identificados apenas alguns genes. Nos seres humanos, clones de linfócitos T reactivos com mHAgS específicos, combinados com análise de ligação genética, foram aplicados para identificar dois loci distintos num único doente, em que cada locus codificava um antigénio apresentado a um clone de células T pelo HLA-B7. A técnica foi sugerida para uma enumeração grosseira do número de mHAgS em seres humanos que são capazes de desencadear respostas de células T *in vivo*. Se estas respostas de células T correlacionam com a GVHD clínica ainda não é claro. (Gubarev *et al.*, *Exp. Hematol.* 1998, 10: 976-81).

Para se obter um quadro mais completo das características que qualificam uma proteína para ser designada como um mHAg humano, é útil complementar a informação disponível do sistema humano com dados recolhidos do sistema de ratos onde foram identificados mHAgS adicionais no passado. Os homólogos humanos destas proteínas revelaram ser reconhecidos por CTLs alo-reactivos, sendo o mesmo verdade para os ratos. Assim, têm sido identificados mais e mais mHAgS (Quadro 1 A e B) como alvos de uma resposta, por exemplo, utilizando clones de CTL isolados provenientes de doentes que sofrem de GVHD. Com a ajuda dos clones foi possível analisar os componentes do péptido (péptidos de ligação ao HLA) derivados dos mHAgS correspondentes e os clones de células T específicos envolvidos no seu reconhecimento.

O modelo de explante de pele humana é uma abordagem que foi sugerida como um indicador exacto de GVHD aguda e pode ser útil para detectar disparidades adicionais do mHAg. O modelo foi utilizado para prever um resultado de GVHD em 77% dos casos. Outras análises, tal como a análise de células T auxiliares reactivas ao hospedeiro e a frequência do precursor CTL, ajudaram a prever a ocorrência de GVHD aguda após de irmãos com HLA idêntico (Dickinson, *Transplantation* 1998, 66: 857-63).

A análise dos repertórios da região variável da cadeia alfa do receptor de células T e região variável da cadeia beta do receptor de células T revelou que a utilização do receptor de células T distorcida num período inicial (6-7 semanas) após BMT, sugerindo que as células T podem ter expandido em resposta aos antígenos alogénicos, tais como

os mHAgS, e que nas crianças os repertórios são eventualmente normalizados pela regeneração das células T através de uma via dependente de timo (Matsutani *et al.*, *Br. J. Haematol.* 2000, 109: 759-769).

Um dos mHAgS identificado em primeiro lugar foi o antigénio H-Y codificado pelo gene SMCY (Meadows *et al.*, *Immunity* 1997, 6: 273-281; Wang *et al.*, *Science* 1995, 269: 1588-1590) o qual pode desempenhar um papel na espermatogénese. Os antigénios H-Y podem levar à rejeição de enxertos de órgãos e medula óssea de seres masculinos com HLA condizente por receptores femininos, e a uma maior incidência de GVHD em enxertos de fêmea para macho, em particular se o doador feminino tiver estado grávido. Entretanto, foram identificados os genes DFFRY (Vogt *et al.*, *Blood* 2000, 95: 1100-1105) e UTY como fontes de mais antigénios H-Y (WO 97/05168, WO0077046).

Outros antigénios indutores de GVHD, nomeadamente a família HA-1, HA-2, H-4, H-5 e H-8 de proteínas, foram identificados através de um estudo retrospectivo em receptores com GVHD grave (Mutis *et al.*, *Nat. Med.* 1999, 5: 839-842).

O antigénio HA-1 foi identificado com a ajuda de CTLs restringidos a HLA-A*0201 e caracterizados quimicamente como um nonapéptido derivado de um alelo do gene KIAA0223. Ao nível do ADNc, o locus HA-1 tem dois alelos, HA-1H e HA-1R, os quais diferem em dois nucleótidos, resultando na substituição de um único aminoácido (den Haan *et al.*, *Science* 1998, 279: 1054-1057; Arostequi *et al.*, *Tissue Antigens* 2000, 56: 69-76). O isolamento e sequenciação de ADN cosmídeo que codifica a sequência do péptido HA-1

revelaram que os alelos HA-1 são codificados por dois exões e que ambos os conjuntos contêm sequências intrónicas. A tipagem do ADN genómico com dois conjuntos diferentes de iniciadores, consistindo de iniciadores específicos para os alelos e um iniciador comum, revelou três famílias consistindo de 24 indivíduos positivos para HLA-A*0201 que correlacionam em todos os casos com a classificação dos mHAg pelos CTLs e por RT-PCR. No futuro, a tipagem genómica prospectiva para os alelos HA-1 pode ajudar a melhorar a selecção do doador e a identificar receptores positivos para HLA-A*0201 com um risco elevado para GVHD induzida por HA-1 (Wilke *et al.*, *Tissue-Antigens* 1998, 52: 312-317; W09905313). O antigénio HA-2 humano é um péptido nonamérico de ligação ao HLA derivado de uma miosina de classe I (Goulmy *et al.*, US 5770201).

Foi referido que a expressão de mHAg HA-1 e HA-2 se restringe principalmente aos tecidos hematopoiéticos, incluindo as células leucémicas e precursores de células leucémicas (Mutis *et al.*, *Blood* 1999, 93, 2336-2341). Eles não são expressados em fibroblastos, queratinócitos ou células hepáticas. Isto pode explicar a razão pela qual os CTLs específicos para os mHAg HA-1 e HA-2 medeiam a morte restringida ao HLA-A*0201 de células hematopoiéticas derivadas do doador.

O HB-1 foi descrito como um outro mHAg que desencadeia reactividade CTL derivada do doador num doente com ALL de células B (B-ALL) tratado por BMT com HLA condizente. O péptido EEKRGSLHVW codificado pelo gene HB-1 foi reconhecido pelo CTL em associação com HLA-B44 (Dolstra *et al.*, *J. Exp. Med.* 1999, 189: 301-308). Uma análise adicional revelou que um polimorfismo no gene HB-1 gera uma

alteração de um único aminoácido de His para Tyr na posição 8 deste péptido. Esta substituição de aminoácido foi crítica para o reconhecimento por CTL específicos para HB-1. Foi proposto que a expressão restringida do antígeno HB-1 polimórfico pelas células B-ALL e a capacidade para gerar CTLs específicos para HB-1 *in vitro* utilizando células dendríticas carregadas com péptidos pode proporcionar a oportunidade para direccionar especificamente o sistema imunitário para células B-ALL sem o risco de suscitar GVHD.

Um outro antígeno que foi correlacionado com a GVHD é o CD31. A sequenciação directa de vários ADNc de CD31 revelou a presença de uma alteração de um único aminoácido na posição 125 da proteína. Não foi demonstrado nenhum outro polimorfismo além destes dois alelos (Behar *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 1996, 334: 286-291). Os correspondentes epítomos apresentados por HLA correlacionaram bem com as alterações de um único aminoácido reconhecidas pelos CTLs.

As observações descritas acima com os HA-1, HA-2 e os outros mHAgS sugerem que células T específicas poderiam atacar selectivamente células tumorais *in vivo* e discriminar entre mHAgS expressados por células estaminais hematopoiéticas e fibroblastos, matando apenas as primeiras. Curiosamente, poderia ser induzida remissão completa num doente tratado com células do doador T que tivessem sido tornadas 'reactivas para leucemia' *in vitro* (Falkenburg *et al.*, *Blood* 1999, 94: 1201-1208). No entanto, a base molecular para a discriminação entre antígenos indutores de GVHD e GVT permanece desconhecida e, presentemente, não existe nenhuma abordagem directa que permita a identificação de péptidos de ligação a HLA

derivados de mHAg e a sua correlação com proteínas para as quais é conhecida a estrutura bioquímica. Além disso, sabe-se pouco sobre a função das proteínas ou o número de proteínas que teriam de ser consideradas como mHAg. Ao estudar a frequência de mutações do gene do mHAg e o número de diferenças nos mHAg entre espécies de ratos foi estimado que o número total de mHAg poderia situar-se na gama de 430 a 720 genes. No entanto, tem de se reconhecer que alguns destes estudos foram realizados com modelos de rejeição de enxerto da pele, os quais são extremamente sensíveis devido à apresentação dos péptidos de mHAg por células dendríticas da pele. As células dendríticas derivadas de outros órgãos tal como o sistema hematopoiético podem apresentar os antigénios de modo diferente, podendo resultar daí um número muito menor de mHAg. As estimativas com base neste tipo de abordagem deram números na gama de 80 proteínas diferentes.

Num estudo destinado a identificar antigénios alvo para a reacção GVT contra células leucémicas, Clave *et al.* (*J. Immunother.* 1999, 22: 1-6) foi detectado polimorfismo da proteinase 3, uma proteína granulosa primária sobre-expressa na leucemia mielóide. O estudo foi realizado em 10 doentes com doenças hematológicas e seus doadores de medula com HLA idêntico. A enzima é expressada em células da linhagem mielóide mas está sobre-expressa na leucemia mielóide, incluindo CML (Molldrem *et al.*, *Blood* 1997, 90: 2529-2534; Dengler *et al.*, *Brit. J. Haematol.* 1995, 89: 250-257), e os CTLs específicos para PR1, um péptido derivado de proteinase 3, provoca eficientemente a lise de células de CML (Molldrem *et al.*, *Blood* 1997 90: 2529-2534). Num número de doentes com CML foram detectados CTLs em circulação específicos para PR1, incluindo naqueles que

foram tratados por alo-BMT, e a sua presença correlaciona com um bom prognóstico (Molldrem *et al.*, *Nat. Med.* 2000, 6: 1018-1023). Através de uma análise do polimorfismo de conformação de cadeia única por reacção em cadeia da polimerase (PCR), seguida de sequenciação directa dos produtos de PCR, foram encontrados sete polimorfismos de um nucleótido. Um deles codifica uma isoleucina ou uma valina na posição 119 da sequência de aminoácidos. Foi demonstrado que os péptidos que atravessam o sítio polimórfico, nos aminoácidos 115-124, se ligam *in vitro* à molécula de HLA-A2. 23 doentes HLA-A2 com leucemia mielóide e os seus doadores com HLA condizente foram analisados quanto à presença do polimorfismo. Não foi observada nenhuma recidiva no grupo de 4 doentes avaliáveis que possuíam pelo menos um alelo que estava ausente no seu doador, enquanto 7 dos 15 doentes avaliáveis restantes tiveram uma recaída. Estes dados suportam a possibilidade de que as respostas das células T a diferença alélicas da proteinase 3 poderiam ser utilizadas como uma base para conceber uma terapia de células T adoptivas específicas para a leucemia na leucemia mielóide aguda e crónica.

Em resumo, as abordagens actuais para identificação de novas proteínas candidatas a mHAg baseiam-se principalmente na identificação de CTLs isolados e/ou péptidos eluídos com HLA principalmente relacionados com a GVHD e, apenas ocasionalmente, estes antígenos foram definidos através das proteínas correspondentes.

Uma lista de mHAg recolhidos da literatura para ratos e o Homem é dada no Quadro 1A. Até agora não surgiu nenhuma estratégia claramente inovadora para tornar a identificação de mHAg mais previsível e rápida, pelo que os genes

candidatos a novos mHAgS humanos caracterizados através das abordagens disponíveis surgem apenas muito lentamente. Não existe nenhuma técnica na arte conhecida que permita um acesso mais fácil a novos mHAgS ou a proteínas candidatas. Eles são provavelmente um grupo variado e esquivo de fragmentos de moléculas que são derivados de proteínas que participam em várias funções de conservação celular e, em general, as localizações dos loci codificadores são desconhecidas. Alguns dos mHAgS parecem estar muito expressados em vários tecidos ao longo do corpo, enquanto outros apresentam uma distribuição no tecido limitada. Até ao presente a sua análise não está relacionada com a reactividade antileucemia mas está quase exclusivamente associada à GVHD potencialmente fatal. Isto é porque as tecnologias presentemente disponíveis são fortemente tendenciosas para mHAgS relacionados com a GVHD e é apenas esporadicamente que um mHAg é sugerido para prevenção da doença, por exemplo, indução de respostas GVT.

Curiosamente, todos os estudos para caracterização das respostas imunológicas GVHD e GVT resultaram na observação surpreendente de que os antigénios envolvidos são mHAgS com um polimorfismo limitado que surge através de mutações raras do ADN que conduzem a alterações de um único aminoácido na sequência da proteína correspondente. Além disso, é evidente que estas alterações de aminoácidos têm de ser apresentadas através de HLA de classe I para provocar respostas GVT ou GVHD. Vários clones de células T alogénicas envolvidas na GVHD foram isolados e foi demonstrado que reconhecem especificamente as alterações de um único aminoácido dos péptidos apresentados pelo HLA.

A leucemia, o linfoma e o mieloma são cancros que têm origem na medula óssea e tecidos linfáticos. As doenças resultam de uma lesão genética adquirida (não herdada) no ADN de uma única célula derivada do sistema hematopoiético, a qual se converte no clone leucémico e em seguida se multiplica continuamente. Esta proliferação sem restrições interfere com a produção de células sanguíneas saudáveis pelo corpo e torna o corpo incapaz de realizar as funções fisiológicas essenciais e de o proteger contra infecções.

Nos Estados Unidos, uma estimativa de 107 900 pessoas foram diagnosticadas com leucemia, linfoma e mieloma em 1999 e isto contribui para 11 por cento dos casos de cancro diagnosticados nos E.U. cada ano. Um total estimado de 632 000 Americanos vivem presentemente com leucemia, linfoma e mieloma. Os números disponíveis para a Europa são muito semelhantes ao que é observado nos E.U., onde a leucemia, linfoma e mieloma matarão um número estimado de 60 500 pessoas por ano. A Leucemia e os linfomas são os cancros fatais mais importantes em mulheres jovens e homens jovens com idade inferior a 35 anos.

Na fase crónica inicial, a CML caracteriza-se por uma translocação cromossómica t(9;22) (Philadelphia Chromosome, Ph) que cria o oncogene *bcr-abl*. O produto do gene quimérico é uma tirosina-cinase constitutivamente activa que é o alvo de inibidores sintéticos tal como o STI571. Em comparação com doentes afectados por outros tipos de tumores, os doentes CML continuam a possuir sistema imunitários relativamente intactos na fase crónica, e é agora crescentemente evidente que os péptidos *bcr-abl*, juntamente com outros antigénios associados à doença desconhecidos, podem ser apresentados por moléculas HLA e

reconhecidos por células T. A imunização directa de doentes com proteínas de fusão tem sido utilizada para explorar o potencial do alo-BMT no cenário clínico para fortalecer a imunidade natural ou induzida por transplante. Um ensaio inicial mostrou que uma tal vacinação é segura; alguns doentes exibiram respostas de células T específicas para o antigénio imunizante (Pinilla-Ibarz *et al.*, *Blood* 2000, 95: 1781-1787).

A leucemia aguda continua a ser um desafio formidável para o qual os tratamentos (quimioterapia, BMT e radiação) são feitos à medida segundo os perfis de risco que são deduzidos do perfil citogenético dos doentes. O BMT é reservado a doentes que reagem pouco à quimioterapia sozinha. A fim de fazer progressos em termos de curar estas doenças devastadoras, a compreensão da biologia da leucemia aos níveis clínico, celular e molecular, e especialmente a definição molecular de antigénios relacionados com a doença para a concepção de estratégias imunoterapêuticas, é um objectivo primário para permitir a erradicação do clone leucémico envolvido.

O carcinoma das células renais (RCC) representa aproximadamente 5% de todas as mortes por cancro. Na altura da apresentação, mais de 50% dos doentes já desenvolveram doença metastática localmente avançada com taxas de sobrevivência de 5 anos inferiores a 20%. Um grande número de estudos com muitas modalidades de tratamento diferentes resultou apenas em avanços menores. Nenhum agente isolado ou terapia de associação mostrou consistentemente uma proporção de resposta de 20% ou mais. As terapias à base de interleucina-2 e interferão-alfa são muito correntemente utilizadas para tratar a doença avançada, demonstrando

proporções de resposta baixas mas reprodutíveis na gama de 10% a 20%, com respostas duráveis de 5% ou menos (Nanus, *Curr. Oncol. Rep.* 2000, 2: 417-22).

Uma vez que o RCC é susceptível a imunoterapia à base de citocinas ou interferão, existem boas razões para acreditar que estão envolvidas células T específicas na eliminação de células tumorais autólogas (Schendel *et al.*, *J. Mol. Med.* 1997, 75: 400-413). Recentemente foram isoladas células T específicas para o tumor a partir de linfócitos que infiltram o RCC humano pelo ensaio de captura de IFN-gama (Becker *et al.*, *Nat. Med.* 2001, 7: 1159-1162). No entanto, devido ao conhecimento incompleto dos antigénios de RCC e seus péptidos correspondentes apresentados pela classe I, o papel de células T nas imunoterapias de interferão-alfa do RCC é mal compreendida.

A identificação de novos antigénios que possam ser úteis para a imunoterapia de RCC permanece uma prioridade elevada. Os métodos para identificação de antigénios que são relevantes no RCC foram descritos ao nível da transcrição bem como no nível de expressão da proteína. A comparação das proteases de rim não canceroso e de RCC por electroforese de gel bidimensional (2-DE) e revelação com prata revelou padrões de proteína acentuadamente diferentes (aproximadamente 800 manchas nos RCCs contra aproximadamente 1400 manchas no rim normal). A imunotransferência 2-DE revelou cinco manchas específicas para RCC, reprodutivelmente reactivas como soros de doentes RCC mas não com os de doadores saudáveis. Dois destes antigénios foram isolados por 2-DE preparativa e foram identificados como proteína 22-alfa do músculo liso (SM22-alfa), uma proteína de ligação à actina de função

desconhecida predominantemente expressada nas células do músculo liso. A hibridação in situ revelou que o SM22-alfa não é expressado nas células malignas mas nas células mesenquimais do estroma tumoral. O segundo antigénio representa a anidrase carbónica I, uma isoforma geralmente não expressada no rim. Curiosamente, uma isoforma diferente (CAXII) foi anteriormente identificada por clonagem de expressão serológica como um antigénio sobre-expresso em alguns RCCs. Os anticorpos contra o CAI recombinante ou SM22-alfa foram detectados nos soros de 3 de 11 ou 5 de 11 doentes RCC, respectivamente, enquanto os soros de 13 indivíduos saudáveis não reagiram. Em conclusão, os métodos serológicos podem ser uma ferramenta útil na análise de proteoma e podem contribuir para a identificação de antigénios associados a tumores renais. No entanto, continua a existir a necessidade para identificar antigénios de RCC relevantes e, especialmente, tem de ser demonstrada a relevância destes antigénios para vacinação contra o cancro.

Esta situação no RCC espelha o estado para várias outras doenças de tumores sólidos, onde foram entretanto definidos um número total de 60 antigénios de proteína diferentes correspondentes a 178 epítomos. Um grande número destes antigénios e os epítomos de células T correspondentes foram utilizados em vários protocolos de vacinação, formulações adjuvantes e sistemas de apresentação à base de células para melhorar a resposta imunológica. No entanto, independentemente do protocolo e antigénio envolvidos, os resultados obtidos têm sido muito comparáveis: activação de células T sem resposta clínica. Assim, as vacinas podem, um dia, desempenhar um papel importante em terapia, contudo as respostas imunológicas observadas em estudos clínicos não

foram traduzidas, até à data, em benefícios de sobrevivência significativos.

O potencial imunoterapêutico do alo-BMT, como descrito acima para a leucemia, foi entretanto explorado com outras doenças, tais como distúrbios de deficiência enzimática, anemia de Fanconi e talassemia major. Isto foi essencialmente possível através da experiência clínica crescente e por se ter tornado evidente que a abordagem de alo-BMT também podia ser utilizada para a imunoterapia de tumores sólidos metastáticos tal como o RCC. Num estudo publicado recentemente (Childs *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2000, 343: 750-758) foi aplicado o transplante de células estaminais alogénicas não mieloablativas para induzir regressão sustentada de RCC metastático em doentes submetidos sem sucesso a terapia de citocinas convencional. Dez dos 19 doentes (53 por cento) alistados no estudo tinham uma resposta mensurável e 3 doentes tinham respostas completas, sustentadas. Embora estes resultados sejam promissores e devam encorajar estratégias de tratamento semelhantes para serem utilizadas contra outros tumores metastáticos, o procedimento de Childs *et al.* não é completamente satisfatório porque a regressão do tumor nalguns doentes foi acompanhada de GVHD grave. Dois doentes morreram depois de receber este tratamento. Embora o procedimento necessite de mais afinação para minimizar as complicações e melhorar a sua eficácia, a prova do princípio já está à mão: as células T alogénicas podem erradicar células renais cancerosas e os linfócitos do doador podem sobreviver no hospedeiro após condicionamento não mieloablativo. A mensagem mais geral deste estudo é, contudo, que o alo-BMT é extensível ao tratamento de tumores sólidos. O progresso futuro na terapia de tumores

sólidos, tal como o RCC, dependerá do estabelecimento de imunoterapia antitumoral mais segura e melhor controlada que esteja isenta de respostas GVHD.

O transplante de medula óssea partilha muitos aspectos com o transplante de órgãos sólidos, tais como rim, coração, fígado e pulmão, onde a transferência de órgãos também permanece o tratamento de eleição para vários estados patológicos. Embora o progresso recente no que se refere ao desenvolvimento de melhores fármacos imunossuppressores tenha melhorado a sobrevivência a curto prazo de aloenxertos, a rejeição imunológica continua a ser um obstáculo à sobrevivência a longo prazo. Foi acumulada evidência considerável que indica que as disparidades no órgão do doador e o doente, nomeadamente as disparidades de mHAg, afectam a sobrevivência do órgão sólido e promovem a GVHD. Assim, os doentes que experimentam uma sobrevivência ao enxerto a longo prazo continuam a ter um mau prognóstico com apenas 40% dos rins a sobreviver mais do que dez anos. O papel das disparidades de mHAg na perda eventual destes enxertos é conhecida e objecto de discussão. Deste modo, o transplante de órgãos e especialmente o transplante renal é uma outra aplicação que pode beneficiar do alo-BMT e da identificação de alo-antigénios específicos para o alelo.

Cosimi *et al.* do Massachusetts General Hospital discutiram que os rins transplantados podem ser implantados depois de dar aos receptores medula óssea do doador, criando desse modo um estado de quimerismo de células T nos doentes (N. Engl. J. Med. 2002, 346:2089-92). Em teoria, os linfócitos do doador migrarão para o timo, juntamente com o antigénio do órgão do doador, e induzirão tolerância no novo rim. Num cenário ainda mais orientado para o futuro, o processo de

indução de tolerância pode ser suportado por vacinação com os alo-antigénios renais apropriados que terão de ser identificados, preparados e administrados de acordo com a presente invenção. Uma forma intermediária do tratamento do futuro pode compreender o transplante alo-BMT além do transplante renal, em que ambos os enxertos são provenientes do mesmo doador.

O polimorfismo de um único nucleótido (SNP) foi definido como uma disparidade entre duas sequências de ADN (Stoneking, *Nature* 2001, 409: 821-822) e refere-se a uma variação na sequência de um gene no genoma de uma população que surge como o resultado de uma alteração de uma única base, tal como uma inserção, supressão ou, preferencialmente, como aqui utilizada, uma alteração numa única base que leva a uma alteração de um aminoácido. Os SNPs manifestam-se como alelos mendelianos diferentes para um gene. Um locus é o sítio em que ocorre divergência.

A alteração da base do nucleótido, como entendida na presente invenção, refere-se à porção de codificação do genoma e resulta na incorporação de um aminoácido alternativo na proteína correspondente. A troca de aminoácido pode afectar modificações pós-tradução do referido aminoácido, por exemplo, glicosilação. Assim, SNP refere-se à ocorrência de duas ou mais sequências ou alelos alternativos geneticamente determinados numa população e pode manifestar-se ou ser detectado como diferenças nas sequências de ácidos nucleicos, expressão de genes (incluindo, por exemplo, transcrição, processamento, tradução, transporte, processamento de proteína, trânsito), síntese de ADN, proteínas expressadas, outros produtos

genéticos ou produtos de vias bioquímicas ou modificações pós-tradução manifestadas entre membros de uma população.

Os SNPs como apresentados na técnica foram principalmente discutidos em relação à função da proteína alterada. No entanto, a descoberta de SNPs funcionalmente relevantes entre 3 mil milhões de bases de ADN e distingui-los dos alguns milhões de novos SNPs sem nenhuma função útil é uma tarefa imensa e um dos desafios principais da investigação pós-genómica. Enquanto a geração de informação SNP funcionalmente relevante está a progredir continua mas lentamente, a informação total no que se refere ao número total de SNP humanos e a atribuição a genes individuais está disponível de várias bases de dados tais como dbSNP, CGAP, HGBASE, JST e Go!Poly etc. as quais recolhem e exploram os dados de SNPs estabelecidos nos E.U., países Europeus, Japão e China. Empresas como a Celera estão a criar e a vender ferramentas para identificar SNPs e terão um mapa de ligação com base em SNP do genoma humano criado no final do ano de 2002. A base de dados de SNP da Celera baseia-se em sequências de ADN de 40 ou 50 indivíduos e utiliza essa informação para rastrear os SNPs. O acesso a estes dados permitirá a atribuição a um gene específico e permitirá prever no futuro os SNPs relevantes para doenças.

A apresentação de antígenos baseia-se em duas vias distintas, uma via exógena de HLA de classe II e uma via endógena de HLA de classe I. As moléculas de classe I são codificadas pelos loci HLA-A, B e C e considera-se que activam principalmente células T CD8⁺ citotóxicas. As moléculas HLA de classe II são codificadas pelos loci DR, DP e DQ e activam principalmente as células T CD4⁺, ambas células auxiliares e células citotóxicas.

Um indivíduo "normal" tem seis moléculas HLA de classe I, geralmente duas de cada um dos três grupos A, B e C. Consequentemente, todos os indivíduos têm a sua própria selecção de moléculas HLA de classe II, mais uma vez duas de cada um dos três grupos DP, DQ e DR. Cada um dos grupos A, B, C e DP, DQ e DR estão novamente divididos em vários subgrupos. Todos os produtos genéticos são extremamente polimórficos. Assim, indivíduos diferentes expressam moléculas HLA distintas que diferem das de outros indivíduos. Esta é a razão para as dificuldades em descobrir doadores de órgãos de HLA condizente para transplantes. O significado da variação genética das moléculas de HLA em imunobiologia é reflectido pelo seu papel como genes imuno-reactivos. Através da sua capacidade de ligação a péptidos, a presença ou ausência de determinadas moléculas de HLA governa a capacidade de um indivíduo para responder a epítopos peptídicos. Como uma consequência, as moléculas de HLA determinam a resistência ou a susceptibilidade a doenças.

A expressão do HLA de classe II está restringida às APCs. Isto é coerente com as funções dos linfócitos T auxiliares, os quais são activados localmente em qualquer parte que encontrem APCs (macrófagos, células dendríticas ou células B) que tenham incorporado e processado antigénios produzidos por organismos patogénicos.

As moléculas do MHC (HLA) de classe I são expressadas em todas as células nucleadas do corpo e fazem parte do mecanismo de defesa imunológica principal contra vírus e outros agentes patogénicos intracelulares. Eles são reunidos como heterodímeros de uma cadeia de classe I (HLA-

A, -B, -C) e de microglobulina $\beta 2$ solúvel que ligam péptidos gerados pelo processamento do antígeno no interior da célula e transportam estes péptidos até à superfície da célula onde podem ser reconhecidos por CTLs através do receptor de células T.

As vias das classe I e classe II não são totalmente distintas. Por exemplo, sabe-se que as células dendríticas, e em certa medida os macrófagos, são capazes de efectuar a endocitose (pinocitose) de proteínas extracelulares e subsequentemente apresentá-las no contexto de MHC de classe I. Foi demonstrado que os antígenos exógenos também são capazes de entrar na via de classe I (Rock, et al., Immunol. Today, 1996, 17:131-137). Isto pode ser conseguido utilizando vias de administração especializadas, por exemplo acoplando os antígenos a esferas de óxido de ferro, e parece ser um mecanismo central, devido à importância de uma expressão concomitante dos MHC de classe I e classe II na mesma APC para obter um aglomerado de tipo três células. Este aglomerado de interacção de tipo três células foi proposto por Mitchison et al. (Eur. J. Immunol., 1987, 17: 1579-83.) e mais tarde por outros autores. Eles mostraram a importância da apresentação concomitante dos epítomos de classe I e classe II na mesma APC. Segundo o mecanismo recentemente descrito para activação de CTL (Lanzavecchia, Nature 1998, 393: 413-414, Matzinger, Nat. Med. 1999: 616-617), os APCs profissionais que apresentam o antígeno via MHC de classe II são reconhecidos por células T auxiliares. Isto resulta numa activação dos APC (mediada por interacção do ligando CD40 nas células T auxiliares e o CD40 nas APC) e permite que as APC estimulem directamente os CTLs que são, desse modo, activados.

Foi anteriormente demonstrado que a inserção de um epítopo de células T auxiliares restringido pelo MHC de classe II estranho num auto-antigénio resulta na geração de um antigénio capaz de induzir respostas de anticorpo reactivas cruzadas fortes dirigidas contra o auto-antigénio não modificado (cf. WO 95/05849 do requerente). Foi demonstrado que a indução do auto-anticorpo é provocada por células T auxiliares específicas induzidas pelo epítopo estranho inserido e espera-se que os auto-antigénios modificados - com a ajuda do adjuvante apropriado - sejam capazes de induzir uma resposta CTL forte contra auto-epítopos restringidos por MHC de classe I. Assim, a tecnologia descrita na WO 95/05849 pode ser adaptada para proporcionar igualmente estratégias de vacinação contra antigénios intracelulares e outros antigénios associados a células que têm epítopos apresentados no contexto de MHC.

Os motivos de ligação de HLA para os alelos de classe I encontrados mais frequentemente (HLA-A1, -A2, -A3, -A11, -A24, -B7) bem como aqueles para várias moléculas de classe II principais foram descritos (Rammensee et al., *Immunogenet.* 1995; 41: 178-228; Ruppert et al., *Cell* 1993; 74: 929-937; Kubo et al., *J. Immunol.* 1994; 152: 3913-3924, Kondo et al., *Immunogenet.* 1997; 45: 249-258; Southwood et al., *J. Immunol.* 1998, 160: 3363-3373; Geluk et al., *J. Immunol.* 1994; 152: 5742-5748). Um motivo de ligação caracteriza-se pela necessidade de aminoácidos de um certo tipo, por exemplo, aqueles que são portadores de grupos laterais grandes e hidrófobos ou carregados positivamente, em posições definidas do péptido, de modo a ser conseguida uma adaptação justa com as bolsas da cavidade de ligação ao HLA. O resultado disto, em conjunto com a restrição do tamanho do péptido de 8 a 10 aminoácidos dentro da cavidade

de ligação, é que é muito improvável que um péptido que se ligue a um tipo de moléculas de HLA de classe I também se ligue a um outro tipo. Assim, por exemplo, pode ser muito possível que o motivo de ligação ao péptido para os subgrupos HLA-A1 e HLA-A2, os quais pertencem ambos ao género de classe I, sejam tão diferentes quanto os motivos para as moléculas HLA-A1 e HLA-B1.

Pelas mesmas razões, é improvável que exactamente a mesma sequência de aminoácidos esteja localizada na cavidade de ligação das várias moléculas de classe II. No caso de moléculas de HLA de classe II, as sequências de ligação dos péptidos podem ser mais compridas, e determinou-se que geralmente contêm 10 a 16 aminoácidos, alguns dos quais, em um ou ambos os terminais, não fazem parte do motivo de ligação à cavidade do HLA.

Pode ocorrer uma sobreposição dos diferentes motivos de ligação a péptidos das várias moléculas de HLA de classe I e classe II. Os péptidos que têm uma sobreposição nas sequências de ligação para pelo menos duas moléculas de HLA diferentes são ditos conter "epítomos embutidos de células T". Os vários epítomos contidos num "péptido de epítomos embutidos" podem ser formados pelo processamento do péptido por APCs e, subsequentemente, podem ser apresentados às células T através de moléculas de HLA diferentes. A variedade individual de moléculas HLA nos seres humanos tornam os péptidos contendo epítomos embutidos mais úteis como vacinais gerais do que os péptidos que são apenas capazes de ligação a um tipo de molécula de HLA.

A vacinação eficaz de um indivíduo só pode ser conseguida se pelo menos um tipo de molécula de HLA de classe I e/ou

classe II no doente pode ligar um péptido da vacina no seu comprimento total ou após processamento pelas APC do próprio doente.

A utilidade de um péptido como uma vacina geral para a maioria da população aumenta com o número de moléculas de HLA diferentes que aquele pode ligar, no seu comprimento total ou após processamento por APCs. Através da identificação de grupos de péptidos associados a antigénios que são portadores destes motivos e que se ligam às várias moléculas de HLA, poderia oferecer-se protecção à maioria da população humana (>80%) relativamente ao desenvolvimento de imunoterapia à base de epítomos de células T para tumores.

A fim de utilizar péptidos derivados de uma proteína codificada por versões alélicas de um gene como vacinas ou agentes anticancerígenos para gerar células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$ antitumorais, é necessário investigar a proteína mutante em questão e identificar péptidos que sejam capazes, possivelmente após processamento em péptidos mais curtos pelas APC, para estimular as células T.

Em general, os tumores são muito heterogéneos com respeito às alterações genéticas encontradas nas células tumorais. Isto implica que o efeito terapêutico potencial e a potência profiláctica de uma vacina contra o cancro aumentará com o número de alvos contra os quais a vacina seja capaz de desencadear uma imunidade de células T. Uma vacina de múltiplos alvos também reduzirá o risco da formação de novos tumores por fuga ao tratamento de variantes do tumor primário.

É explícito que a apresentação de epítomos de células T (fragmentos de péptidos) em moléculas de HLA de classe I é não só uma característica para reconhecimento de células mas também um pré-requisito para examinar e matar células tumorais e outras células portadoras de alo-antigénios por células T específicas.

Em mais pormenor, para a geração de epítomos, as proteínas correspondentes têm de ser dissociadas por proteassomas em péptidos com aminoácidos C-terminais específicos. Os fragmentos dissociados têm de ser transportados pelas chamadas moléculas TAP (transportadores associados ao processamento do antigénio) para o retículo endoplasmático onde ocorre a ligação ao HLA quando os fragmentos contêm motivos adequados para ligação ao HLA. Assim, é um pré-requisito que os péptidos alvo candidatos para imunoterapia, contendo o motivo apropriado para ligação ao HLA, sejam dissociados pelo proteossoma no aminoácido C-terminal correcto. Para determinar experimentalmente a dissociação apropriada por proteossomas de proteínas candidatas, foram desenvolvidos ensaios de dissociação *in vitro* (4-24 h) utilizando proteassomas 20S celulares purificados e combinados com a análise de péptidos por espectrometria de massa. Os resultados dessas experiências indicam que a combinação da digestão por proteossomas com estudos de ligação é útil para definir péptidos alvo candidatos para imunoterapia e o especialista poderá beneficiar do PAPProC (<http://www.paproc.de>), um algoritmo de previsão desenvolvido para avaliar a dissociabilidade geral de proteínas ligadas a doenças.

Até à data foi identificado um grande número de epítomos CTL e, como referido antes, eles têm motivos comuns com um

comprimento e composição de aminoácidos preferidos em certas posições. Os motivos predizíveis foram utilizados para conceber programas de computador que traduzem a sequência de aminoácidos de uma dada proteína em epítomos CTL. É particularmente útil para os imunologistas que trabalham na previsão de ligandos de MHC de classe I e em epítomos de CTL utilizarem o SYFPEITHI em <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com>) ou alternativamente o BIMAS em <http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla-bind/>.

As investigações in vivo de respostas de células T podem estar restringidas pela dificuldade em identificar células T específicas para antígenos entre uma pletora de células não específicas. Esta dificuldade é, em grande medida, devida à baixa afinidade das interações entre o receptor de células T (TCR) e o seu ligando natural, o complexo HLA-péptido. A multimerização de complexos HLA-péptido conhecida como tecnologia de tetrâmeros pode superar estes problemas técnicos aumentando a afinidade global da interacção TCR-HLA até uma extensão em que esses complexos possam ser utilizados como reagentes para detecção específica aos epítomos de células T.

A geração de complexos solúveis de HLA de classe II-péptido não está tão bem estabelecida, possivelmente devido à estrutura mais complexa da cavidade de ligação do péptido de classe II. A expressão e redobrimento in vivo em células de insectos e a utilização de epítomos de péptidos ligados covalentemente são abordagens promissoras para superar estes problemas técnicos.

A revelação com tetrâmero é extremamente específica para o epítomo e até mesmo populações muito pequenas podem ser

identificadas directamente ex vivo com esta técnica. Além da análise de frequência exacta, estes reagentes permitem uma caracterização fenotípica e funcional detalhada de populações de células T específicas em relação ao epítopo ao nível de uma única célula, por exemplo a expressão de marcadores de superfície, a determinação de perfis de citocinas e análises de repertórios de TCR. A cinética de ligação de complexos tetraméricos HLA-péptido parece ser uma ferramenta útil para medir as afinidades relativas de células T específicas em relação ao epítopo para o seu ligando. Além da compreensão básica e da quantificação de respostas imunológicas mediadas pelas células T que se tem tornado possível com tetrâmeros, a tecnologia pode ser utilizada em alo-BMT para a eliminação de células T auto-reactivas envolvidas na GVHD.

A previsão teórica de um epítopo de CTL com a ajuda dos programas de previsão conhecidos só pode, contudo, ser realizada para antigénios conhecidos. Assim, a identificação de proteínas portadoras de epítopos reconhecidos por células T protectoras é uma matéria chave no desenvolvimento de vacinas. Se o péptido reconhecido pelas células T foi gerado por moléculas de classe I eluídas, o desenvolvimento posterior para uma vacina à base de péptidos pode ser um projecto moroso. É o objectivo desta invenção fechar a referida lacuna relativamente à previsão de antigénios de proteína relacionados com cancro e GVHD.

A WO 00/42181 descreve antigénios de histocompatibilidade menores e a sua utilização no diagnóstico e tratamento de tumores incluindo um estojo para detectar variante alélica

discordante num único aminoácido relacionada com um SNP compreendendo iniciadores não sobrepostos.

O objectivo especial deste pedido de patente é identificar e caracterizar alo-antigénios, tais como mHAg, e determinar o seu papel nas GVT, GVHD e rejeição de transplantes de órgãos sólidos.

Para este fim, nós desenvolvemos novas abordagens para identificar e caracterizar alo-antigénios e a resposta imunológica aos mesmos. Outros tópicos relevantes incluem, mas não se limitam, à identificação de loci e alelos genéticos que codificam alo-antigénios e mHAg e ao melhoramento de técnicas para determinar o número total de antigénios de mHAg/loci e alelos de mHAg envolvidos. A identificação de antigénios de mHAg/mHAg imunodominantes inclui a avaliação de péptidos antigénicos e do seu papel na terapia e doença bem como a sua relevância com respeito à abundância relativa, afinidade do péptido para o HLA e a indução da acção citotóxica das células T. Além disso, poderiam ser estudados correlativos *in vivo* da função imune de péptidos *in vitro* para determinar se os péptidos imunodominantes identificados *in vitro* funcionam de modo semelhante *in vivo*. Também pode ser estudada a expressão relativa no tecido de vários alo-antigénios ou mHAg e o impacto da sua distribuição diferencial no tecido na rejeição de transplantes.

Esta informação compreensiva será utilizada para identificar abordagens para melhorar as respostas GVT como observadas após BMT, para melhorar a sobrevivência do enxerto. O âmbito de investigação que suporta este pedido de patente inclui, mas não se restringe, às seguintes

grandes áreas de interesse e aos exemplos específicos de investigação. Estes exemplos não se destinam a ser directivos, mas ilustrativos de áreas que têm ainda de ser mais exploradas.

Sumário da invenção

A invenção envolve a descoberta surpreendente de vários genes que codificam polimorfismo de um único nucleótido (SNPs), alguns anteriormente conhecidos e os restantes anteriormente desconhecidos, os quais são expressados em indivíduos que têm cancro. Um aspecto mais geral da presente invenção descreve pela primeira vez um método generalizado para definir um grupo de antigénios de proteína funcionalmente heterogéneos relacionados com a indução de respostas imunológicas GVHD e GVT, os quais foram até agora resumidos como mHAgS. Os referidos mHAgS pertencem ao grupo de alo-antigénios que não tinham, até agora, estado acessíveis a um esquema generalizado de identificação: De acordo com a presente invenção foi estabelecido um método universal que ajuda a dissecar o grupo de alo-antigénios naqueles que são responsáveis pela geração de GVHD e naqueles que conferem GVT. É ainda reivindicado que as variantes alélicas com um único aminoácido discordante resultantes de SNPs codificadores nos genes são apresentadas por células cancerosas e que os referidos antigénios são reconhecidos por células T alo-reactivas (do doador) no contexto de moléculas HLA que levam à destruição da referida célula.

SNP codificador num gene significa uma alteração de um único aminoácido numa proteína e são hereditários e únicos para um dado indivíduo. Os doentes submetidos a transplante ou aqueles que foram agendados para transplante de medula

óssea ou transferência de células estaminais a partir de um doador não singénico por razões terapêuticas representam um estado quimérico com respeito aos produtos genéticos que apresentam uma alteração de um único aminoácido codificado por um SNP e às células T alo-reactivas específicas para o referido epítipo de células T. Como uma consequência, os produtos dos genes são reconhecidos pelo sistema imunitário (do hospedeiro) derivado do doador e, consequentemente, constituem uma base para diagnóstico, seguimento e terapia.

Exposta abreviadamente, a presente invenção proporciona um novo conceito com respeito à definição geral de alo-antigénios que accionam a GVT e ou GVHD e um objectivo principal da invenção é obter péptidos correspondentes a fragmentos peptídicos de proteínas com uma alteração de um único aminoácido produzidos e apresentados por células cancerosas que possam ser utilizados para estimular as células T. É digno de nota que a base molecular da substituição de um único aminoácido nesta invenção se baseia numa diferença alélica, envolvendo uma substituição conservativa de um único aminoácido numa proteína normal, e faz parte da invenção determinar se um indivíduo necessitado de BMT, ou que já foi submetido a BMT, é portador da referida troca de aminoácido numa dada proteína ou não. É ainda um aspecto da presente invenção determinar se a referida proteína é principalmente e ou selectivamente expressada em células que representam tecidos cancerosos ou tecidos normais.

Um outro objectivo da invenção é determinar e, quando necessário, isolar células T derivadas do doador que reconhecem as referidas diferenças de um único aminoácido apresentadas em células alvo. As referidas células T podem

ser determinadas como sendo específicas para células cancerosas e utilizadas terapêuticamente, ou podem ser determinadas como sendo específicas para antígenos de proteína oncoproteínas e, por conseguinte, podem ser identificadas como estimuladoras de GVHD.

Alguns dos peptídeos obtidos pelos métodos da invenção são determinados como possuindo uma distribuição disseminada pelo tecido e são indutores de GVHD e podem, deste modo, ser utilizados como indutores da tolerância imunológica, enquanto aqueles como expressados exclusivamente estimularão respostas GVT e são úteis para imunoterapia específica da doença.

Os métodos de acordo com a invenção permitem desenvolver uma terapia para cânceres com base na imunidade de células T, as quais podem ser induzidas nos doentes por alo-BMT e/ou estimulando as suas próprias células T ou as células T do doador quer *in vivo* quer *in vitro* com os peptídeos segundo a invenção para induzir uma resposta citotóxica de células T e superar a tolerância imunológica.

Os métodos da invenção permitem desenvolver uma vacina para prevenir o aparecimento ou erradicar cânceres com base unicamente ou parcialmente em peptídeos correspondentes aos peptídeos da presente invenção o que pode ser conseguido gerando e activando a actividade citotóxica das células T contra células portadoras de genes alterados num único nucleótido e os peptídeos substituídos num único aminoácido.

Os métodos da invenção permitem conceber um tratamento ou profilaxia anticancerígena especificamente adaptado a um indivíduo humano necessitado desse tratamento ou

profilaxia, o qual compreende administrar pelo menos um péptido ou mais péptidos de acordo com esta invenção.

A expressão normal no tecido de proteínas substituídas num único aminoácido relaciona-se com a prevenção e tratamento de GVHD, enquanto a expressão associada a doença ou específica para órgãos seleccionados e/ou células cancerosas relaciona-se com uma resposta terapêutica das células T. De acordo com este aspecto da invenção, é particularmente útil determinar diferenças respeitantes à proteína substituída com aminoácido num espécimen proveniente do doador em comparação com um espécimen proveniente de um receptor. As diferenças doador-receptor analisadas segundo esta invenção e correlacionadas com a expressão em tecido normal fornecem um indicador forte para GVHD após BMT. Por outro lado, as diferenças doador-receptor analisadas segundo esta invenção e correlacionadas com a expressão relacionada com a doença em tecidos, órgãos e células cancerosas fornecem uma previsão forte para reactividade GVT benéfica após alo-BMT.

O grupo de péptidos correspondentes aos fragmentos de proteínas substituídas num único aminoácido provenientes de genes que codificam SNPs em células cancerosas, obtido segundo os métodos da invenção, podem ser não só utilizados para gerar células T isoladas. Além disso, os referidos péptidos podem ser utilizados para a indução de reactividade de células T no doente para matar células cancerosas portadoras de um gene com um SNP como descrito acima.

Os péptidos com aminoácido díspar obtidos pelos métodos da invenção são pelo menos 8 aminoácidos de comprimento e

correspondem, no seu comprimento total ou após processamento por APCs, aos produtos genéticos correlacionados com os SNP, ou a fragmentos destes, produzidos por uma célula relacionada com a doença num doente humano afectado com cancro. Um péptido segundo esta invenção é caracterizado por a) ter pelo menos 8 aminoácidos de comprimento e ser um fragmento de uma proteína substituída num único aminoácido resultante do referido SNP codificador num gene de uma célula cancerosa; b) compreender a substituição de um único aminoácido como parte da sequência da proteína codificada pelo referido gene; e c) induzir, no seu comprimento total ou após processamento por APCs, respostas de células T.

Os péptidos contêm preferencialmente 8 até 25, 9 até 20, 9 até 16, 8 até 12 ou 20 até 25 aminoácidos. Por exemplo, eles podem conter 9, 12, 13, 16 ou 21 aminoácidos.

É muito preferido que os péptidos obtidos pelos métodos da invenção tenham pelo menos 9 aminoácidos de comprimento, por exemplo, 9 até 18 aminoácidos de comprimento, mas, devido à possibilidade de processamento intrínseco das APC, também são adequados péptidos mais compridos para criar péptidos complexados com HLA. Assim, a sequência total de aminoácidos de uma proteína portadora de uma ou mais substituições de um único aminoácido pode ser utilizada como o péptido ou proteína de acordo com a presente invenção, se compreender 8 aminoácidos ou mais. É importante mencionar que uma molécula de ADN que codifique um tal polipéptido também poderia ser utilizada para expressar e apresentar o péptido inventivo.

A fim de determinar se os péptidos obtidos pelos métodos da invenção são utilizáveis nas composições e métodos de acordo com a presente invenção, deverão ser realizados os passos seguintes:

1). Identificar genes específicos para células cancerosas que são selectivamente expressadas ou sobre-expressadas na referida célula. Analisar se os referidos genes são polimorfos com respeito a um único nulceótido específico para o alelo que codifica uma troca de aminoácido no produto do gene.

Determinar de acordo com o perfil de expressão selectivo ou lato de um gene se os péptidos assim identificados são úteis no tratamento ou profilaxia de cancro ou na prevenção de GVHD.

2) Determinar se a parte polimorfa do péptido que representa o único aminoácido díspar, no seu comprimento total ou como fragmentos mais curtos, se adapta à definição de epítomos de células T de HLA de classe I T, necessária para estimular células T.

Opcionalmente, pode ser adicionado um outro passo como se segue:

3) Determinar péptidos contendo epítomos embutidos para várias moléculas de HLA de classe I e/ou HLA de classe II principais e utilizar estes péptidos para estimular ou inibir as células T.

Em resumo, é um aspecto essencial da invenção identificar péptidos codificados por SNP que são fragmentos de

proteínas e os quais são epítomos de células T, ou seus derivados, possuindo propriedades funcionais ou imunológicas intrinsecamente relacionadas com alo-reactividade, em que a diferença imunológica é determinada por uma ou mais alterações de um único aminoácido codificado por um SNP dentro do referido epítomo de células T. É ainda um aspecto da presente invenção que com métodos correntes estabelecidos, conhecidos do especialista seja agora possível identificar novos alo-antigénios relevantes responsáveis pela indução de resposta alo-imunológica como associados com mHAgS, antigénios de GVHD, antigénios de GVT e antigénios de hospedeiro contra enxerto. Com base nos métodos e péptidos aqui descritos podem ser produzidos sondas ou iniciadores genéticos os quais podem ser utilizados para seleccionar os alo-antigénios, especialmente os SNPs, no gene que codifica a versão alélica de um único aminoácido da proteína. Além disso, a invenção proporciona um método para determinar o estado alélico de um indivíduo relativamente a um gene polimórfico através da (a) obtenção de uma amostra de ácido nucleico apropriado do indivíduo e (b) determinação se a amostra de ácido nucleico do passo (a) é, ou é derivada de, um ácido nucleico que codifica um alo-antigénio definido por SNP para, desse modo, determinar se um indivíduo é portador de uma ou de outra versão alélica do gene de alo-antigénio definido por SNP.

Esta invenção também proporciona oligonucleótidos de pelo menos 15 nucleótidos capazes de hibridizar especificamente com uma sequência de nucleótidos presente num ácido nucleico que codifica uma versão alélica do SNP que leva à troca de um único aminoácido e oligonucleótidos de pelo menos 15 nucleótidos capaz de hibridizar especificamente

com uma sequência de nucleótidos presente no ácido nucleico (a outra versão alélica) que codifica a outra troca de aminoácido sem hibridação com um ácido nucleico que codifica o outro alelo.

A invenção proporciona ainda um método para determinar se um indivíduo pode beneficiar do alo-BMT para terapia de cancro o qual compreende (a) obter uma amostra apropriada de ácido nucleico do indivíduo; e (b) determinar se a amostra de ácido nucleico do passo (a) é, ou é derivada de, um ácido nucleico que codifica uma e/ou outra versão da proteína alélica para, desse modo, determinar se um indivíduo tem uma predisposição para uma resposta GVHD ou GVT.

Um aspecto específico da invenção refere-se a uma expressão e distribuição selectiva da referida variante de proteína alélica codificada pelo SNP e os péptidos aqui descritos podem ser utilizados para produzir agentes terapêuticos selectivos como necessário para combater doenças tais como cancro e/ou GVHD. A melhoria da resposta imunológica do doente, ou de facto do doador, com o alo-antigénio identificado de acordo com esta invenção poderá contribuir para melhorar significativamente as imunoterapias. Para proporcionar imunidade protectora num doente, poderá ser necessário administrar uma quantidade eficaz de um ou mais dos polipéptidos descritos na invenção em conjunto com um adjuvante. O especialista na área seleccionará este amplificador de resposta imunológica de acordo com o protocolo de imunização escolhido.

Os métodos da invenção permitem ainda proporcionar um método de tratamento de um indivíduo que tem uma

predisposição para respostas GVHD ou GVT através da introdução do ácido nucleico isolado que codifica uma e/ou a outra versão da proteína alélica ou através de uma quantidade eficaz de uma e/ou de outra versão da proteína alélica e um veículo farmacêuticamente aceitável, para, desse modo, tratar o indivíduo que está susceptível a GVHD e ou cancro.

Os métodos de acordo com a invenção permitem proporcionar um método para determinar se um indivíduo tem cancro residual após uma transferência prévia de células estaminais alogénicas ou de medula óssea, o qual compreende (a) obter uma amostra apropriada de ácido nucleico das células sanguíneas do indivíduo doente, e (b) determinar se a amostra de ácido nucleico do passo (a) é, ou é derivado de, um ácido nucleico que codifica a versão alélica da proteína herdada pelo próprio doente ou a variante alélica de doadores para, desse modo, determinar se um indivíduo tem cancro residual.

O método de acordo com a invenção permite ainda proporcionar um método para identificar um composto químico que é capaz de suprimir células incapazes de se regularem a si mesmas num indivíduo o qual compreende (a) pôr em contacto uma e/ou a outra variante alélica da versão da proteína com o composto químico sob condições que permitem a ligação entre uma e/ou a outra variante alélica da proteína e o composto químico, (b) detectar uma ligação específica do composto químico com uma e/ou a outra variante alélica da proteína, e (c) determinar se o composto químico inibe uma e/ou a outra variante alélica da proteína para identificar um composto químico que seja

capaz de suprimir células incapazes de se regular a si mesmas.

Estes e outros aspectos da presente invenção tornar-se-ão evidentes por referência à descrição detalhada que se segue e desenhos apensos. Todas as referências aqui descritas são incorporadas na sua totalidade por referência, como se cada uma fosse incorporada individualmente.

Descrição detalhada da invenção

Esta invenção introduz um novo conceito para a utilização de alo-antigénios na terapia de cancro e de transplante, em geral. A definição de alo-antigénios e o seu reconhecimento por células T é proporcionada através de epítomos de células T derivados das auto-proteínas correntes como péptidos portadores de uma alteração de um único aminoácido e a referida troca é definida por um SNP codificador, desde que a variante alélica específica do epítomo de células T definido pelo SNP não seja expressado no doador, mas seja contudo expressada e apresentada no receptor via uma molécula de HLA de classe I numa célula relacionada com a doença.

A imunidade de células T contra tumores ocorre naturalmente, como referido atrás, já que não é invulgar encontrar CTLs associados a tumores que reconhecem auto-antigénios em células cancerosas. No entanto, enquanto mais e mais antigénios e epítomos de células T são declarados como sendo alvos em todas as categorias de tumores, a resposta terapêutica de células T é geralmente curta em comparação com a resposta necessária e máxima possível, e isto é devido ao facto do repertório de células T funcionais que está disponível para responder à infecção,

imunização e aos antígenos tumorais ser modelado por mecanismos que estabelecem e mantêm tolerância imunológica para os auto-antígenos e uma maneira de superar este estado é por meio da utilização do repertório de células T de um indivíduo condizente em termos de HLA como proposto neste pedido.

É do conhecimento geral que a prevenção do ataque autoimune contra tecidos normais requer a supressão de células T que expressam receptores de células T de alta afinidade para auto-antígenos durante o processo de selecção dependente do timo do repertório de células T. Além disso, foram descritos outros mecanismos para estabelecer a falta de sensibilidade aos auto-antígenos exclusivamente presentes fora do timo e considera-se que ambos os sistemas em conjunto induzam a tolerância ao próprio. Um grande número de experiências demonstra que o encontro de antígenos tumorais por células T maduras pode resultar frequentemente na indução de tolerância devido à ignorância imunológica, anergia ou supressão física (Pardoll, 1998, *Nature Med.*, 4: 525-531, (Staveley et al., 1998). A indução de tolerância pode ser até mesmo responsável pela evasão imune do tumor e, finalmente, sustentar a razão pela qual as metodologias presentemente utilizadas para gerar a resposta terapêutica de células T específicas para o tumor *in vitro* e *in vivo* parecem falíveis. Por conseguinte, não é surpreendente que a maioria dos mais de sessenta antígenos tumorais correspondentes a várias centenas de epítomos de células T conhecidos na técnica não tenham sido úteis para induzir uma resposta imunológica antitumoral curativa, duradoura no ser humano.

Para superar a limitação geral inata aos auto-antigénios é necessário alterar o estado de tolerância de um doente, o que não é presentemente possível devido ao conhecimento insuficiente dos mecanismos que accionam a tolerância.

Na verdadeira invenção, esta fragilidade geral das actuais estratégias de vacinação contra o cancro é superada utilizando populações de células T citotóxicas que não foram suprimidas ou tornadas tolerantes por exposição prévia aos auto-antigénios dos doentes. Tais células T estão disponíveis através de doadores com HLA condizentes e já estão presentes num receptor que tenha anteriormente sofrido um alo-BMT ou um tratamento semelhante com base em sangue do cordão umbilical ou células estaminais mobilizadas do sangue.

Enquanto o alo-BMT é um método estabelecido que permite superar a tolerância imunológica, constitui uma outra invenção que o alo-BMT e ou transplante de células estaminais alogénicas seja a base para uma imunoterapia curativa com base em células T, que a ajudaria a eliminar a doença residual. A base molecular da alo-resposta está parcialmente descoberta, e uma das observações importantes é, que os doentes que sofreram alo-BMT estão muito melhores do que aqueles que não tiveram acesso a esta terapia. Os resultados e as taxas de cura conseguidos com este método orientado por células T estão entre os resultados mais impressionantes vistos em imunoterapia do cancro e o actual pedido assenta neste mecanismo poderoso.

Assinale-se que em determinadas condições relacionadas com o transplante de órgãos, o doador apresenta os epítomos de células T de aminoácido díspar polimórficos às suas

próprias células imunes e isto é sem uma troca prévia do sistema de células estaminais sanguíneas.

Um método geral para identificar alo-antigénios como variantes alélicas de péptidos ou proteínas antigénicos de uma espécie de acordo com esta invenção, requer a detecção de trocas de um único aminoácido, e compreende os passos de:

- (i) definir uma proteína ou péptido exclusivamente expressado ou sobre-expressado num tecido, órgão ou num subconjunto destes que esteja relacionado com um distúrbio;
- (ii) pesquisar uma base de dados contendo uma ou mais bibliotecas de ADN das referidas espécies quanto à presença do referido péptido ou proteína definido ou subconjunto deste, e
- (iii) identificar e seleccionar trocas de aminoácido de variantes alélicas do péptido/proteína, um produto de expressão ou um fragmento deste que é codificado por uma sequência de ADN contendo pelo menos um polimorfismo nucleico único na região de codificação,
- (iv) gerar epítomos de células T (9mero - 16mero) compreendendo o resíduo de aminoácido contendo o referido polimorfismo, e
- (v) identificar os referidos epítomos que se ligam ao complexo de proteína MHC.

Os péptidos polimorfos com aminoácido díspar exclusivamente expressados ou sobre-expressados num tecido, órgão ou célula que represente o tecido doente, caracterizam-se pela expressão de uma ou de uma multiplicidade de disparidades de aminoácido que representam as variantes alélicas de proteínas, cada uma das quais é específica para uma proteína associada à doença diferente, e em que a referida

multiplicidade é de pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 4, pelo menos 6, pelo menos 7, ou pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 de tais agentes.

Os alo-antigénios com aminoácido díspar de acordo com esta invenção são específicos para uma multiplicidade de doenças humanas tais como AML, ALL, CML, doença de Hodgkin, linfoma, mielodisplasia, anemia aplástica, carcinoma das células renais. GVHD e doença do hospedeiro contra o enxerto.

As disparidades de um único aminoácido de variantes alélicas de proteínas expressadas em tecidos não relacionados com a doença e complexadas com proteína HLA são consideradas como antigénios indutores de GVHD.

A introdução dos péptidos em doentes como uma vacina conduz a um estado em que a molécula de HLA do receptor, bem como as APCs derivadas do doador apresentam o antigénio às células T derivadas do doador (provenientes de um alo-BMT anterior). As células T do doador também podem ser expandidas e diferenciadas das células estaminais sanguíneas do doador ou podem ser retiradas directamente do doador e serem transferidas para o receptor; um procedimento geralmente conhecido como infusão de linfócitos do doador (DLI). Estas células T são prontamente activadas no doente ao confrontar-se com o antigénio apresentado no contexto do HLA. Alternativamente, a estimulação ex vivo de células T e a transferência para o doente pode ser uma outra via alternativa para gerar células T citotóxicas activadas. Por outro lado, os estados patológicos relacionados, por exemplo, com a indução de

tolerância requerem a activação apropriada das células T autólogas dos doentes.

A invenção fornece a base molecular de protocolos terapêuticos à base de alo-BMT e define péptidos antigénicos e protocolos imunoterapêuticos que induzirão uma resposta imunológica curativa semelhante ou melhor do que a observada com os protocolos presentemente aplicados, realizados contudo de uma maneira mais previsível e menos tóxica do que hoje em dia. É um elemento essencial desta invenção que a tolerância imunológica seja iludida explorando o repertório de células T de doadores com HLA condizente. Como já foi mostrado com o BMT alogénico, as respostas de células T são dirigidas contra antigénios diferentes das disparidades principais de tipo HLA as quais fazem parte da resposta GVHD e GVT.

A análise da troca conservativa de um único aminoácido, numa proteína relacionada com a doença, baseia-se no princípio geral de polimorfismos herdados geneticamente, o que requer a análise de doentes e doadores com respeito ao estado das proteínas polimórficas. A definição de alo-antigénio codificado por SNP de acordo com esta invenção implica que cada indivíduo seja portador, segundo as regras mendelianas, de um ou de outro ou de ambos as variantes codificadas por SNP de um gene e pode expressar uma ou a outra ou ambas as variantes da proteína polimórfica de aminoácido díspar caracterizadas por um ou pelo outro aminoácido numa dada posição de uma proteína.

O diagnóstico de versões alélicas de alo-antigénios com aminoácido díspar pode ser efectuada por: análise de um produto de expressão com um aminoácido alterado, ou de um

fragmento de um produto de expressão complexado com um HLA e portador da substituição de um único aminoácido, ou fazendo contactar amostras biológicas isoladas de um indivíduo com um agente que se ligue especificamente à porção de ácido nucleico modificada com o SNP, em que a molécula de ácido nucleico portadora de SNP é expressada preferencial ou exclusivamente em células do tecido ou órgão doente. Para realizar a análise o especialista concebe agentes consistindo de uma molécula de ácido nucleico compreendendo a molécula de ácido nucleico única de codificação, um ácido nucleico complementar ou um fragmento deste e efectua estudos de hibridação com o gene alvo. Alternativamente, também pode ser utilizado um anticorpo que se liga a uma variante alélica substituída num único aminoácido no produto de expressão. Também podem ser utilizados anticorpos que se ligam a um complexo de uma molécula de HLA e um fragmento da variante alélica com aminoácido díspar. De acordo com o método escolhido, é especialmente útil realizar a análise da molécula de ácido nucleico modificada com o SNP com amostras provenientes de tecidos ou órgãos, ou células relacionados com a doença. O diagnóstico e a selecção da terapia apropriada relacionada com disparidades de um único aminoácido em proteínas são preferencialmente efectuados simultaneamente para um doador e um receptor e podem ser facilmente combinados com outros diagnósticos moleculares efectuados, tal como a tipagem de HLA. Uma ferramenta útil para testar disparidades pode ser gerada organizando o ensaio no formato de uma matriz de ADN.

Além disso, de acordo com esta invenção, células imunitárias específicas derivadas do doador, nomeadamente CTLs específicas de doadores discordantes no referido

aminoácido, são habilitadas para reconhecer no receptor a variante de aminoácido numa dada posição do péptido e são capazes de induzir uma resposta citotóxica para o referido alvo celular que apresenta o referido péptido.

De acordo com a presente invenção estão a ser investigados e são descritos um número de antigénios novos, os quais podem ser não só utilizados para aperfeiçoar mais o alo-BMT e a GVT, mas também para tratar doentes. Com o repertório de células T do próprio receptor que foi determinado ser tolerante respectivamente suprimido com respeito à versão alélica homóloga expressada que representa o aminoácido codificado pelo SNP, o repertório do doador com HLA condizente contém raramente CTLs que reconhecem especificamente o epítipo de células T no contexto das moléculas de HLA de classe I e matam as células apresentadoras. Estas CTL chamadas de alo-restringidas matam selectivamente as células tumorais que expressam a versão alélica discordante de um péptido específico definido pelo SNP. Desde que o epítipo de células T definido pelo SNP represente proteínas com um padrão de expressão específico restringido ao tecido, órgão ou tumor, é visualizada a aplicação da invenção na terapia de tumores e o tratamento de outras condições, em geral. Uma vez que foi descrito na literatura um grande número de antigénios tumorais selectivamente expressados, é óbvia para os especialistas a aplicação dos ensinamentos dados nesta invenção a qualquer proteína ou sequência de ADN descrita como sendo expressada de modo específico ao tumor ou tecido ou órgão ou células.

A origem hematopoiética da leucemia, linfoma e mieloma, a origem clonal das células doentes envolvidas e o padrão de

expressão restringido de proteínas agrupadas CD são especialmente vantajosas para demonstrar o novo conceito. Tanto as células sanguíneas leucémicas como as proteínas conhecidas como proteínas agrupadas CD têm origem no sistema de formação de sangue, por exemplo, células estaminais sanguíneas. Isto torna a leucemia, linfoma e mieloma, doenças particularmente adequadas para serem avaliadas e curadas com a ajuda da presente invenção. Um outro aspecto que torna o tratamento de leucemia, linfoma e mieloma especialmente promissor é dado pelo facto de ao longo do BMT alogénico o sistema hematopoiético com origem nas células estaminais da medula dos doentes ser substituído pelas células estaminais derivadas de sangue ou pelas células estaminais da medula óssea dos dadores, as quais irão depois construir todas as células sanguíneas futuras, incluindo os linfócitos envolvidos.

Entre as doenças com uma origem cancerosa, a leucemia é um grupo preferido de doenças para ser tratado segundo esta invenção, e dentro deste grupo espera-se que os doentes com CML tenham o melhor benefício quando tratados, enquanto a terapia de AML e ALL são a segunda escolha, sendo contudo preferida relativamente ao linfoma. Entre as doenças não hematológicas, a RCC é o alvo primário para terapia e o melanoma é outra doença a ser tratada segundo esta invenção.

De acordo com esta invenção, nós utilizamos a variabilidade molecular intrínseca de antígenos até agora inexplorada para proporcionar ensinamentos para um novo esquema de caracterização generalizada de alo-antígenos, definir novos alo-antígenos e dissecar a resposta imunológica relacionada com alo-antígenos com respeito à ilusão da

GVHD e também, ao mesmo tempo, ao reforço da resposta GVT. Esta invenção satisfaz a necessidade e é um pré-requisito para desenvolver vacinas anticancerígenas eficazes e proporciona vantagens relacionadas tais como uma sobrevivência a longo prazo do transplante de medula óssea e de órgãos sólidos em receptores e o diagnóstico de cancro.

As formas de realização específicas da presente invenção referem-se à identificação de variantes alélicas de genes que codificam alterações de um único aminoácido e, mais em geral, de alo-antigénios, em que o referido método compreende:

a) Seleccionar os genes relevantes e as proteínas correspondentes, que são selectivamente expressados ou sobre-expressados num dado tecido, órgão ou tipo de célula causador de doença e são tipicamente expressados numa menor extensão ou não são expressados de todo em tecidos ou órgãos não relacionados com a doença normal.

b) Os genes pré-seleccionados de acordo com a) são perscrutados quanto à presença de SNPs anteriormente conhecidos, em que as alterações de codificação de um único nucleótido de genes individuais podem ser obtidas directamente via uma ou mais bases de dados de SNP que estão presentemente acessíveis no domínio público ou estão comercialmente disponíveis.

c) Os genes pré-seleccionados de acordo com a) sem correlação com SNPs anteriormente conhecidos em bases de dados de ADN são perscrutados comparando sequências de ADN homólogo e detectando as posições variáveis representativas

para polimorfismo de gene e proteína com um programa de alinhamento tal como o BLAST.

d) Identificação de genes polimórficos portadores de SNPs desconhecidos realizando métodos indirectos tais como alinhamento de sequências de EST/sequências de proteínas cobrindo os genes desejados, em que várias bases de dados de EST proporcionam redundância de informação de sequência no que se refere a um fragmento de sequência idêntico, fragmentos de sequências de ADN que se sobrepõem ou parcialmente idênticos permitindo a identificação de SNPs via técnicas de alinhamento de sequências e anotação do gene correspondente.

e) Validação dos genes portadores de SNPs relevantes da doença e ou de proteínas pré-seleccionadas de acordo com os métodos a-d) medindo a sua distribuição no órgão e ou tecido.

f) Determinar se os péptidos identificados, no seu comprimento total ou como fragmentos mais curtos dos péptidos, são capazes de estimular células T, localizar péptidos contendo epítomos de células T ou epítomos embutidos para as diferentes moléculas principais de HLA de classe I e ou HLA de classe II e utilizar os péptidos correspondentes para estimulação ou inibição de células T.

As aplicações de diagnóstico consideradas nesta invenção incluem, mas não se limitam a cancro e ou BMT, transplante de células estaminais e de órgãos.

Podem ser utilizadas várias técnicas, para permitir a detecção de doadores ou receptores adequados, com base na

amplificação das sequências específicas de ácidos nucleicos ou na proteína ou péptidos como descrito mais em detalhe.

De acordo com uma forma de realização, a presente invenção refere-se a um método para tipagem de alelos dos antigénios do grupo CD numa amostra compreendendo a detecção de nucleótidos polimórficos no ADNc ou ácidos nucleicos genómicos dos referidos alelos, mais particularmente os alelos do gene individual.

Numa forma de realização preferencial o referido método de tipagem será um método de tipagem de ADN genómico. Alternativamente, o referido método também pode ser um método de tipagem de ADNc.

a) Pôr em contacto os ácidos polinucleicos genómicos na amostra com pelo menos um par de iniciadores, de acordo com o que o referido par de iniciadores especificamente hibridiza para as regiões flanqueadoras compreendendo o nucleótido polimórfico nos referidos alelos, e realizar uma reacção de amplificação;

b) Para cada um dos referidos do pelo menos um par de iniciadores detectar se se forma ou não no passo a) um produto de amplificação;

c) Inferir do resultado do passo b) qual o alelo de SNP está presente na referida amostra.

De acordo com uma forma de realização preferida, a presente invenção refere-se a um método como descrito acima, caracterizado ainda por os referidos alelos dos alo-

antigénios definidos por SNP serem diferentes no alelo do doador e no alelo do receptor.

De acordo com a variabilidade do SNP do genoma humano um dado indivíduo é portador de duas cópias de um dado gene herdado dos seus pais. As cópias podem representar um par de alelos diferentes ou semelhantes como herdados, assim o especialista compreende que se pode utilizar rotineiramente a RT-PCR utilizando ARNm como uma cadeia molde ou PCR padrão utilizando ADN genómico como uma cadeia molde para diagnosticar variantes alélicas de aminoácido codificadas por SNP da presente invenção.

As células sanguíneas com um programa genético normal ou com um padrão de expressão aberrante, tal como apresentado pelas células sanguínea cancerosas, são todas portadoras de uma variedade típica de moléculas expressadas pelos leucócitos normais nas suas superfícies celulares. Os marcadores de linhagem e o marcador de diferenciação adicional na superfície das células de leucócitos são rotineiramente detectados com anticorpos monoclonais anti-leucócitos e os antigénios são designados sistematicamente atribuindo-lhes um antigénio do grupo de diferenciação (CD). Na internet estão disponíveis várias fontes de informação no que se refere a este sistema e um sítio preferido da Web para o interessado poderia ser:

<http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/Search.asp>

A norma largamente aceite para a designação formal de moléculas da superfície de leucócitos e o facto das células estaminais sanguíneas constituírem uma origem comum para todas as células sanguíneas incluindo as células sanguíneas

cancerosas torna os antigénios CD, antigénios candidatos ideais de acordo com esta invenção. Além disso, em doentes necessitados de transplante alogénico de células estaminais, todas as células que representam o sistema patológico de células sanguíneas vão ser substituídas em definitivo por um sistema de células estaminais derivadas do doador ao longo do curso de reconstrução de um novo sistema hematopoiético com a consequência de que todo o sistema imunitário e de células sanguíneas original do receptor tem de ser eliminado. A este respeito, os antigénios CD representam um único "órgão" e são extremamente úteis para colocar o conceito inventivo desta invenção em prática.

A presente invenção ensina como seleccionar, entre as várias centenas de proteínas de leucócitos conhecidas disponíveis no actual sistema CD, aquelas que são mais representativas para determinados tipos de cancros de origem sanguínea. Antigénios CD específicos e a sua correlação com doenças são dados nos exemplos e são conhecidos e utilizados pelo especialista na área. A análise de proteínas CD pré-definidas constitui a actual base para diagnosticar e classificar a fase da leucemia e dos linfomas. No entanto, é importante compreender que principalmente a invenção não se restringe à pré-selecção de antigénios de leucócitos dados neste pedido, além disso também pode ser considerado qualquer tecido, ou proteína ou grupos de proteínas selectivamente expressados.

A este respeito, a invenção proporciona proteínas CD compreendendo uma troca de aminoácido imunogénica, a qual caracteriza a parte polimórfica de um alo-antigénio solúvel e a qual é definida ao nível molecular por um SNP

codificador. As referidas proteínas CD representativas para doença e qualificadas como alo-antigénios portadores de uma troca de aminoácido foram resumidas no Quadro 2. O ensinamento geral dado neste pedido permite que os especialistas na técnica definam alo-antigénios já conhecidos na técnica ou novos alo-antigénios adicionais ainda não divulgados na técnica ou aqui mencionados, pelo que a invenção não se restringe à selecção de alo-antigénios e epítomos de células T dados no Quadro 2-5.

Numa forma de realização, o alo-antigénio solúvel definido pela invenção induz uma resposta imunológica em doentes anteriormente submetidos a alo-transplante. Numa segunda forma de realização, os antigénios induzem actividade citolítica após a sua apresentação no contexto da molécula de HLA. As sequências de aminoácidos especialmente úteis para imunização e para indução de citólise podem ser seleccionadas do grupo consistindo das sequências enumeradas no Quadro 3-5, e variantes destas. No entanto, como referido atrás, o processamento dos alo-antigénios pode ser muito variável in vivo e a extensão N- e ou C-terminal do aminoácido que representa a troca pode variar consideravelmente das sequências listadas. O especialista na área sabe como analisar a variabilidade de HLA e correlacionar a variabilidade ao nível do péptido de ligação ao HLA bem como ao nível da previsão do péptido de ligação ao HLA.

Numa outra forma de realização, o alo-antigénio solúvel definido pela invenção induz uma resposta imunológica nos doentes essencial para a indução de tolerância imunológica. A indução de tolerância imunológica é particularmente útil para antigénios relacionados com a GVHD, os quais têm sido

definidos como sendo polimorfos e amplamente expressados em vários tecidos e órgãos tais como pulmão, fígado, intestino, articulações etc. As sequências de aminoácido especialmente úteis para imunização e para indução de tolerância podem ser seleccionadas do grupo consistindo de sequências de mHAg enumeradas no Quadro 1 A, B e de sequências de HLA listadas no quadro 6, e variantes destas. Os antígenos de HLA são conhecidos na técnica e definidos como antígenos principais que accionam uma reacção alo-imunológica. Além disso, os fragmentos antigénicos dentro das moléculas estão bem documentados e estão disponíveis vários tipos de agentes de detecção. Não obstante, as moléculas de HLA foram incluídas nesta invenção porque os epítomos listados no Quadro 6 foram seleccionados de regiões proteicas fora das regiões antigénicas hipervariáveis, as quais são tipicamente utilizadas para combinar moléculas de HLA. Assim, estes antígenos têm de ser considerados como trocas de aminoácidos codificadas por SNP como definidas com esta invenção. Os epítomos de células T seriam tipicamente utilizados para prevenir a GVHD relacionada com o transplante de células estaminais e de órgãos.

Noutra forma de realização, o alo-antígeno compreendendo uma troca imunogénica de aminoácido é caracterizado pelas sequências de ADN que codificam os polipeptidos inventivos, inter alia, moléculas isoladas de ácido nucleico, vectores de expressão contendo aquelas moléculas e células hospedeiras transformadas ou transfectadas com aquelas moléculas.

A invenção também proporciona proteínas, péptidos e anticorpos isolados para aquelas proteínas e péptidos e

CTLs, que reconhecem as proteínas e os péptidos. Também são proporcionados fragmentos incluindo fragmentos funcionais e variantes dos precedentes. Além disso são proporcionados estojos contendo as moléculas precedentes. Os anteriores podem ser utilizados no diagnóstico, seguimento, investigação ou tratamento de patologias caracterizadas pela expressão de um ou mais alo-antigénios associados a cancro. Antes da presente invenção, só tinham sido identificados uma mão cheia de genes alo-antigénios tais como os genes associados a mHAGs.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona proteínas de fusão compreendendo um primeiro e ou um segundo epítopo de células T inventivo ou, alternativamente, um polipéptido inventivo e um antigénio tumoral conhecido, ou um epítopo estranho que torna o epítopo inventivo imunogénico.

A invenção envolve a utilização de um único material, de uma multiplicidade de materiais diferentes e até mesmo painéis grandes e combinações de materiais. Por exemplo, um único gene portador do SNP, uma única proteína codificada pelo referido gene, um único fragmento funcional destes, um único anticorpo contra aqueles, etc. pode ser utilizado nos métodos e produtos da invenção. De modo semelhante, pares, grupos e até mesmo painéis destes materiais e, opcionalmente, outros genes de alo-antigénio associados a cancro e ou produtos genéticos ou antigénios tumorais convencionais podem ser utilizados para diagnóstico, seguimento e terapia. Os pares, grupos ou painéis podem envolver 2, 3, 4, 5 ou mais genes, produtos genéticos, fragmentos destes ou agentes que reconhecem tais materiais. Uma multiplicidade desses materiais é não só útil na monitorização, tipagem, caracterização e diagnóstico de

células que expressam produtos genéticos modificados codificados por SNP, mas uma multiplicidade desses materiais também pode ser utilizada terapeuticamente.

Um exemplo disto é a utilização de uma multiplicidade de tais materiais profiláctica ou intensamente para a prevenção, retardamento do aparecimento, melhoramento, etc. de cancro em células, que expressam ou expressarão esses genes. Podem ser testadas e identificadas qualquer uma e todas as combinações de genes, produtos genéticos e materiais, que reconheçam os genes e produtos genéticos, para serem utilizados de acordo com a invenção. Seria demasiado longo enumerar todas essas combinações; os especialistas na técnica, particularmente em consideração dos ensinamentos aqui contidos, serão capazes de determinar quais as combinações mais apropriadas para que circunstâncias.

Como será evidente da discussão seguinte, a invenção tem utilizações *in vivo* e *in vitro*, incluindo para fins terapêutico, diagnóstico, seguimento e investigação. Um aspecto da invenção é a capacidade de identificar uma célula que expressa um número dos genes identificados de acordo com a invenção, por exemplo, quantificando a expressão desses produtos genéticos. Essas identificações serão características, por exemplo, para prever o efeito GVT e GVHD em modelos animais para uma terapia de um cancro. As células também pode ser perscrutadas para determinar se tais células expressam os genes modificados por SNP identificados de acordo com a invenção.

Num aspecto, a invenção é um método para diagnosticar um alo-antigénio e um antigénio associado a cancro

terapeuticamente relevante codificado por uma molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador. O método envolve os passos de pôr em contacto uma amostra biológica isolada de um indivíduo doente com um agente que se liga especificamente à molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador, um produto de expressão desta, ou um fragmento de um produto de expressão desta complexado com um MHC, preferencialmente uma molécula de HLA, em que a molécula definida por um SNP codificador pode ser seleccionada de um alo-antigénio listado segundo o Quadro 1-6 na forma da molécula de ácido nucleico, e utilizada para determinar a interacção entre o agente e a molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador, o produto de expressão desta ou fragmento do produto de expressão desta.

Um outro aspecto é um método de diagnóstico de um alo-antigénio terapêuticamente relevante e associado a cancro codificado por uma molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador. O método envolve os passos de pôr em contacto uma amostra biológica isolada de um indivíduo considerado como um doador adequado para BMT com um agente que se liga especificamente à molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador, um produto de expressão desta, ou um fragmento de um produto de expressão desta complexado com um MHC, preferencialmente uma molécula de HLA, em que a molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador é seleccionada dos alo-antigénios listados de acordo com o Quadro 1-6 na forma da molécula de ácido nucleico, e determinar a interacção entre o agente e a molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador, o produto de expressão ou fragmento do produto de expressão. Noutra forma de realização, a molécula de ácido

nucleico portadora de um SNP codificador ou um fragmento peptídico desta pode ser detectada por um anticorpo. Um fragmento do produto de expressão modificado num único aminoácido complexado com uma molécula de MHC, preferencialmente de HLA, pode ser detectado com um anticorpo ou alternativamente o péptido complexado com HLA pode ser directamente utilizado para diagnóstico e activação ou inibição de células.

Os distúrbios podem ser caracterizados pela expressão de uma multiplicidade de precursores de antigénio associados a cancro portadores dos genes modificados com SNP codificador. Assim, os métodos de diagnóstico podem incluir a utilização de uma multiplicidade de agentes, cada um dos quais é específico para um precursor de antigénio portador de SNP associado a um cancro humano diferente (incluindo pelo menos um dos precursores de antigénio associados a cancro aqui divulgados), e em que a referida multiplicidade de agentes é de pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 de tais agentes. Em cada uma das formas de realização acima, o agente pode ser específico para uma doença humana preferencialmente um precursor de antigénio associado a cancro, incluindo os precursores de antigénio associados a cancro renal e com origem sanguínea aqui descritos.

O fragmento seleccionado do Quadro 2 até 6 tem um tamanho de pelo menos: 8 nucleótidos, 10 nucleótidos, 12 nucleótidos, 14 nucleótidos, 16 nucleótidos, 18 nucleótidos, 20, nucleótidos, 22 nucleótidos, 24 nucleótidos, 26 nucleótidos, 28 nucleótidos, nucleótidos, 50 nucleótidos, 75 nucleótidos, 100 nucleótidos, 200

nucleótidos, 1000 nucleótidos e todos os comprimentos inteiros entre aqueles. A molécula codifica um polipéptido ou um fragmento daquele que liga um receptor de HLA humano ou um anticorpo humano. Um vector de expressão compreendendo uma molécula isolada de ácido nucleico como descrita acima é ligado, de modo operacional, a um promotor. De acordo com a invenção, um vector de expressão compreende um ácido nucleico ligado, de modo operacional, a um promotor, em que o ácido nucleico é uma molécula modificada por SNP. Noutro aspecto, um vector de expressão compreende uma molécula modificada por SNP e um ácido nucleico que codifica uma molécula de MHC, preferencialmente de HLA.

A invenção também inclui um fragmento dos polipéptidos seleccionados das moléculas listadas no Quadro 1-6, que é imunogénico. Numa forma de realização, o fragmento, ou uma parte do fragmento, liga o HLA ou um anticorpo humano. A invenção inclui noutro aspecto um fragmento isolado de um precursor de antigénio associado a cancro humano o qual, ou uma porção do qual, liga o HLA ou um anticorpo humano, em que o precursor é codificado pela molécula de ácido nucleico portadora de um SNP codificador que é uma seleccionada de uma molécula listada no Quadro 1-6. Numa forma de realização, o fragmento faz parte de um complexo com HLA. Noutra forma de realização o fragmento tem entre 8 e 12 aminoácidos de comprimento.

Noutra abordagem considerada através da invenção, podem ser geradas células imunitárias *in vitro* por cultura de linfócitos com péptidos seleccionados de moléculas listadas seleccionadas dos Quadros 2 até 5 que representam a troca de aminoácido imunogénica do alo-antigénio e em que a

versão alélica corresponde à versão expressada pelas células tumorais do doente. Utilizando os alo-antigénios de acordo com um tal procedimento as células T auxiliares e citotóxicas do doador que reconhecem o antigénio único com alterações de um único aminoácido podem ser geradas *in vitro* por um método que previne a reactividade das células T para os antigénios de histocompatibilidade prospectivos do hospedeiro, deixando uma população de células T alo-reactivas específicas para o tumor. Uma outra abordagem, que poderia ser utilizada em doentes com ou sem um irmão histocompatível, compreende regímenes de condicionamento bem tolerados que provocam imunossupressão com respeito aos alo-antigénios indutores de GVHD definidos de acordo com esta invenção sem fazer a ablação da medula óssea.

Estes procedimentos poderiam melhorar significativamente os estudos clínicos recentemente relatados que utilizaram o transplante não mieloablativo de células estaminais para outras indicações, incluindo tumores sólidos e transplante de órgãos sólidos. Quando a abordagem é utilizada, por exemplo, para tratamento de cancro, o receptor recebe células estaminais hematopoiéticas empobrecidas em células T, que o receptor não rejeitará, seguido da administração de números progressivamente maiores de células T do doador (ou células T específicas para o tumor), que foram cuidadosamente estimuladas relativamente ao reconhecimento de alo-antigénios. Ao longo desta abordagem, é especialmente útil expandir células T do doador com a ajuda de péptidos de ligação ao HLA que representam a troca imunogénica de aminoácido do alo-antigénio com péptidos retirados do Quadro 2 até 5 quer *ex vivo* quer *in situ* para promover a reactividade antitumoral das células T. Números suficientes de CTLs podem ser obtidos para os efeitos de

imunoterapia adoptiva e, em conclusão, isto permite uma nova terapia para o tratamento de recidiva de leucemia após BMT com um risco mínimo de induzir GVHD.

Também se pode manipular os linfócitos do doador específicos para o alo-antigénio (que reconhece uma modificação de um único aminoácido) *in vitro* inserindo um gene suicida conhecido na técnica, tal como o gene da timidina-cinase do vírus herpes simplex. Isto habilita o médico com a possibilidade de destruir os linfócitos introduzidos por infusão em doentes com doença de enxerto contra o hospedeiro descontrolada.

Outra abordagem que é possível por meio dos métodos da invenção compreende a imunização pré-transplante de doadores de BMT alogénico com uma vacina de alo-antigénio cancerígeno modificado num único aminoácido definido pelo receptor a qual aumenta a actividade GVT sem exacerbar a GVHD devido ao condicionamento das células T do doador contra antigénios putativos modificados num único aminoácido apenas em células tumorais. Em resumo, a invenção ajuda a evitar a toxicidade e mortalidade relacionada com o BMT e outros procedimentos relacionados com transplante.

As situações que precisam de vacinação com alo-antigénios são preferencialmente caracterizadas por uma carga tumoral pequena e transferência adoptiva com células T específicas para o tumor em casos de maior carga tumoral. No entanto, o resultado da imunização com vacinas contendo epítomos de CTL tumorais depende fortemente do modo de administração do epítomo. Surpreendentemente, a vacinação com péptidos de ligação ao MHC de classe I pode provocar tolerância às CTL

associada a um maior crescimento tumoral em vez de imunidade. Estes resultados apontam para a possibilidade de utilizar a vacinação para induzir tolerância com respeito aos alo-antigénios indutores de GVHD. Por outro lado, para prevenir a indução de tolerância, a modulação de APCs é uma estratégia promissora para melhorar a sensibilidade à imunização (Sotomayor, 1999). A descrição detalhada dos protocolos de imunização úteis com alo-antigénios é feita na parte experimental desta invenção.

Relativamente aos receptores de transplantes com genótipos de HLA idênticos, as disparidades nos alo-antigénios são, de acordo com esta invenção, definidos realizando uma troca de aminoácido codificada por SNP. A identificação genómica do locus do alo-antigénio definido pelo SNP pode ser realizada por métodos de PCR específicos em relação ao alelo. As diferenças entre doador e receptor são geralmente analisadas por dois conjuntos diferentes de iniciadores. Cada conjunto iniciador consiste de iniciadores específicos em relação ao alelo e iniciadores comuns, e ambos os conjuntos de iniciadores podem conter sequências intrónicas.

Os produtos previstos, específicos em relação ao alelo podem ser correlacionados em todos os casos com a troca de aminoácido codificada pelo SNP detectada por métodos bioquímicos, por anticorpos para CTLs ou por RT-PCR. Como foi demonstrado ao longo desta invenção, a identificação de novos alo-antigénios adicionais codificados por SNP pode ser utilizada para tipagem genómica prospectiva em relação aos alelos de alo-antigénio codificados por SNP e melhorará a selecção do doador e identificará os receptores de BMT em relação ao risco baixo ou alto de GVHD e GVT melhorada. Os

SNPs de acordo com este objectivo podem ser detectados de um modo específico em relação à sequência, utilizando uma abordagem de hibridação, extensão de iniciador ou ligação de ADN. Os especialistas na técnica seleccionarão uma abordagem adequada como listada a seguir e efectuarão a análise de antígeno segundo procedimentos correntes específicos para a abordagem individual.

1. a abordagem de hibridação baseia-se em duas sondas específicas para o alelo que hibridizam com a sequência alvo apenas quando condizem perfeitamente. Em condições de ensaio optimizadas, a disparidade de uma base desestabiliza suficientemente a hibridização para evitar que a sonda alélica emparelhe com a sequência alvo. Quando as sondas específicas para o alelo são imobilizadas num suporte sólido, as amostras de ADN alvo, marcado são capturadas, e o evento de hibridação é visualizado pela detecção da etiqueta depois dos alvos não ligados terem sido eliminados por lavagem.

2. A extensão de iniciador é um outro mecanismo de discriminação alélica muito robusto. É muito flexível e requer o número menor de iniciadores/sondas. A concepção da sonda e a optimização do ensaio são geralmente muito directas. Existe um grande número de variações na abordagem de extensão do iniciador que se baseiam na capacidade da ADN-polimerase para incorporar desoxirribonucleósidos específicos complementares à sequência da cadeia molde de ADN, contudo, elas podem ser agrupadas em duas categorias.

Em mais detalhe, a identidade da base polimórfica no ADN alvo é determinada por incorporação de nucleótidos específicos para o alelo, seguida de sequenciação.

Utilizando uma abordagem de PCR específica em relação ao alelo, a ADN-polimerase é utilizada para amplificar o ADN alvo apenas se os iniciadores de PCR forem perfeitamente complementares à sequência de ADN alvo. Foi imaginado um número de maneiras engenhosas para a análise de produtos da extensão de iniciadores em ensaios homogêneos. A maioria destas abordagens combina novos análogos de ácido nucleico e o seguimento de diferenças interessantes nas propriedades físicas entre reagentes de partida e produtos da extensão de iniciadores. Na abordagem de PCR específica em relação ao alelo, confia-se na ADN-polimerase para prolongar um iniciador apenas quando a sua extremidade 3' é perfeitamente complementar à cadeia molde. Quando esta condição é satisfeita, é produzido um produto de PCR. Através da determinação se um produto de PCR é produzido ou não, pode-se inferir sobre o alelo presente no ADN. Foram utilizadas várias abordagens inovadoras para detectar a formação de produtos de PCR específicos em ensaios homogêneos. Alguns baseiam-se na análise da curva de fusão, e alguns baseiam-se na hidrilação de sondas específicas para o alvo. Uma variante desta abordagem é a extensão de iniciador específico em relação alelo. Aqui, o produto de PCR contendo o sítio polimórfico serve como cadeia molde, e a extremidade 3' da sonda de extensão do iniciador consiste da base alélica. O iniciador é prolongado apenas se a base 3' complementa o alelo presente no ADN alvo. O seguimento do evento de extensão do iniciador permite, portanto, inferir sobre o(s) alelo(s) presente(s) na amostra de ADN.

A ADN-ligase é muito específica para reparar incisões na molécula de ADN. Quando dois oligonucleótidos adjacentes são emparelhados numa cadeia molde de ADN, eles são unidos apenas se os oligonucleótidos condizerem perfeitamente com

a cadeia molde na junção. Portanto, os oligonucleótidos específicos para alelos podem interrogar sobre a natureza da base no sítio polimórfico. Pode-se inferir sobre o(s) alelo(s) presente(s) no ADN alvo determinando se ocorreu ligação. Embora a ligação possua o nível de especificidade mais elevado e seja mais fácil de otimizar entre todos os mecanismos de discriminação alélica, é a reacção mais lenta e requer o maior número de sondas modificadas. No entanto, a ligação como um mecanismo tem o potencial de genotipagem sem amplificação precedente do alvo por PCR.

A detecção de um produto de reacção alélico positivo é efectuada monitorizando a luz emitida, ou medindo a massa dos produtos, ou detectando uma alteração na propriedade eléctrica quando os produtos são formados.

Glossário

As seguintes definições são proporcionadas para facilitar a compreensão de determinados termos frequentemente utilizados atrás.

Alo-reactivos é o termo utilizado para descrever epítomos polimorfos de células T diferentes entre indivíduos, que são especificamente reconhecidos por células T.

“Anticorpos” como aqui utilizado inclui anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos quiméricos, monocatenários e humanizados, bem como fragmentos Fab, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão de Fab ou de outras imunoglobulinas.

“Proteínas CD” são marcadores da superfície celular específicos para a linhagem, os quais são produzidos pelo

programa genético normal das células ou por padrões de expressão aberrantes que são patológicos. As proteínas CD são tipicamente atribuídas a células derivadas de origem hematopoiética. Os marcadores celulares são designados segundo uma nomenclatura padrão que define Grupos de Diferenciação (CD) por consenso científico. As proteínas CD são detectadas por um processo que combina reagentes imunológicos não específicos, marcados com etiqueta fluorescente e um citómetro de fluxo para contar e analisar as populações de células. As células são então classificadas por tamanho, reactividade marcadora, clonabilidade e proporção. O procedimento é muito utilizado clinicamente em diagnóstico, prognóstico, avaliação de doença residual, seguimento terapêutico e gestão de casos de leucemia, linfomas e condições afins e é bem conhecido dos especialistas na técnica. Pode ser analisado uma variedade de tecidos e fluidos corporais. A fim de garantir a qualidade e utilidade clínica das interpretações, todos os dados citométricos são interpretados no contexto de uma revisão microscópica do espécimen.

“Immunofenotipagem” de marcadores de cancro inclui normalmente um procedimento de revelação em dois passos. No primeiro passo são adicionados, às células, mAbs de murídeo específicos para o antigénio como listados atrás. A ligação dos mAbs é avaliada por uma técnica de imunofluorescência utilizando anti-soro anti-Ig de rato conjugado com FITC. A distribuição de antigénios é analisada por citometria de fluxo e ou microscopia óptica. Os resultados de imunotipagem estão tipicamente disponíveis em 24 horas da recepção da amostra; e proporcionam percentagens dos marcadores citométricos. Os níveis (intensidade) de expressão morfológica e dos marcadores também podem ser

avaliados e descritos quando relevantes. A intensidade da expressão do antigénio pode variar entre passagens e pode ser influenciada pelas condições da cultura de células.

“Isolado” significa alterado “pela mão do homem” do seu estado natural, isto é, se ocorre na natureza, ele foi alterado ou retirado do seu ambiente original, ou ambos. Por exemplo, um polinucleótido ou um polipeptido presente naturalmente num organismo vivo não está “isolado,” mas o mesmo polinucleótido ou polipéptido separado dos materiais coexistentes no seu estado natural está “isolado”, como o termo é aqui utilizado. Além do mais, um polinucleótido ou polipéptido que é introduzido num organismo por transformação, manipulação genética ou por qualquer outro método recombinante está “isolado” mesmo se continuar presente no referido organismo, organismo esse que pode ser vivo ou não.

“Polinucleótido” refere-se, em geral, a qualquer polirribonucleótido (ARN) ou polidesoxirribonucleótido (ADN), o qual pode ser ARN ou ADN não modificado ou modificado. “Polinucleótidos” incluem, sem restrição, ADN de cadeia simples e de cadeia dupla, ADN esse que é uma mistura de regiões de cadeia simples e cadeia dupla, ARN de cadeia simples e de cadeia dupla, e ARN esse que é uma mistura de regiões de cadeia simples e cadeia dupla, moléculas híbridas compreendendo ADN e ARN que podem ser de cadeia simples ou, mais tipicamente, de cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla. Além disso, “polinucleótido” refere-se a regiões de cadeia tripla compreendendo ARN ou ADN ou ambos ARN e ADN. O termo “polinucleótido” também inclui ADNs e ARNs contendo uma ou mais bases modificadas e ADNs ou ARNs com esqueletos

modificados por razões de estabilidade ou por outras razões. As bases “modificadas” incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases invulgares tal como inosina. Pode ser feita uma variedade de modificações ao ADN e ARN; assim, “polinucleótido” abarca formas modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente de polinucleótidos como tipicamente encontrados na natureza, bem como as formas químicas de ADN e ARN características de vírus e células. “Polinucleótido” também abarca polinucleótidos relativamente curtos, frequentemente referidos como oligonucleótidos.

“Polipéptido” refere-se a qualquer polipéptido compreendendo dois ou mais aminoácidos ligados uns aos outros por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, isto é, isoésteres de péptidos. “Polipéptido” refere-se tanto a cadeias curtas, geralmente referidos como péptidos, oligopéptidos ou oligómeros, e a cadeias mais longas, geralmente referidos como proteínas. Os polipéptidos podem conter aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos codificados por genes. Os “polipéptidos” incluem sequências de aminoácidos modificadas por processos naturais, tal como processamento pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, bem como investigação volumosa de literatura. As modificações podem ocorrer em qualquer posição de um polipéptido, incluindo no esqueleto peptídico, nas cadeias laterais do aminoácido e nos terminais amino ou carboxilo. Entender-se-á que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo grau ou em graus diferentes em vários sítios de um dado polipéptido. De igual modo, um dado polipéptido pode conter muitos tipos

de modificações. Os polipéptidos podem ser ramificados em consequência de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Os polipéptidos cíclicos, ramificados e cíclicos ramificados podem resultar de processos naturais de pós-tradução ou podem ser feitos por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, biotinilação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma unidade heme, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado de lípido, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação dissulfureto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cistina, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfação, adição de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferência tal como arginilação e ubiquitinação (ver, por exemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications e no protein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, e Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

"Fragmento" de uma sequência de polipéptido refere-se a uma sequência de polipéptido que é mais curta do que a

sequência de referência mas que retém essencialmente a mesma função ou actividade biológica que o polipeptido de referência. "Fragmento" de uma sequência de polinucleótido refere-se a uma sequência de polinucleótido que é mais curta do que a sequência do gene de referência.

"Variante" refere-se a um polinucleótido ou polipéptido que difere de um polinucleótido ou polipeptido de referência, mas retém as propriedades essenciais deste. Uma variante típica de um polinucleótido difere na sequência de nucleótidos do polinucleótido de referência. As alterações na sequência de nucleótidos da variante podem, ou não, alterar a sequência de aminoácidos de um polipéptido codificado pelo polinucleótido de referência. As alterações de nucleótido podem resultar em substituições, adições, supressões, fusões e truncagens de aminoácidos no polipéptido codificado pela sequência de referência, como se discute abaixo. Uma variante típica de um polipéptido difere do polipéptido de referência na sequência de aminoácidos. Duma maneira geral, as alterações são restringidas de modo a que as sequências do polipéptido de referência e da variante sejam muito semelhantes na globalidade e, em muitas regiões, idênticos. Uma variante e um polipéptido de referência podem diferir na sequência de aminoácidos em um ou mais substituições, inserções e supressões em qualquer combinação. Um resíduo de aminoácido substituído ou inserido pode, ou não, ser um codificado pelo código genético. Substituições conservativas típicas incluem Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; e Phe e Tyr. Uma variante de um polinucleótido ou polipéptido pode ocorrer naturalmente tal como um alelo, ou pode ser uma variante que não é conhecida como ocorrendo naturalmente. As variantes não naturais de

polinucleótidos e polipéptidos podem ser produzidas por técnicas de mutagénese ou por síntese directa. Também estão incluídas como variantes, os polipéptidos possuindo uma ou mais modificações pós-tradução, por exemplo glicosilação, fosforilação, metilação, ADP ribosilação e semelhantes. Formas de realização incluem metilação do aminoácido N-terminal, fosforilações de serinas e treoninas e modificação de glicinas C-terminais.

“Alelo” refere-se a uma de duas ou mais formas alternativas de um gene que ocorre num dado locus no genoma. Uma vez que os mamíferos são organismos diplóides, o gene está representado duas vezes e nós temos pares de cromossomas. Dois genes num locus particular, em cromossomas irmãos condizentes, controlam um traço particular para características e são chamados alelos. Nos humanos, os cromossomas emparelhados podem ser portadores de alelos diferentes. Se cada gene for expressado, numa situação heterozigótica, eles são referidos como sendo co-dominantes e são produzidos dois produtos genéticos, ou alo-antigénios, diferentes. Se cada gene for expressado, numa situação homozigótica, é produzido apenas um produto genético.

Dois ou mais indivíduos (ou estirpes) são declarados como sendo alogénicos um do outro quando os genes num ou mais loci não são idênticos na sequência de cada organismo. Alogénico é geralmente especificado em relação ao locus ou loci envolvidos.

Os indivíduos de uma espécie considerados alogénicos representam uma diferença antigénica que provocará uma

resposta imunológica para o aloenxerto. Os antígenos envolvidos são frequentemente referidos como alo-antígenos

“Alo-antígenos” são representados por dois grupos de produtos genéticos de histocompatibilidade. Estes foram observados como antígenos de histocompatibilidade principal e menor. Os antígenos de histocompatibilidade principal estimulam formas agudas, rápidas, intensas de rejeição de enxerto e são representados pelas proteínas HLA de classe I e II. Os antígenos de histocompatibilidade menor estimulam reacções crónicas, lentas, menos intensas e representam um grupo funcionalmente heterogéneo de proteínas. Podem ser produzidos anticorpos monoclonais para um único epítipo e foi desenvolvido um painel de anticorpos monoclonais diferentes para vários antígenos de HLA que permite tipagem serológica de tecidos.

“Polimorfismo” refere-se a uma variação numa sequência de nucleótidos (e na sequência de polipéptido codificada, se relevante) numa dada posição do genoma dentro de uma população.

“Polimorfismo de um único nucleótido” (SNP) refere-se à ocorrência de variabilidade de nucleótidos numa única posição nucleotídica do genoma, dentro de uma população. Um SNP pode ocorrer dentro de um gene ou dentro de regiões intergénicas do genoma.

Foram utilizados muitos métodos para detecção de SNPs introduzidos por mutações. Por exemplo, foi descrito um ensaio muito sensível para genes *ras* mutantes e para a sua aplicação ao estudo dos genotipos de apresentação e recidiva na leucemia aguda (*Oncogene* 9, 1994, 553-563). Os

dois métodos muito utilizados são a amplificação específica para o alelo (ASA) e a PCR enriquecida em mutantes (ME-PCR). Para o processo ASA, são necessários pelo menos 3 iniciadores. Um iniciador comum é utilizado em complemento inverso ao polimorfismo a ser testado. Este iniciador comum pode ter entre 50 e 1500 pb da base polimórfica. Os outros dois (ou mais) iniciadores são idênticos uns aos outros à excepção de que a base 3' final muda para condizer com um dos dois (ou mais) alelos que constituem o polimorfismo. Duas (ou mais) reacções de PCR são então realizadas num ADN amostra, cada uma utilizando o iniciador comum e um dos iniciadores específicos para o alelo. Para detectar SNPs codificadores herdados, especialmente relacionados com a leucemia, não existe nenhuma limitação típica relativamente a uma pequena percentagem de células portadoras de SNP num grande fundo de células normais com é o caso para as células cancerosas, em geral. Por outro lado, quando se analisa células sanguíneas, pode ser útil a detecção de um alelo de SNP num fundo de 10^4 - 10^6 tipos de alelos discordantes quando se procede à análise de doentes pós-transplante quanto à presença de doença recorrente. Foram descritos ensaios muito sensíveis e específicos para a detecção de SNPs (Sidransky, *Science* 278, 1997, 1054-1058, Ahrendt *et al.*, *J. Natl. Cancer. Inst.* 91, 1999, 332-339).

Um aspecto importante relativamente a esta invenção pode ser a necessidade de realizar tais ensaios de um modo automático e de elevado débito para permitir o rastreio em grande escala (Dong *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 2001, 858-865, Ahlquist *et al.*, *Gastroenterology* 119, 2000, 1219-1227, Ahrendt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1999, 7382-7387).

“Variante de excisão-união” como aqui utilizada refere-se a moléculas de ADNc produzidas a partir de moléculas de ARN inicialmente transcritas a partir da mesma sequência de ADN genómico, mas que sofreram excisão-união alternativa de ARN. A excisão-união alternativa de ARN ocorre quando um transcrito primário de ARN sofre excisão-união, geralmente pela remoção de intrões, o que resulta na produção de mais do que uma molécula de ARNm, cada uma das quais pode codificar sequências de aminoácidos diferentes. O termo variante de excisão-união também se refere às proteínas codificadas pelas moléculas de ADNc.

“Identidade” e “Similaridade” reflectem uma relação entre duas ou mais sequências de polipéptido ou duas ou mais sequência de polinucleótido, determinada comparando sequências de comprimento muito semelhante, ou ao longo de comprimentos mais curtos, definidos (o chamado alinhamento local), o que é mais adequado para sequências de comprimento diferente.

Os métodos de comparação da identidade e similaridade de duas ou mais sequências são bem conhecidos na técnica. Assim, por exemplo, podem ser utilizados os programas disponíveis no Pacote de Análise de Sequências Wisconsin, versão 9.1 (Devereux J et al, *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395,

Preferencialmente, a matriz de substituição de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S e Henikoff J G, *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 89, 10915-10919, 1992) é utilizada em comparações de sequências de polipeptidos, incluindo quando as sequências de nucleótidos são primeiramente traduzidas em sequências de aminoácidos antes da comparação.

Numa sequência de polinucleótido possuindo um Índice de Identidade de 0,95 em comparação com uma sequência de polinucleótido de referência, podem ser suprimidos, substituídos ou inseridos uma média de até 5 em cada 100 nucleótidos da sequência de referência, ou qualquer combinação daqueles, como descrito atrás. O mesmo se aplica *mutatis mutandis* para outros valores do índice de Identidade, por exemplo 0,96, 0,97, 0,98 e 0,99.

“Proteína de fusão” refere-se a uma proteína codificada por genes, ou fragmentos destes, não relacionados, fundidos. No sentido mais geral, de acordo com esta invenção pelo menos dois alo-antigénios ou fragmentos portadores das duas versões de aminoácidos podem ser fundidas num único polipéptido. Num exemplo mais específico os referidos alo-antigénios, ou respectivamente os fragmentos destes, seriam fundidos com a porção Fc de uma imunoglobulina. Foram descritos exemplos nas US 5541087, 5726044. No caso de Fc-allo-antigénio, é vantajoso utilizar uma região Fc de imunoglobulina como uma parte de uma proteína de fusão para efectuar a expressão funcional do Fc-allo-antigénio ou fragmentos de alo-antigénio, para melhorar as propriedades farmacocinéticas e para melhorar as propriedades imunológicas de uma tal proteína de fusão, quando utilizada em terapia. Nalguns casos, a geração de um Fc-allo-antigénio dimerizado poderia ser especialmente benéfico. A construção Fc-ADN compreende na direcção 5' para 3', uma cassette de secreção, isto é uma sequência sinal que desencadeia a saída a partir de uma célula mamífera, ADN que codifica um fragmento da região Fc de imunoglobulina, com um parceiro de fusão, e um ADN que codifica o alo-antigénio ou fragmentos destes. Nalgumas utilizações seria desejável ser

capaz de alterar as propriedades funcionais intrínsecas (ligação de complemento, ligação ao Receptor de Fc) por mutação dos lados Fc funcionais, enquanto se deixava o resto da proteína de fusão intacta ou se suprimia completamente a parte Fc após expressão.

Os marcadores de expressão “específicos em relação ao tecido” (tais como as proteínas CD) são rotineiramente aplicados no diagnóstico de leucemia e linfoma e, além disso, mostraram ser úteis no diagnóstico de tumores sólidos quando a citologia convencional sozinha não proporciona um resultado claro. Sabe-se na técnica, que as células derivadas de origem hematopoiética estão entre os tipos de células que expressam o maior número de genes específicos em relação ao tecido, geralmente referidos como marcadores de linhagem (proteínas CD). As populações de linhagens celulares incluem monócitos, células NK, granulócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), linfócitos (células T e B), células dendríticas e seus precursores. A maioria das linhas de células de referência de cancro humano e, especialmente, as relacionadas com leucemia e linfoma estão disponíveis de DSMZ. Portanto, os ensaios de rotina para a expressão de marcadores de tecido em todas as linhas de células de cancro humano efectuados com um painel de anticorpos monoclonais (mAbs) bem caracterizados, é técnica corrente. Em geral, o padrão de expressão destes antígenos reflecte o do tipo de células originadoras. No entanto, a expressão de proteínas detectadas por mAbs individuais, nem sempre são estáveis durante muito tempo. Por conseguinte, nem todos os marcadores descritos para uma dada linha de células estão necessariamente expressados nos clones de referência DSMZ. Além disso, Abs diferentes contra o mesmo antígeno nem

sempre se ligam na mesma extensão para originar intensidades de revelação comparáveis. Por conseguinte, podem ocorrer diferenças entre os resultados reportados, sem que isso coloque automaticamente em dúvida a identidade da linha de células.

A especificidade em relação ao tecido ou ao tumor é uma nomenclatura que pode ser utilizada de modos diferentes e pode referir-se a um gene ou molécula sobre-expressado num determinado tecido em comparação com outros tecidos ou a genes ou moléculas únicas a um tecido, os quais são expressados num tecido mas não nos outros. De acordo com esta invenção ambas as categorias de genes têm de ser consideradas como antigénios alvo já que são portadoras de polimorfismos codificados por SNP.

Outros exemplos

Exemplo 1

Requisitos do espécimen para a análise de marcadores de cancro

As proteínas CD e os marcadores de cancro são detectados rotineiramente por um processo de diagnóstico que combina reagentes imunológicos não específicos, marcados com fluorescência (anticorpo) e um citómetro de fluxo para contar e analisar as populações de células. As células são então classificadas pelo tamanho, reactividade do marcador, clonabilidade e proporção. Os anticorpos anti-CD individuais e as linhas de células de referência de leucemia/linfoma estão prontamente disponíveis em colecções de células de referência tais como ATCC ou DSMZ. É escolhido um painel desejado de anticorpos anti-CD para caracterizar e seleccionar um imunofenótipo de

leucemia/linfoma desejado e, se necessário, comparar o referido fenótipo com linhas de células de referência de leucemia/linfoma seleccionadas e padronizadas disponíveis de DSMZ. O procedimento é muito utilizado clinicamente em diagnóstico, prognóstico, avaliação de doença residual, seguimento de terapêutica, e gestão de casos de leucemia, linfomas e patologias afins, e é bem conhecido dos especialistas na técnica. Os anticorpos anti-CD de referência, respectivamente as linhas de células de leucemia/linfoma de referência com perfis de expressão de proteína CD caracterizados estão disponíveis, por exemplo, em DSMZ - Deutsche Sammlung von Microorganism und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, ALEMANHA. Pode ser analisada uma variedade de tecidos e fluidos corporais. Para garantir a qualidade e utilidade clínica das interpretações, todos os dados citométricos são interpretados no contexto de uma revisão microscópica do espécimen.

Sangue:

5-7 mL de sangue num tubo com heparina de sódio (tampa verde) e 5-7 mL de sangue num tubo com EDTA (tampa púrpura). Misturar bem invertendo. A fim de garantir resultados óptimos, as amostras deveriam ser recebidas em 24 horas. Se a amostra não poder ser recebida em 24 horas, a amostra pode ficar à temperatura ambiente, contudo, tem de ser feito um esfregaço sanguíneo a partir do sangue com EDTA e enviado juntamente com o espécimen. Alternativamente, pode ser submetido um tubo de ACD de 7 ou 10 mL (tampa amarela) acompanhado da contagem de glóbulos brancos e uma contagem diferencial de sangue obtida ao mesmo tempo que foi recolhido o tubo de ACD (têm de ser

proporcionadas contagens de um tubo separado para evitar efeitos de diluição de ACD).

Medula óssea:

1-2 mL de medula óssea recolhidos numa seringa contendo heparina de sódio (aproximadamente 500 USP de heparina de sódio por mL de espécimen). Misturar bem. Transferir o espécimen para um tubo com heparina de sódio. Pode ser necessário mais espécimen se a medula for hipocelular. As amostras deveriam ser recebidas em 24 horas. Se as amostras não poderem ser enviadas para chegarem em 24 horas, o espécimen deverá ser colocado em meio de transporte (é ainda necessária uma seringa heparinizada para a colheita inicial).

Tecido:

Colocar a biopsia de tecido num recipiente estéril com meio de cultura de tecido. As amostras deveriam ser recebidas em 24 horas para garantir uma viabilidade óptima. É efectuada uma verificação da viabilidade antes da análise de células isoladas do tecido.

Exemplo 2**Seleção de marcadores de tecido relacionados com leucemia**

A imunofenotipagem de leucemia e linfomas é o processo utilizado para identificar e quantificar células do sangue, medula óssea e tecidos linfáticos de acordo com a sua linhagem biológica e fase de diferenciação. Os marcadores celulares utilizados são designados segundo uma nomenclatura padrão que define as proteínas CD. As proteínas marcadoras de CD são uma escolha excelente, devido à sua expressão por células de origem

hematopoiética, para começar uma análise de SNP de acordo com esta invenção. Uma lista de marcadores da superfície celular relevantes para o diagnóstico de doenças hematológicas, tais como leucemia e linfomas, é dada no Quadro 2. O objectivo final é identificar polimorfismos nestas proteínas CD que justifiquem as alterações de aminoácido nas proteínas correspondentes.

A classificação de células leucémicas não diferenciadas de origem linfóide ou mieloide, as quais podem pertencer, por exemplo, às linhagens de células B ou T, é um primeiro passo na análise e pode seguir-se a subclassificação das células leucémicas em tipos de linhagens. A recolha de informação detalhada sobre a expressão de marcadores na superfície celular é conhecida na técnica e é utilizada para planear o esquema experimental. À medida que estão a ser elucidados mais marcadores, especialmente marcadores de cancro, em geral, por modelação da expressão, o número de cancros aplicáveis à actual abordagem está a aumentar gradualmente. Os marcadores mais proeminentes que podem ser utilizados para definir perfis de leucemia foram testados nesta invenção, sendo dada uma lista no Quadro 2. O especialista na área será capaz de seleccionar prontamente aqueles marcadores CD que são mais bem adaptados para diagnosticar e tratar uma doença específica de origem sanguínea.

Os parágrafos seguintes resumem perfis de proteínas CD relevantes que se relacionam com doenças específicas. As doenças específicas incluem, mas não se limitam a, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), síndrome de mielodisplasia (MDS) e outras síndromes mieloproliferativas crónicas, leucemia mieloide crónica

(CML), leucemia linfoblástica crónica (CLL), mieloma múltiplo, linfoma (Hodgkin ou não Hodgkin) incluindo linfoma folicular, linfoma de grau intermediário, linfoma B de grau elevado com células pequenas não dissociadas ou linfoma linfoblástico de células T, linfoma anaplástico de células grandes, linfoma das células do manto, linfoma de células T periféricas, linfoma de Hodgkin com doença extranodal ou sintomas B, ou tumor volumoso e anemia aplástica grave.

Uma associação de vários SNPs que representam diferentes proteínas de um perfil será especialmente benéfica quando se aplica a presente invenção para terapia e diagnóstico de doenças.

Os perfis de leucemia aguda de populações de células leucémicas putativas ou conhecidas baseiam-se na análise de marcadores de células T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8), os marcadores de células B são preferencialmente CD10, CD19, CD20, CD21, CD22 e CD24 e marcadores mielóides/monocitários (CD13, CD14, CD15 e CD33). Se útil, podem ser incluídos outros marcadores de células B tais como CD23, 37, 38, 39, 40, 72, 73, 74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86. A leucemia megacarioblástica aguda pode ser comprovada utilizando os marcadores CD61, CD42 e CD41. O estado de maturação (não linhagem) é avaliado com CD34, HLA-DR e CD10 (CALLA). Também pode ser necessária transferase terminal (TdT) como um teste separado ou adicionada pelo patologista quando justificado.

Os perfis de leucemia crónica e os perfis de linfoma são avaliados analisando a população total de células T quanto

à presença de marcadores de reservatórios células T: CD2, CD3, CD7, CD5; a análise das subpopulações CD4 (T auxiliares) e CD8 (T citotóxicas/supressoras) é rotineiramente incluída. Os marcadores mielóides/monocitários incluem CD14 e CD15. A população total de células B poderia ser restringida determinando a expressão dos marcadores de células B CD19 e CD20. A co-expressão de CD5 e CD20 está frequentemente associada a proliferação neoplásica. Os CD41 e CD42 podem ser incluídos para diferenciação de CML em crises. Os CD10 (CALLA), CD22, CD23, CD38, CD45, FMC-1 e HLA-DR são incluídos no perfil padrão. Podem ser adicionados outros marcadores para avaliar distúrbios de células T (CD1, CD30), doença de Hodgkin (CD15, CD30) ou linfoma (CD30) anaplástico (Ki-1).

A leucemia de células ciliadas, leucemia pró-linfocitária ou linfoma e leucemia de células do manto são doenças de células B que são caracterizadas por um perfil de leucemia crónica e perfil de linfoma (ver acima) com expressão dos marcadores de células ciliadas CD11c (receptor de complemento), CD 25 (receptor de IL-2), CD103, e o marcador pró-linfocitário de células ciliadas FMC-7. O marcador linfóide B CD23 é avaliado quanto à expressão de CD5 para o diagnóstico diferenciado de leucemia crónica vs. linfoma de células do manto. O CD23 faz parte do perfil fundamental do linfoma.

O linfoma anaplástico (Ki-1) e a doença de Hodgkin são avaliados através dos marcadores CD1, CD15 e CD30 (Ki-1).

Exemplo 3

Novos SNPs identificados perscrutando bases de dados de ADN

Os SNPs são identificados perscrutando bases de dados de ADN que representam a variação alélica do genoma humano, em que a sequência do ADN é proveniente de indivíduos diferentes. A pesquisa pode ser realizada a vários níveis incluindo dados de EST, SNP ou ADN genómico. No entanto, isto levará, em última análise, ao mesmo resultado. A base de dados útil para pesquisa directa de SNP pode ser seleccionada de um grupo de base de dados compreendendo:

<http://www.jbic.or.jp>

<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>

<http://www.celera.com>

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

Para ilustrar a identificação de SNPs em proteínas de grupo CD, várias sequências de aminoácidos que representam várias proteínas CD relacionadas com cancro foram aplicadas numa pesquisa *tblastn* utilizando o modo por defeito (sequência da proteína contra base de dados de ADN traduzido) do programa. As sequências da proteína, em vez das sequências de nucleótidos, são particularmente úteis para pesquisa, uma vez que podem ser excluídos os SNPs sem nenhum efeito na troca de um aminoácido (mutações silenciosas). A pesquisa do banco de dados foi realizada utilizando uma ou mais das bases de dados de SNP supra-referidas, do domínio público.

Os alinhamentos resultantes que representam discrepâncias na sequência de ADNc (SNPs putativos) entre clones diferentes de uma sequência particular de proteína CD foram

adicionalmente processados de acordo com os critérios rígidos seguintes:

(i) O alinhamento do ADN genómico ou EST (etiqueta da sequência expressada) e da sequência CD contendo um X é um erro de sequenciação e tem de ser ignorado.

(ii) O alinhamento de clones de ADN genómico e uma sequência de CD com disparidades adjacentes à extremidade 5' ou 3' são indicadoras dos limites de exões/intrões e também tem de ser ignorado.

(iii) Uma diferença de uma única base no alinhamento entre as sequências de ADN genómico ou EST e a sequência de CD cercado de ADN perfeitamente condizente é um indicador convincente para um SNP putativo.

Os SNPs identificados ao nível do ADN foram ainda analisados por comparação da sequência da sua proteína disponível através do código de acesso. A pesquisa *Tblastn* levou ao alinhamento como dado no exemplo CD42 abaixo e resultou na identificação dos SNPs putativos presentes no correspondente clone genómico. Uma lista de proteínas relevantes que foram aplicadas à análise de SNP é mostrada no Quadro 2.

Exemplo 4

Análise da variantes de SNP CD42

A fim de ilustrar o procedimento descrito no exemplo 3 em mais detalhe, a proteína CD42b foi seleccionada como um exemplo. A sequência da proteína disponível pelo código de

acesso nº P07359 foi aplicada para a pesquisa de SNPs putativos na proteína CD42b:

a pesquisa na *tblastn* levou ao alinhamento como se mostra abaixo e à identificação de dois SNPs putativos presentes no clone genómico com o nº de acesso AC032038.2.

```
>gi|121531|sp|P07359|GPBA_HUMAN PLATELET GLYCOPROTEIN IB
ALFA CHAIN PRECURSOR (GP-IB ALFA) (GPIBA) (CD42B-ALFA)
(CD42B) [CONTAINS: GLYCOCALICIN]
```

Sequência de aminoácidos de CD42b:

```
MPLLLLLLLLLPSPLHHPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLSENLLYTFSLA
TLMFYTRLTQLNLDRC ELTKLQVDGTL PVLGTLDLSHNQLQSLPLLGGQTLPALTVLDVSFNRL
TSLPLGALRGLGELQELYLKGNELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPAGLLNGLENLDT
LLQENSLYTIPKGGFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRWLQDNAENVVYVWKQGV DVKA
MTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKG CPTLGDEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVRATRTVVKFP
TKAHTTPWGLFYSWSTASLDSQMPSSLHPTQESTKEQTTFPPRWTPNFTLHMESITFSKTPKS
TTEPTPSPTTSEPVPEPAPNMTTLEPTPSPTTPEPTSEPA PSPTTPEPTPIPTIATSP TILVSATSLIT
PKSTFLTTTKPVSLLESTKKTIPELDQPPKLRGV LQGHLESSRNDPFLHPDFCCLLP LGFYVLGL
FWLLFASVVLILLWSVGVHVKPQALDSGQGAALT TATQTTHLELQGRQVTVPRAWLLFLRG
SLPTFRSSLFLWVRPNGRVGPLVAGRRPSALSQGRGQDLLSTVSIRYSGHSL
```

Alinhamento do fragmento CD42b:

As sequências que representam variantes alélicas e compreendem trocas de aminoácido na proteína CD42b estão marcadas a negrito.

```
>ss523802 aleloPos=201 total len = 401 SC_JCM|AC032038.2_49155|taxid
```

```
9606|mol = Genomic|subsnpcClass = 1 Length = 401
```

HSPs Cadeia Menos:

Pontuação = 736 (264.1 bits), Esperado = 7.0e-71, P = 7.0
 eldentidades = 131/133 (98%), Positivos = 132/133 (99%),
 Grelha = -1

```

Query: 192 TLLQENSLYTIPKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRLQDNAENVYVWKQGVD 251
      TLLQENSLYTIPKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRLQDNAENVYVWKQGVD
Sbjct: 401 TLLQENSLYTIPKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLCNCEILYFRRLQDNAENVYVWKQGVD 222

Query: 252 VKAMTSNVAHVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLGDEGDTLDYDYYPEEDTEGDKVRATRTV 311
      VK+MTSNVAHVQCDNSDKFPVYKYPGK CPTLGDEGDTLDYDYYPEEDTEGDKVRATRTV
Sbjct: 221 VKSMTSNVAHVQCDNSDKFPVYKYPGKWCPTLGDEGDTLDYDYYPEEDTEGDKVRATRTV 42

Query: 312 VKFPTKAHTTPWG 324
      VKFPTKAHTTPWG
Sbjct: 41 VKFPTKAHTTPWG 3

```

Exemplo 5

Verificação de linhas de células cancerosas quanto ao HLA e SNP

Linhas de células de leucemia/linfoma transformadas com o vírus Epstein Barr com perfis de expressão de proteína CD caracterizados estão disponíveis, por exemplo, através de DSMZ ou podem ser isoladas de doentes. As células foram testadas quanto à expressão de HLA-A2 (ou outra expressão de classe I desejada) por imunofluorescência utilizando o mAb BB7.2 (ou outros anticorpos acessíveis através de American Type Culture Collection, Manassas, VA). A expressão e o estado do SNP das células hematopoiéticas e/ou células cancerosas foram testados por PCR genómico. Isolou-se ARN Poli (A)+ com o estojo de purificação de ARNm QickPrep Micro (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para a expressão específica em células ou tecido e para detecção de polimorfismo, por exemplo, do gene CD42 (Nº de Acesso J02940), utilizou-se os iniciadores de PCR (5'-CAAGAGAACTCGCTGTATACA-3' e 5'-AAGGGGTGGTTTCGGGTATGT-3') correspondentes às posições das bases 586 a 607 e à posição das bases 939 a 960, respectivamente do ADNc de CD42 e deram um produto de PCR com 374 pb. A detecção de SNP foi realizada por sequenciação subsequente do produto de PCR utilizando um sequenciador capilar ABI.310.

Exemplo 6

Identificação de péptidos de ligação ao HLA codificados por SNP no CD42b

Além da pesquisa de SNPs codificadores na sequência de ADN e proteína, a selecção de um motivo apropriado de ligação ao HLA de classe I é um outro passo importante para definir um SNP relevante.

Foram seleccionadas várias das moléculas de apresentação de HLA de classe I mais representativas. A utilização do algoritmo SYVPEITHI ajudou a gerar previsões de péptidos de ligação ao HLA e as pontuações são dadas no Quadro 4. Pontuações que vão desde 8 até 27 indicam uma afinidade elevada do péptido individual para ligação às moléculas do HLA de classe I.

O resultado desta análise é sequências humanas que estão condizentes em 8 dos 9 resíduos do péptido. Ambos os péptidos humanos são sintetizados e testados quanto à presença de actividade de sensibilização. Em raras ocasiões, puderam ser observada mais do que uma disparidade de aminoácido no epítipo de células T de 9 resíduos.

Exemplo 7

Seleccção de péptidos de ligação ao HLA para ensaios *in vitro*

Para avaliação *in vitro* da troca de aminoácido derivada de SNP, tiveram de se identificar os péptidos nonaméricos possuindo preferencialmente os motivos de ligação conhecidos para o HLA-A2 (HLA-A*02 ou HLA-B51 ou HLA-B62)

na sequência da mature madura como descrito acima para o alo-antigénio CD42.

Em geral, a selecção de epítomos de células T de ligação ao HLA-A2 oferece vantagens relativamente a outros devido ao facto de existirem na técnica linhas de células, que podem ser utilizadas para o estudo da apresentação do antigénio *in vitro*. Uma tal linha de células é, entre outras, a LCL.174 (uma linha de células mutante deficiente em TAP) que é portadora de HLA-A2 na superfície.

Exemplo 8

Isolamento de péptidos ligados a HLA-A2.

Péptidos ligados a HLA-A2 foram isolados e sequenciados segundo protocolos correntes (Seeger *et al.*, Immunogenetics, 49: 571-576, 1999, Falk *et al.*, Nature, 351: 290-296, 1991) utilizando o anticorpo BB7.2 específico para HLA-A2, tratamento ácido, ultra filtração e fraccionamento por HPLC. As fracções de HPLC contendo o péptido foram reunidas, e foram analisadas alíquotas correspondentes a extractos de péptido de cerca de 10^{10} células por HPLC nanocapilar ESI MS (Schirle *et al.*, Eur. J. Immunol., 30: 2216-2225, 2000)

Exemplo 9

Síntese de Péptidos

Os péptidos foram sintetizados por química de F-moc. A química de F-moc é descrita em G. A. Grant Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman e Co. (1992). As identidades dos péptidos foram confirmadas por análise de aminoácidos e espectrometria de massa de

dessorção/ionização de laser assistida pela matriz. Os péptidos liofilizados foram dissolvidos em DMSO a 20 mM, divididos em alíquotas e conservados a -80°C. Os péptidos foram diluídos a 4 mM com meio de cultura isento de soro e utilizados às concentrações finais desejadas.

Exemplo 10

Avaliação *in vitro* para péptidos sintéticos de ligação ao HLA

Péptidos com variações de um único aminoácido induzidas por SNP que podem ligar-se a moléculas HLA-A2 foram identificados pelo sua capacidade para aumentar a expressão de HLA-A2 na superfície de células mutantes deficientes em TAP da linha LCL.174. Resumidamente, células LCL.174 foram cultivadas numa placa de 96 poços de fundo redondo a 2×10^6 células/poço em 200 μ L de RPMI em conjunto com 50 μ M de péptido e incubadas dum dia para o outro a 37°C. As células foram então tratadas com mAb específico para HLA-A2, BB7.2 (ATCC, Rockville, Md.), seguido de revelação com IgG anti-rato de cabra conjugada com FITC. A intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. O péptido da proteína M1 da matriz do vírus da gripe, FluMP58, é um epítipo de CTL restringido por HLA-A2 conhecido e foi utilizado como um controlo positivo. O antígeno do envelope do vírus da hepatite B, péptido HBenvAg125, não liga HLA-A2 e foi utilizado como um controlo negativo.

Exemplo 11

Tecnologia de tetrâmero para a identificação de células reactivas a antígeno

Os complexos multiméricos de MHC de classe I/péptido são geralmente gerados pela expressão de β 2-microglobulina recombinante e moléculas HLA de cadeia pesada em bactérias. A cadeia pesada é mutada para remover a região transmembranar e para adicionar uma sequência de biotinilação específica no terminal C. As proteínas purificadas podem ser novamente dobradas *in vitro* na presença de concentrações elevadas de péptido/epítipo para formar complexos de HLA-péptido estáveis e solúveis. Após biotinilação enzimática, estes complexos são multimerizados com estreptavidina, a qual ligará quatro moléculas de biotina. A utilização de estreptavidina conjugada com fluorescência permite a visualização de células reveladas por citometria de fluxo.

Na eventualidade de serem utilizados complexos de MHC de classe I/péptido para activar as células T, pode ser útil combinar a tecnologia de tetrâmero com a análise de secreção de citocinas, para estudar a resposta imunológica em mais pormenor.

Exemplo 12

Estimulação *in vitro* de CTLs

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram preparadas de 30 mL de sangue periférico heparinizado de indivíduos humanos HLA-A2⁺ por centrifugação sobre Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, Mo.). Células CD8⁺ foram positivamente seleccionadas de PBMCs isoladas de fresco, ou por vezes de PBMCs congeladas em azoto líquido, utilizando microsferas magnéticas revestidas com anticorpos anti-CD8 segundo as instruções do fabricante (Milteny Biotec, Auburn, Calif.).

As células CD8⁺ foram ressuspensas em DMEM isento de soro e cultivadas em alíquotas de 500 µL em placas de 48 poços a 3×10⁶ células/poço. Após 2 h a 37°C, e 5% de CO₂, as células não aderentes foram removidas por lavagem repetida, e os monócitos aderentes foram incubados durante 4 h com péptido 50 µM e 5 mg/mL de β2-microglobulina humana (Sigma, St. Louis, Mo.). Depois de lavar com DMEM isento de soro, cada poço foi suplementado com 1,5×10⁶ células CD8⁺ (>90% puras por citometria de fluxo) em 500 mL de DMEM contendo 10% de soro humano suplementado com rhIL-7 (0,5 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, Minn.).

O rhIL-2 foi dado a 25 U/mL após 2 dias e duas vezes por semana daí em diante substituindo metade do meio de cultura. No dia 10, culturas de CTL foram novamente estimuladas numa proporção de respondedor para estimulador de 5 com LCLs autólogas irradiadas (5000 rad). Alternativamente, células LCL.174 que foram incubadas com péptido de ligação ao HLA 50 mM definido de acordo com esta invenção foram utilizadas para estimular novamente as culturas de CTL obtidas de indivíduos HLA-A2⁺. Os ensaios de CTL foram realizados uma semana após re-estimulação como se descreve a seguir.

Após caracterização, as CTLs estimuladas por péptidos podiam ser congeladas e conservadas em meio que consistia de 30% de soro humano, 10% de DMSO e 60% de DMEM, e podiam ser depois descongeladas e novamente estimuladas para análise posterior. O péptido FluMP58 (derivado da proteína M1 da matriz do vírus da gripe), foi utilizado como um controlo positivo para estimulação *in vitro* de CTLs específicas para o péptido.

Exemplo 13

Geração ex vivo de CTLs específicas para alo-antigénio

Podem ser utilizados péptidos de ligação ao HLA que representam versões alélicas de um alo-antigénio preferido e ainda caracterizados isolando CTLs específicas. A praticabilidade desta abordagem foi demonstrada pela geração ex vivo de CTLs específicas para alo-antigénios de doadores de sangue saudáveis de alelo negativo, aminoácido díspar, não condicionados. Células dendríticas pulsadas com péptidos sintéticos podem ser utilizadas como APC para estimular células T CD8⁺ autólogas ou alogénicas não condicionadas. As CTLs específicas, de aminoácido díspar, geradas ex vivo podem ser depois utilizadas para realizar eficientemente a lise de células leucémicas derivadas de doentes com leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfóide aguda (ALL). Não deveria ser detectada nenhuma reactividade lítica contra células não hematopoiéticas. Números suficientes de CTLs podem ser obtidos para efeitos de imunoterapia adoptiva. É importante assinalar, que esta técnica é aplicável, sem nenhuma restrição, a todos os alo-antigénios definidos por SNP descobertos através desta invenção.

Exemplo 14

Teste de citotoxicidade de libertação de ⁵¹Cr:

A actividade citolítica destas células efectoras é medida pela libertação de isótopo das células alvo marcadas. A actividade citolítica é frequentemente testada num ensaio de libertação de crómio, mas estão disponíveis outros métodos. Nos ensaios de libertação de crómio, as células alvo, marcadas com crómio radioactivo (⁵¹Cr), são

misturadas com as CTLs activadas. O crómio radioactivo na forma de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ é captado pelas células vivas, dentro das células o crómio é reduzido. Quando o crómio reduzido é libertado das células lisadas, ele não pode ser reutilizado por outras células, pelo que a quantidade de crómio libertada é uma boa medida da actividade citolítica das células efectoras. Em princípio, pode utilizar-se qualquer tipo de célula como alvos para medir a actividade de CTLs, embora as células activadas, tais como linfoblastos, células de cultura de tecido ou células tumorais tenham provado ser as melhores. A actividade de morte natural é medida pela lise de uma linha de células de referência chamada K562. Aqui, o teste é utilizado para medir a actividade de células LAK ou de clones de células T citotóxicas (efectoras) provenientes do doador ou receptor. As células LAK ou clones de células T matam células alvo que expressam a combinação apropriada de HLA e péptido alo-antigénico.

Uma linha preferencial de células alvo pulsadas com um alo-epítipo de células T seleccionado é a linha de células EBV-LCL HLA-A2-positivas humanas. Além disso, uma fonte generosa de linhas de células leucémicas está acessível através de DSMZ. 1×10^6 células que representam um alvo são colocadas num tubo falcon de 5 mL. As células são centrifugadas e ressuspensas adicionando 10 μL de mistura de $\text{Na}_2^{52}\text{CrO}_4$ (actividade alta) e incubadas 45 min a 37°C. As células marcadas são lavadas três vezes com PBS/FBS e ressuspensas em 1 mL de meio e contadas. As células marcadas são mantidas em gelo, até serem necessárias. Para o ensaio é necessário um volume total de 5 mL de cada tipo de célula alvo, a uma concentração de 5-104 células/mL e a concentração ajustada.

Linfócitos T citotóxicos (CTLs) podem ser gerados de linfócitos T precursores após: 1) estimulação específica por antígenos transportados por células “estimuladoras” na presença de células T acessórias e auxiliares, ou 2) activação policlonal induzida ao longo de quatro a cinco dias por incubação com interleucina-2 e referidas como células LAK. As células efectoras preferidas são transferidas para um tubo Falcon de 50 mL. As células são lavadas e ressuspendidas e ajustadas a uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL. As células efectoras e alvo deveriam ser misturadas em 4 proporções efectora:alvo diferentes (50:1, 25:1, 12,5:1, 6:1). Cada proporção efectora:alvo deveria ser testada em triplicado. É preparada uma diluição em série de células efectoras na placa de modo a que o volume total das células efectoras seja de 100 μ L após diluição. Em seguida são adicionados 100 μ L de suspensão de células alvo. O número de células alvo por poço deveria ser de 5000. Inclui poços para libertação espontânea e máxima, 100 μ L de meio que contém apenas células alvo. Incubar as placas a 37 °C, e 5% de CO₂ durante 4 horas. Após 4 h, colher e contar no contador gama do ensaio de citotoxicidade.

Exemplo 14

Protocolo de Vacina A

São utilizados alo-antígenos codificados por SNP seleccionados na forma da proteína polimórfica completa ou pelo menos na forma de uma porção peptídica polimórfica daquela. Algumas proteínas e péptidos serão imunogénicos, enquanto outros não terão imunogenicidade. Esta falta é muito prontamente superada acoplando a proteína ou péptido

a um veículo. Os veículos úteis incluem a hemocianina da lapa de líster (KLH), albumina de soro de bovino (BSA), *Mycobacterium bovis* BCG ou derivado proteico purificado da tuberculina, ou subunidade B da toxina da cólera. O acoplamento pode ser conseguido com qualquer reticulador bifuncional. Pode ser utilizado um reagente homobifuncional tal como Suberato de Bis(sulfossuccinimidilo), Suberato De Dissuccinimidilo ou Glutaraldeído. Nos casos em que é desconhecido se uma das proteínas ou péptidos apresenta grupos acessíveis para reticulação pode ser vantajosa a utilização de reagentes heterobifuncionais. Os reagentes heterobifuncionais como a m-Maleimidobenzoil-N-Hidroxisuccinimida ou Sulfom- Maleimidobenzoil-N-Hidroxisuccinimida são, entre outros, conhecidos na técnica e podem ser seleccionados de acordo com as propriedades bioquímicas dos compostos a serem conjugados. O veículo conjugado com o antígeno de eleição no exemplo preferido é um conjugado de KLH-antígeno e pode ser preferencialmente utilizado em conjunto com o adjuvante imune QS-21. Outras formulações de antígeno compreendem ISCOMs, MDP, *Mycobacterium bovis* BCG ou Hidróxido de alumínio. As saponinas ou os oligonucleótidos CpG são capazes de intensificar as respostas imunológicas e podem ser úteis para sequências ou conjugados de antígenos seleccionados. Os procedimentos alternativos incluem vacinação repetida com o antígeno seleccionado.

Após agitação intensiva, a administração a um indivíduo humano é feita através da via intravenosa, intratumoral, intradérmica, subcutânea ou oral. A administração deveria ser preferencialmente feita nos dias 0, 7 e 14. Opcionalmente, também podem ser incluídos péptidos do

epítopo de células B, assim como o podem ser as aplicações de reforço.

Protocolo de Vacina B

O agente de vacina proposto é uma estirpe atenuada da bactéria *Salmonella typhimurium*, portadora de um plasmídeo replicante no qual foi inserida a sequência de ADN apropriada, que é capaz de expressar os péptidos de alo-antigénios que codificam o SNP de interesse in vivo. Como um vector, nós propomos a estirpe atenuada de *Salmonella typhimurium* X 4072 (Schödel *et al.*, *Infect. Immun.* 1994, 62: 1669-1676) a qual tem mutações Δ crp-1 e Δ cya que a tornam não virulenta e uma mutação Δ asdA-1 que a torna inviável a menos que esteja presente um gene asdA normal num plasmídeo interno. No entanto, no lugar desta podem ser utilizadas outras estirpes bacterianas seguras.

O plasmídeo pYAN é uma forma de pYA292 que está modificado para ter um sítio Nco I. (Schödel *et al.*, *supra*). A presença do sítio Nco I permite a inserção em grelha no plasmídeo do AUG da proteína ou péptido estranho de interesse. O pYAN carece de genes de resistência a antibióticos, permitindo a utilização de antibióticos caso surjam sintomas sugestivos de patologia por *Salmonella*.

O pYAN é portador de um gene asda normal, o qual mantém a viabilidade apenas daquelas bactérias que retém o plasmídeo. É sintetizada uma sequência de ADN que codifica um AUG seguido das sequências que codificam o péptido. A dose sugerida é de 5×10^4 unidades formadoras de colónias para crianças pequenas e 5×10^5 unidades formadoras de colónias para adultos.

Para os adultos, as bactérias serão administradas com bicarbonato de sódio (2 g de NaHCO_3 em 150 mL de água destilada). Deverá beber-se primeiro 120 mL da solução para neutralizar o ácido gástrico. Um minuto depois, bebe-se os restantes 30 mL da solução de bicarbonato, contendo agora as bactérias. Não é permitida comida nem bebidas durante 90 minutos antes ou após vacinação.

Protocolo de Vacina C

Alternativamente, o ADN pode ser administrado por outras técnicas de administração de ADN tais como aquelas análogas ao protocolo de vacinação descrito por D. Zhang *et al.* (*J. Infect. Dis.* 1997,176: 1035-1040).

Embora as formas de realização preferidas tenham sido descritas acima, os especialistas na técnica compreenderão que podem ser feitas outras modificações dentro do âmbito da invenção. Por exemplo, em vez de expressar o ADN em *E. coli*, poder-se-á otimizar o ADN para outros hospedeiros e expressá-lo naqueles hospedeiros.

Além disso, embora tenham sido identificadas sequências específicas, julga-se que as técnicas da presente invenção possam ser utilizadas para inserir péptidos mais compridos que os 8-10meros desejados, possuindo características de activação de CTL desejáveis. Assim, as reivindicações deverão ser compreendidas do modo mais abrangente possível a fim de avaliar o âmbito total da invenção.

Protocolo de Vacina D

As células dendríticas (DC) são consideradas como vectores vivos para vacinação contra o cancro e são especialmente úteis para administrar os antigénios desta intervenção.

A maioria dos estudos clínicos mais recentes foram realizados utilizando DC geradas ex vivo de precursores CD14⁺ (5,6) (as chamadas DC derivadas de monócitos ou Mo-DC) os quais são presentemente considerados como um padrão de ouro (Thurner B *et al.* J Exp Med. 190: 1669, 1999; Schuler-Thurner B *et al.* J Exp Med. 195: 1279, 2002). As Mo-DC podem ser geradas de modo reprodutível em poucos dias em grandes números (300-500 milhões de DC maduras por aférese) a partir de precursores no sangue (Feuerstein B *et al.* J Immunol Methods. 245: 15-29, 2000). No caso das Mo-DC a escolha dos estímulos de maturação é crítica para o sucesso e especificamente, o PGE2 tem de fazer parte do estímulo de maturação para se obter Mo-DC que expressam CCR7 que migram em resposta aos CCL19 e CCL21 que orientam as DC para órgãos linfóides (Luft T *et al.* Blood. 100:1362, 2002; Scandella E *et al.* Blood. 100: 1354, 2002). Estão disponíveis métodos para a preparação de DCs, que permitem a produção clínica em GMP de uma vacina de péptido à base de DC contra tumores. Podem ser utilizados péptidos portadores de alo-antígenios codificados por SNP para a inserção de péptidos nas DCs. Uma outra abordagem para carregar as DC com antígenios pode ser realizada por captação de ARN nu que codifica o antígeno desejado, através de um protocolo de transfecção ou electroporação (Van Tendeloo VF *et al.* Blood. 98: 49, 2001) e indução subsequente de células T específicas para o antígeno *in vitro* bem como em doentes *in vivo*.

As DCs podem ser carregadas com até 20 epítomos de células T restringidos por HLA de classe I e 10 epítomos de células T restringidos por HLA de classe II e actuarem como um

adjuvante natural para indução das respostas dos CTL específicas para antígenos.

Pode utilizar-se análise ELISPOT (método descrito no exemplo 15) realizada ex vivo, além da tecnologia de tetrâmero e determinação da frequência de CTL, para seguir a resposta imunológica.

Exemplo 15

Avaliação da imunogenicidade e eficácia da vacinação

Em ensaios clínicos com antígenos de cancro, o objectivo primário é determinar a sua imunogenicidade. Isto é geralmente feito medindo marcadores sucedâneos para a activação de linfócitos, tais como citocinas e interferões ou resultados da reacção imunológica tal como a resposta de anticorpo.

Um ensaio padrão conhecido dos especialistas na área determina se há indução de uma resposta de anticorpo específica para (alo)antígenos. Isto é realizado com ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) à base de células ou antígenos utilizando soro obtido de doentes antes e após administração da vacina. As células leucémicas autólogas, ou outras células provocadoras de doença, ou antígenos isolados, especialmente os alo-antígenos portadores da troca de aminoácido daqueles, são alvos adequados para montar um ELISA.

Outro método é a avaliação da imunogenicidade por teste cutâneos de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH). Todos os doentes recebem injecções intradérmicas de antígeno, alo-antígeno ou células cancerosas autólogas

irradiadas, antes e após a administração de vacina. É medido o grau de endurecimento e de eritema que está presente 48 h após injeção. Além disso, o ensaio de DTH pode incluir a colheita de amostras de biópsia que são submetidas a análise imuno-histoquímica para determinar se existe um influxo de células do sistema imunitário.

Uma outra maneira de identificar células efectoras específicas para cancro baseia-se num ensaio recentemente desenvolvido que tem sido útil para determinar células T especificamente activadas geradas após encontrarem um antígeno. As células activadas respondem através da libertação de citocinas e são utilizados anticorpos anti-citocinas para as medir, uma técnica conhecida como ensaios de imunorrevelação enzimática (ELISPOT). O ELISPOT permite realizar e medir a re-estimulação *in vitro* dos linfócitos do doador ou do doente com um grau elevado de sensibilidade.

As citocinas segregadas por células efectoras são quantificadas e pode ser realizada uma análise por citometria de fluxo adicional para medir a frequência das células T. Podem ser utilizados péptidos ou proteínas de referência de vírus da gripe (FLU), Citomegalovírus (CMV) ou toxóide do tétano (TT) para padronizar o sistema. A detecção de secreção de IL-4 ou secreção de IFN-gama é um indicador de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para o antígeno dentro das PBMC normais. As células de memória expressam CD27 e CD28, mas não CD57. Após isolamento e expansão com IL-2, as células recuperadas apresentam citotoxicidade específica para antígeno. A frequência de células T específicas para o antígeno é menor para os antígenos raramente encontrados e apenas moderadamente

imunogénicos tal como TT (1 em 10.000 a 1.000.000), mas muito maior para o vírus CMV persistente (1 em 100 a 10.000 PBMC de doadores seropositivos). Estas técnicas são ferramentas úteis na análise e isolamento de células T específicas para o cancro e alo-antigénios, de acordo com a presente invenção.

Exemplo 16

Medição da alo-activação

Um método para enumerar e medir clinicamente a potência das células T alo-activadas pode compreender a distinção das células activadas das inactivas.

O ensaio de redução do XTT Formazano é vantajoso para comparar a actividade das células alo-activadas relativamente a um controlo não estimulado. O ensaio baseia-se na capacidade de células vivas para reduzir o XTT a corante vermelho-laranja de Formazano, e também é útil para distinguir células activadas de células inactivas. Pode ser utilizado para praticamente todas as células em praticamente todos os meios. A gama útil de células é entre 10^5 e 5×10^6 por mL. Os reagentes são: placas de 96 poços, de fundo plano (não são placas de ELISA), 1 mg/mL de MTT (sal de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrasólio-5-carboxanilínida, Sigma) em PBS (fresco), 1,53 mg/mL de PMS (fluoreto de fenilmetanossulfonilo, Sigma) em PBS (congelado, protegido da luz). O ensaio é realizado colocando 100 μ L de meio de cultura com células numa placa de 96 poços em duplicado ou triplicado. Utilizar 100 μ L de meio sozinho para os controlos. Deixar a primeira coluna em branco. Para desenvolvimento pré-misturar o PMS com XTT imediatamente antes da utilização (5 mg por mL de XTT) e

adicionar 50 mL de XTT a cada poço. Dar pancadas leves na placa para misturar. Cobrir a placa e incubar a 37 °C durante 4 horas. Contar a placa a 470nm (referência 650 nm).

Exemplo 17

Citometria de fluxo para análise da expressão de for CD3/CD69 ou CD3/FDA

Este é um ensaio para analisar a activação de linfócitos T após estimulação de linfócitos mistos alogénicos. A expressão de CD69 ou a actividade esterase correlaciona com a secreção de citocinas e pode ser utilizada como indicador sucedâneo da activação de linfócitos T. Os linfócitos não estimulados não expressam CD69 na sua superfície e têm apenas níveis baixos de esterases não específicas. Uma vez activada por alo-antígenos ou mitogénios não específicos, a expressão de CD69 surge em 48 h (pico às 24 h). A actividade esterase aumenta pouco depois da estimulação, e continua durante vários dias. Nem todas as reacções de linfócitos alo-estimulados ocorre com a mesma cinética, e é preferível medir a activação no dia 1, 2 e 3 da cultura.

As amostras de células do doador e doente são misturadas em culturas pequenas a $0,5 \times 10^6$ células/mL em FCS-RPMI a 2%. Estas culturas são mantidas a 37° C numa incubadora com 5% de CO₂ até ao ensaio.

Exemplo 18

Ensaio de Proliferação de Células

A incorporação de [³H]-timidina no ADN é medida como se segue: Linfócitos reactivos são suspendidos a 1 milhão de

células/mL em soro fetal bovino a 10% contendo RPMI1640, antibióticos (estreptomicina/penicilina) e 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M. Cem μL destas células são aplicados em poços triplicados de uma placa microtítulo de fundo redondo (Costar). Em seguida são preparadas células estimuladoras portadoras de alo-antigénio, de um modo equivalente à preparação das células reactivas, mas são irradiadas com 3000 R (fonte de ^{137}Cs) antes de serem utilizadas. São adicionados cem μL das células estimuladoras às células reactivas e a cultura mista de linfócitos é incubada a 37°C , 5% de CO_2 , durante 7 dias. Depois disso, são adicionados 10 μL de [^3H]-timidina (0,5 mCi/mL, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, Calif.) a cada poço durante 6 h. A placa microtítulo é depois colhida, utilizando um colector MASH, e a quantidade de timidina incorporada é determinada contando os poços colhidos num contador de cintilação líquida. O índice de estimulação (SI) é depois determinado calculando a proporção de cpm da [^3H]-timidina incorporada na cultura mista de linfócitos dividida pelas cpm de [^3H]-timidina incorporada na cultura de controlo (não estimulada). Pode utilizar-se a incorporação de laranja de acridina em vez da incorporação de [^3H]-timidina.

Exemplo 19

Técnica para a identificação de antigénios tumorais

A SEREX, uma abordagem de clonagem serológica (análise serológica de antigénios tumorais por clonagem de expressão de ADNc recombinante), pode ser realizada como descrito por Salim *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 11810-11813). Ver também a Patente U.S. nº 5,698,396, aqui

incorporada por referência. Segundo este pedido são utilizados anti-soros de doentes que sofreram recentemente alo-BMT para identificar antígenos de proteína imunogénicos expressados em células cancerosas perscrutando bibliotecas de expressão construídas a partir do ADNc das células leucémicas do doente. Constatou-se que os clones que codificam antígenos identificados deste modo desencadeiam uma resposta imunológica humoral elevada no doente de onde foram obtidos os anti-soros. Uma tal resposta de IgG elevada implica o reconhecimento de células T auxiliares do antígeno detectado e pode ser especialmente útil para avaliar os doentes após alo-BMT. Os antígenos tumorais expressados podem ser depois perscrutados quanto à presença de motivos de HLA de classe I e classe II e em relação à reactividade com CTLs. A SEREX foi aplicada a uma gama de tipos de tumores, e foi clonado um número de produtos genéticos imunogénicos associados ao cancro (Tiireci *et al.*, *Mol. Med. Today* 1997, 3: 342-349; Sahin *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 1997, 9: 709-716; Old *et al.*, *J. Exp. Med.* 1998, 187: 1163-1167). De acordo com este pedido, os antígenos detectados relacionar-se-ão especificamente com os alo-antígenos, os quais são normalmente não acessíveis através deste método, devido à falta de resposta de anticorpo dirigidas para os mesmos.

Quadro 1A: Antígenos de histocompatibilidade menores de humanos e ratos caracterizados por variantes alélicas múltiplas.

mHags	Proteína/gene	Alelos definidos	Referências
Humanos			
H-Y	Proteína SMCY	1	Wang <i>et al.</i>
H-X	Proteína SMCX	1	Goulmy <i>et al.</i>
DFFRY	Gene específico para Y	2 Genes	Vogt <i>et al.</i>
HA-1	Gene KIAA0223	2	Den Haan <i>et al.</i>
HA-2	Miosina de classe 1	3	Goulmy <i>et al.</i>
HA-3	Desconhecido	n.n.	Goulmy <i>et al.</i>
HA-4	Desconhecido	n.n.	Goulmy <i>et al.</i>
HA-5	Desconhecido	2	Goulmy <i>et al.</i>
HA-8	KAA0020	2	Brickner <i>et al.</i>
HB-1	Gene HB-1	2	Dolstra <i>et al.</i>
CD31	PECAM-1	3	Behar <i>et al.</i>
PR1	Proteinase 3	2	Moldrem <i>et al.</i>
Rato			
AAPDNRETF	Desconhecido	2	Perreault <i>et al.</i>
COI	Cit. Oxidase	2	Morse <i>et al.</i>
H-Y	Proteína SMCY	1	Meadows <i>et al.</i>
H-Y	Proteína UTY	1	Scott <i>et al.</i>
NDI	Desidrogenase	4	Loveland <i>et al.</i>

Quadro 1 B: Colecção de antígenos de histocompatibilidade menores humanos caracterizados por epítomos de células T.

mHag	Gene/proteína	Epítomos de células T que representam disparidade de aminoácidos
Humano		
H-Y	Proteína UTY	LPHNHTDL
H-Y	Proteína SMCY AF273841	SPSVDKARAEI RESEESVSL
H-X	Proteína SMCX NM0044187	FIDSYICQV
DFFRY	Gene específico para Y Y13619	IVDCLTEMY IVDLSEMY
HA-1	KIAA0223/AF09 2537, CD49a	VLHDDLLEA VLRDDLLEA
HA-2	Miosina de classe 1	YIGEVIVSV ILGEVIVSV ILGEVIVSV
HA-3	n.n.	n.n.
HA-4	n.n.	n.n.
HA-8	KIAA0020	PTLDKVLEV PTLDKVLEL RTLDKVLEV
HA-5	n.n.	n.n.
HB-1	CD83 XM004500,	EEKRGSILHWV EEKRGSLYVW
CD31		
Canal de cloreto renal	Q9Y696	FLDGNETL FLDGNETL
Proteinase 3		119 Ile>Val

Quadro 2: Marcadores da superfície celular em doenças hematológicas

Marcador	Sinónimo	Especificidade
CD 1		Timócitos, Células de Langerhans
CD 2		Células T e NK
CD 3		Todos os timócitos, células T e NK
CD 4		Células auxiliares T
CD 5		Todas as células T, algumas células B
CD 7		Todas as células T, algumas células mielóides
CD 8		Células T citotóxicas
CD 10	Antigénio CALLA	Precursor precoce e células pré-B
CD 13		Granulócitos, monócitos
CD 14		Monócitos
CD 15	Leu M2	Todos os granulócitos, Células de Reed Sternberg
CD 16		Células NK e granulócitos
CD 19		Células pré-B, B, mas não nas células de plasma
CD 20	L26	Células pré-B, mas não nas células de plasma
CD 21	EBV-R	Células B maduras B e dendríticas foliculares
CD 22		B maduras
CD 23		Medula B activada
CD 30	Ki-I	Marcador de activação para B, T e monócitos
CD 33		Progenitor mielóide e monócitos
CD 34		Célula progenitora pluripotente precoce
CD 42	plaqueta GPIb	Progenitor mielóide
CD 45	LCA, antigénio comum de leucócitos	Todos os leucócitos
CD 61	glicoforina de plaquetas	Associada a M7 AML
S100		Células dendríticas entrecruzadas do nó da linfa Para córtex.
CD 103	alfa(E)beta7-intergrina	Células T intraepiteliais

Quadro 3: Trocas de aminoácido em antígenos definidos por SNPs codificadores:

Proteína/clone	Pos. AA na proteína	Troca AA	Fonte do clone	Notas
CD1b				
SS1509573	219	R>H	ADNc	
CD5				
	461	R>T	Genómico	
CD10				
	26	R>P	Genómico	
	44	R>T	Genómico	
	81	R>T	Genómico	
CD11a				
SS2883077	456	I>V	Genómico (inverso)	
	503	L>V	Genómico (inverso)	Limite E/Ib?
SS2077810	186	T>S	Genómico	
101	F>L	Genómico		
CD11c				
	201	F>L	Genómico	
	1126	V>A	Genómico	
CD15				
SS602631	688	D>G	Genómico	
	699	H>Y	Genómico	
	717	V>F	Genómico	
SS568511	577	S>R	Genómico	
SS601426	623	N>D	Genómico (inverso)	
SS599361	585	S>N	Genómico (inverso)	
CD31				
	125	L>V		
	563	N>S		
	80	V>M		
	670	G>R		
CD32				
SS2972668	57	Q>STOP	Genómico (inverso)	
	83	Q>P	Genómico (inverso)	
SS2707025	149	R>H	Genómico (inverso)	
	174	Q>P	Genómico (inverso)	
	180	Q>H	Genómico (inverso)	
CD42b				
ss523802	254	A>S	Genómico (inverso)	
	279	G>W	Genómico (inverso)	
CD49a/HÅ-1				
BG220673	924	F>V		
BG199875	937	A>V		
	961	I>V		
	1018	K>R		
BG207145	984	T>S		
	1097	R>G		
BG213953	1045	N>D		
	1048	S>Y		
BG216186	980	N>D		

	1019	N>L		
BG189057	1089	V>G		
BG181165	1072	S>C		
CD64				
	272	R>H	Genómico	
SS2113895	224	Q>STOP	Genómico	
	272	R>H	Genómico	
SS2628592	224	Q>STOP	Genómico	
	272	R>H	Genómico	
SS848192	224	Q>STOP	Genómico	mesmo que SS831265
SS831265	115	T>M	Genómico	*
SS2494502	115	T>M	Genómico	*
SS791727	105	L>P	Genómico	*
	115	T>M	Genómico	
	115	T>M	Genómico	
	171	M>K	Genómico	
	175	R>H	Genómico	
SS2771101	324	D>N	Genómico	
	338	T>I	Genómico	
SS2763847	324	D>N	Genómico	
	338	T>I	Genómico	
SS2771100	324	D>N	Genómico	
	338	T>I	Genómico	
SS2776265	324	D>N	Genómico	
	338	T>I	Genómico	
	338	T>I	Genómico	
SS2763848	324	D>N	Genómico	
	338	T>I	Genómico	
CD65				
SS2676258	27	W>R	Genómico	
CD83/HB-15				
BI7649019	53	L>M		
	52	L>V		
	51	K>N		
	86	N>S		
BI915668	185	F>S		
BG705577	24	K>Q		
Desmina				
SS2086285	23	G>V	Genómico	*
	25	P>S	Genómico	*
	39	G>P	Genómico	*
	66	S>L	Genómico	
	119	F>S	Genómico	*
	120	A>P	Genómico	*
	121	N>I	Genómico	*
	123	I>M	Genómico	*
SS2857642	134	inserção A	Genómico	*
Glicoforina A				
SS1551184	13	A>E	ADNc	
Raro				
SS149153	206	E>D	Genómico	

SS2969286	1760	I>V	Genómico	
SS22973	1067	N>K	Genómico	
SS1524550	464	G>E	ADNc	
SS15224552	517	Q>H	ADNc	
SMCY				
SS2882267	748	T>A	Genómico	
	755	I>V	Genómico	
	804	R>Q	Genómico	
	817	V>A	Genómico	
Vimentina				
SS1554759	399	T>A	ADNc	

Quadro 4:

Péptidos de Ligação ao HLA de classe I que representam trocas de aminoácido no CD42

Fragmento de péptido CD42b	Tipo de HLA	Pos.	Péptido de ligação ao HLA	Pont.
WKQGV DVKAMTSNVASVQ	HLA-A*0201	9	A M T S N V A S V	27
	HLA-A*0201	6	D V K A M T S N V	14
	HLA-A*0201	1	W K Q G V D V K A	10
	HLA-A*0201	2	K Q G V D V K A M	9
	HLA-A*0201	8	K A M T S N V A S	9
	HLA-A*0201	4	G V D V K A M T S	8
	HLA-A*0201	7	V K A M T S N V A	8
	HLA-A*0203	7	V K A M T S N V A	12
	HLA-A*0203	1	W K Q G V D V K A	9
	HLA A1	4	G V D V K A M T S	10
	HLA A1	10	M T S N V A S V Q	9
	HLA A3	4	G V D V K A M T S	19
WKQGV DVKSMTSNVASVQ	HLA A3	6	D V K A M T S N V	16
	HLA A3	10	M T S N V A S V Q	12
	HLA A3	3	Q G V D V K A M T	8
	HLA A3	8	K A M T S N V A S 8	8
	HLA A3	9	A M T S N V A S V	8
	HLA-A*0201	9	S M T S N V A S V	27
	HLA-A*0201	6	D V K S M T S N V	14
	HLA-A*0201	2	K Q G V D V K S M	10
	HLA-A*0201	4	G V D V K S M T S	8
	HLA-A*0203	7	V K S M T S N V A	9
	HLA A1	4	G V D V K S M T S	10
	HLA A1	10	M T S N V A S V Q	9
PVYKYPGKG CPTLGDEG	HLA A3	4	G V D V K S M T S	16
	HLA A3	6	D V K S M T S N V	14
	HLA A3	10	M T S N V A S V Q	12
	HLA A3	3	Q G V D V K S M T	8
	HLA A3	8	K S M T S N V A S	8
	HLA-A*0201	5	Y P G K G C P T L	17
	HLA-A*0201	4	K Y P G K G C P T	8
	HLA A1	3	Y K Y P G K G C P	8
	HLA A3	1	P V Y K Y P G K G	16
	HLA A3	3	Y K Y P G K G C P	10
	HLA A3	4	K Y P G K G C P T	9
	HLA A3	8	K S M T S N V A S	8
PVYKYPGKWCPTLGDEG	HLA-A*0201	5	Y P G K W C P T L	15
	HLA-A*0201	4	K Y P G K W C P T	8
	HLA A1	3	Y K Y P G K W C P	8
	HLA A3	1	P V Y K Y P G K W	16
	HLA A3	3	Y K Y P G K W C P	9

Quadro 5

Péptidos de ligação ao HLA que representam trocas de aminoácido em proteínas CD seleccionadas:

Proteína	Seq. Péptido	HLA	Pos.	Seq. Péptido	Pont.
CD11c	FSNKFQTHFTFEEFRRT	HLA-A*0201	9	FTFEEFRRT	12
		HLA A1	9	FTFEEFRRT	10
		HLA A1	6	QTHFTFEEF	9
		HLA A3	3	NKFQTHETF	8
	FSNKFQTHLTFEEFRRT	HLA-A*0201	1	FSNKFQTHL	13
		HLA-A*0201	9	LTFFEEFRRT	13
		HLA A1	6	QTHLTFEEF	9
		HLA A1	9	LTFFEEFRRT	9
		HLA A3	8	HLTFEEFR	14
		HLA A3	3	NKFQTHLTF	11
	LLLALITAVLYKVGFFK	HLA-A*0201	1	LLLALITAV	30
		HLA-A*0201	2	LLALITAVL	28
		HLA-A*0201	5	LITAVLYKV	26
		HLA-A*0201	4	ALITAVLYK	19
		HLA-A*0201	8	AVLYKVGFF	12
		HLA-A*0201	9	VLYKVGFFK	12
		HLA-A*0201	3	LALITAVLY	10
		HLA-A*0201	6	ITAVLYKVG	8
		HLA-A*0201	7	TAVLYKVG	8
		HLA A1	3	LALITAVLY	17
		HLA A1	4	ALITAVLYK	9
		HLA A3	4	ALITAVLYK	29
		HLA A3	9	VLYKVGFFK	28
		HLA A3	8	AVLYKVGFF	21
		HLA A3	2	LLALITAVL	19
		HLA A3	1	LLLALITAV	16
		HLA A3	3	LALITAVLY	16
		HLA A3	5	LITAVLYKV	11
		HLA A3	7	TAVLYKVG	9
	LLLALITAALYKLGFFK	HLA-A*0201	2	LLALITAAL	29
		HLA-A*0201	5	LITAALYKL	26
		HLA-A*0201	1	LLLALITAA	24
		HLA-A*0201	4	ALITAALYK	15
		HLA-A*0201	9	ALYKLGFFK	14
		HLA-A*0201	8	AALYKLGFF	12
		HLA-A*0201	3	LALITAALY	10
		HLA-A*0201	7	TAALYKLG	9
		HLA-A*0201	6	ITAALYKLG	8
		HLA-A*0203	1	LLLALITAA	9

		HLA A1	3	LALITAALY	17
		HLA A1	4	ALITAALYK	8
		HLA A1	6	ITAALYKLG	8
		HLA A3	4	ALITAALYK 32	32
		HLA A3	9	ALYKLGFFK	30
		HLA A3	1	LLLALITAA	16
		HLA A3	2	LLALITAA	16
		HLA A3	3	LALITAALY	15
		HLA A3	8	AALYKLGFF	11
		HLA A3	5	LITAALYKL	10
		HLA A3	7	TAALYKLG	9
CD15	VTYLQNGKDRKYFHHN	HLA-A*0201	3	YLQNGKDRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKD	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKDRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKDRKY	18
		HLA A1	1	VTYLQNGKD	12
		HLA A1	7	GKDRKYFHH	10
		HLA A3	3	YLQNGKDRK	23
		HLA A3	2	TYLQNGKDR	9
		HLA A3	4	LQNGKDRKY	9
		HLA A3	6	NGKDRKYFH	8
		HLA A3	7	GKDRKYFHH	8
	VTYLQNGKGRKYFHHN	HLA-A*0201	3	YLQNGKGRK	14
		HLA-A*0201	1	VTYLQNGKG	8
		HLA-A*0201	4	LQNGKGRKY	8
		HLA A1	4	LQNGKGRKY	19
		HLA A1	1	VTYLQNGKG	12
		HLA A3	3	YLQNGKGRK	24
		HLA A3	4	LQNGKGRKY	12
		HLA A3	2	TYLQNGKGR	9
		HLA A3	5	QNGKGRKYF	9
		HLA A3	6	NGKGRKYFH	9
		HLA A3	7	GKGRKYFHH	8
	GSYFCRGLVGSKNVSS	HLA-A*0201	7	GLVGSKNV	14
		HLA-A*0201	6	RGLVGSKNV	13
		HLA-A*0201	1	GSYFCRGLV	11
		HLA-A*0201	3	YFCRGLVGS	11
		HLA-A*0201	8	LVGSKNVSS	11
		HLA-A*0201	4	FCRGLVGSK	10
		HLA A1	2	SYFCRGLVG	10
		HLA A3	4	FCRGLVGSK	18
		HLA A3	8	LVGSKNVSS	17
		HLA A3	7	GLVGSKNV	16
		HLA A3	2	SYFCRGLVG	13
		HLA A3	3	YFCRGLVGS	9

	HLA A3	5	CRGLVGSKN	8
	HLA A3	6	RGLVGSKNV	8
GSYFCRGLFGSKNVSE	HLA-A*0201	7	GLFGSKNV	15
	HLA-A*0201	6	RGLFGSKNV	12
	HLA-A*0201	3	YFCRGLFGS	9
	HLA A1	2	SYFCRGLFG	9
	HLA A3	4	FCRGLFGSK	18
	HLA A3	7	GLFGSKNV	16
	HLA A3	1	GSYFCRGLF	10
	HLA A3	2	SYFCRGLFG	9
	HLA A3	6	RGLFGSKNV	8
VTYLQNGKDRKYFHHN	HLA-A*0201	3	YLQNGKDRK	14
	HLA-A*0201	1	VTYLQNGKD	8
	HLA-A*0201	4	LQNGKDRKY	8
	HLA A1	4	LQNGKDRKY	18
	HLA A1	1	VTYLQNGKD	12
	HLA A1	7	GKDRKYFHH	10
	HLA A3	3	YLQNGKDRK	23
	HLA A3	2	TYLQNGKDR	9
	HLA A3	4	LQNGKDRKY	9
	HLA A3	6	NGKDRKYFH	8
	HLA A3	7	GKDRKYFHH	8
VTYLQNGKGRKYFHHN	HLA-A*0201	3	YLQNGKGRK	14
	HLA-A*0201	1	VTYLQNGKG	8
	HLA-A*0201	4	LQNGKGRKY	8
	HLA A1	4	LQNGKGRKY	19
	HLA A1	1	VTYLQNGKG	12
	HLA A3	3	YLQNGKGRK	24
	HLA A3	4	LQNGKGRKY	12
	HLA A3	2	TYLQNGKGR	9
	HLA A3	5	QNGKGRKYF	9
	HLA A3	6	NGKGRKYFH	9
	HLA A3	7	GKGRKYFHH	8
SGSYFCRGLVGSKNVSE	HLA-A*0201	8	GLVGSKNV	14
	HLA-A*0201	1	SGSYFCRGL	13
	HLA-A*0201	7	RGLVGSKNV	13
	HLA-A*0201	2	GSYFCRGLV	11
	HLA-A*0201	4	YFCRGLVGS	11
	HLA-A*0201	9	LVGSKNVSS	11
	HLA-A*0201	5	FCRGLVGSK	10
	HLA A1	3	SYFCRGLVG	10
	HLA A3	5	FCRGLVGSK	18
	HLA A3	9	LVGSKNVSS	17
	HLA A3	8	GLVGSKNV	16
	HLA A3	3	SYFCRGLVG	13

	HLA A3	4	YFCRGLVGS	9
	HLA A3	6	CRGLVGSKN	8
	HLA A3	7	RGLVGSKNV	8
SGSYFCRGLFGSKNVSS E	HLA-A*0201	8	GLFGSKNVS	15
	HLA-A*0201	1	SGSYFCRGL	13
	HLA-A*0201	7	RGLFGSKNV	12
	HLA-A*0201	4	YFCRGLFGS	9
	HLA A1	3	SYFCRGLFG	9
	HLA A3	5	FCRGLFGSK	18
	HLA A3	8	GLFGSKNVS	16
	HLA A3	2	GSYFCRGLF	10
	HLA A3	3	SYFCRGLFG	9
	HLA A3	7	RGLFGSKNV	8
VFLEPQWYSVLEKDSV	HLA-A*0201	2	FLEPQWYSV	25
	HLA-A*0201	8	YSVLEKDSV	14
	HLA-A*0201	3	LEPQWYSVL	12
	HLA A1	2	FLEPQWYSV	18
	HLA A3	2	FLEPQWYSV	15
	HLA A3	5	PQWYSVLEK	13
VFLEPQWYRVLEKDSV	HLA-A*0201	2	FLEPQWYRV	23
	HLA-A*0201	8	YRVLEKDSV	14
	HLA-A*0201	3	LEPQWYRVL	12
	HLA A1	2	FLEPQWYRV	18
	HLA A3	5	PQWYRVLEK	15
	HLA A3	2	FLEPQWYRV	13
	HLA A3	6	QWYRVLEKD	10
VTYLQNGKDRKYFHHNS	HLA-A*0201	3	YLQNGKDRK	14
	HLA-A*0201	1	VTYLQNGKD	8
	HLA-A*0201	4	LQNGKDRKY	8
	HLA A1	4	LQNGKDRKY	18
	HLA A1	1	VTYLQNGKD	12
	HLA A1	7	GKDRKYFHH	10
	HLA A3	3	YLQNGKDRK	23
	HLA A3	2	TYLQNGKDR	9
	HLA A3	4	LQNGKDRKY	9
	HLA A3	6	NGKDRKYFH	8
	HLA A3	7	GKDRKYFHH	8
VTYLQNGKGRKYFHHNS	HLA-A*0201	3	YLQNGKGRK	14
	HLA-A*0201	1	VTYLQNGKG	8
	HLA-A*0201	4	LQNGKGRKY	8
	HLA A1	4	LQNGKGRKY	19
	HLA A1	1	VTYLQNGKG	12
	HLA A3	3	YLQNGKGRK	24
	HLA A3	4	LQNGKGRKY	12
	HLA A3	2	TYLQNGKGR	9

	HLA A3	5	QNGKGRKYF	9
	HLA A3	6	NGKGRKYFH	9
	HLA A3	7	GKGRKYFHH	8
VFLEPQWYSVLEKDSVT YFIDAA	HLA-A*0201	2	FLEPQWYSV	25
	HLA-A*0201	9	SVLEKDSVT	15
	HLA-A*0201	8	YSVLEKDSV	14
	HLA-A*0201	10	VLEKDSVTY	14
	HLA-A*0201	15	SVTYFIDAA	14
	HLA-A*0201	3	LEPQWYSVL	12
	HLA-A*0201	12	EKDSVTYFI	8
	HLA-A*0203	14	DSVTYFIDA	9
	HLA-A*0203	15	SVTYFIDAA	9
	HLA A1	10	VLEKDSVTY	27
	HLA A1	2	FLEPQWYSV	18
	HLA A1	12	EKDSVTYFI	12
	HLA A1	14	DSVTYFIDA	12
	HLA A3	10	VLEKDSVTY	24
	HLA A3	9	SVLEKDSVT	22
	HLA A3	2	FLEPQWYSV	15
	HLA A3	5	PQWYSVLEK	13
	HLA A3	15	SVTYFIDAA	12
VFLEPQWYRVLEKDSVT YFIDAA	HLA-A*0201	2	FLEPQWYRV	23
	HLA-A*0201	8	YRVLEKDSV	14
	HLA-A*0201	10	VLEKDSVTY	14
	HLA-A*0201	15	SVTYFIDAA	14
	HLA-A*0201	9	RVLEKDSVT	13
	HLA-A*0201	3	LEPQWYRVL	12
	HLA-A*0201	12	EKDSVTYFI	8
	HLA-A*0203	14	DSVTYFIDA	9
	HLA A1	15	SVTYFIDAA	9
	HLA A1	10	VLEKDSVTY	27
	HLA A1	2	FLEPQWYRV	18
	HLA A1	12	EKDSVTYFI	12
	HLA A1	14	DSVTYFIDA	12
	HLA A1	5	PQWYRVLEK	7
	HLA A3	9	RVLEKDSVT	25
	HLA A3	10	VLEKDSVTY	24
	HLA A3	5	PQWYRVLEK	15
	HLA A3	2	FLEPQWYRV	13
	HLA A3	15	SVTYFIDAA	12
	HLA A3	6	QWYRVLEKD	10
TVNDSGEYRCQ	HLA A1	2	VNDSGEYRC	13
	HLA A3	1	TVNDSGEYR	18
TVDDSGEYRCQ	HLA A1	2	VDDSGEYRC	13

		HLA A1	1	TVDDSGEYR	11
		HLA A3	1	TVDDSGEYR	18
	STQWFHNESLISSQASS	HLA-A*0201	9	SLISSQASS	18
		HLA-A*0201	2	TQWFHNESL	12
		HLA-A*0201	1	STQWFHNES	10
		HLA-A*0201	5	FHNESLISS	10
		HLA-A*0201	3	QWFHNESLI	9
		HLA-A*0203	7	NESLISSQA	9
		HLA A1	6	HNESLISSQ	10
		HLA A1	1	STQWFHNES	8
		HLA A3	9	SLISSQASS	19
	STQWFHNENLISSQASS	HLA-A*0201	9	NLISSQASS	16
		HLA-A*0201	1	STQWFHNEN	10
		HLA-A*0201	2	TQWFHNENL	10
		HLA-A*0201	3	QWFHNENLI	10
		HLA-A*0201	5	FHNENLISS	10
		HLA-A*0203	7	NENLISSQA	9
		HLA A1	6	HNENLISSQ	10
		HLA A1	1	STQWFHNEN	8
		HLA A3	9	NLISSQASS	18
CD1b	PGRLQLVCHVS	HLA-A*0201	2	GRLQLVCHV	18
		HLA-A*0201	3	RLQLVCHVS	11
		HLA A3	3	RLQLVCHVS	20
		HLA A3	1	PGRLQLVCH	12
	PGHLQLVCHVS	HLA-A*0201	2	GHLQLVCHV	18
		HLA-A*0201	3	HLQLVCHVS	11
		HLA A3	3	HLQLVCHVS	16
		HLA A3	1	PGHLQLVCH	9
CD32	HSPESDSIQWFHNGNLI	HLA-A*0201	7	SIQWFHNGN	13
		HLA-A*0201	8	IQWFHNGNL	12
		HLA-A*0201	9	QWFHNGNLI	10
		HLA A1	2	SPESDSIQW	16
		HLA A1	4	ESDSIQWFH	14
		HLA A3	7	SIQWFHNGN	9
	HSPESDSIPWFHNGNLI	HLA-A*0201	7	SIPWFHNGN	13
		HLA-A*0201	8	IPWFHNGNL	12
		HLA A1	2	SPESDSIPW	16
		HLA A1	4	ESDSIPWFH	14
		HLA A1	6	DSIPWFHNG	11
		HLA A3	7	SIPWFHNGN	9
	GVPGGRNHRAEVPQLEG	HLA-A*0201	4	GGRNHRAEV	15
		HLA-A*0201	7	NHRAEVPOL	15
		HLA-A*0201	1	GVPGGRNHR	10
		HLA-A*0201	2	VPGGRNHRA	8
		HLA-A*0203	2	VPGGRNHRA	9
		HLA A1	9	RAEVPQLEG	17

	HLA A3	1	GVPGGRNHR	19
	HLA A3	6	RNHRAEVPQ	11
	HLA A3	5	GRNHRAEVP	9
	HLA A3	4	GGRNHRAEV	8
	HLA A3	7	NHRAEVPQL	8
GVPGGRNHHAEVPQLEG	HLA-A*0201	4	GGRNHHAEV	15
	HLA-A*0201	7	NHHAEVPQL	15
	HLA-A*0201	1	GVPGGRNHH	10
	HLA-A*0201	2	VPGGRNHHHA	8
	HLA-A*0203	2	VPGGRNHHHA	9
	HLA A1	9	HAEVPQLEG	17
	HLA A3	1	GVPGGRNHH	19
	HLA A3	6	RNHHAEVPQ	8
HILPEWKIQEIFPFGSQL HPTSKP	HLA-A*0201	10	EIFPFGSQL	19
	HLA-A*0201	17	QLLHPTSKP	17
	HLA-A*0201	3	LPEWKIQEI	16
	HLA-A*0201	2	ILPEWKIQE	14
	HLA-A*0201	11	IFPFGSQL	13
	HLA-A*0201	7	KIQEIFPFG	12
	HLA-A*0201	1	HILPEWKIQ	11
	HLA-A*0201	14	FGSQLLHPT	11
	HLA A1	3	LPEWKIQEI	10
	HLA A1	8	IQEIFPFGS	10
	HLA A1	12	FPFGSQLLH	10
	HLA A1	13	PFGSQLLHP	8
	HLA A3	10	EIFPFGSQL	20
	HLA A3	16	SQLLHPTSK	18
	HLA A3	17	QLLHPTSKP	17
	HLA A3	2	ILPEWKIQE	16
	HLA A3	1	HILPEWKIQ	13
	HLA A3	7	KIQEIFPFG	12
	HLA A3	12	FPFGSQLLH	9
	HLA A3	9	QEIPFGSQ	8
HILPEWKIPEILPFGSHLL HPTSKP	HLA-A*0201	11	ILPFGSHLL	24
	HLA-A*0201	10	EILPFGSHL	20
	HLA-A*0201	3	LPEWKIPEI	17
	HLA-A*0201	17	HLLHPTSKP	17
	HLA-A*0201	7	KIPEILPFG	16
	HLA-A*0201	2	ILPEWKIPE	14
	HLA-A*0201	1	HILPEWKIP	11
	HLA-A*0201	14	FGSHLLHPT	11
	HLA-A*0201	6	WKIPEILPF	9
	HLA-A*0201	4	PEWKIPEIL	8
	HLA A1	3	LPEWKIPEI	10

		HLA A1	8	WKIPEILPF	10
		HLA A1	8	IPEILPFGS	10
		HLA A1	12	LPFGSHLLH	9
		HLA A3	10	EILPFGSHL	19
		HLA A3	16	SHLLHPTSK	18
		HLA A3	17	HLLHPTSKP	15
		HLA A3	11	ILPFGSHLL	14
		HLA A3	1	HILPEWKIP	13
		HLA A3	2	ILPEWKIPE	13
		HLA A3	6	WKIPEILPF	12
		HLA A3	7	KIPEILPFG	11
		HLA A3	9	PEILPFGSH	11
		HLA A3	12	LPFGSHLLH	9
CD42b	WKQGV ^Q VDKAMTSNVASV	HLA-A*0201	9	AMTSNVASV	27
		HLA-A*0201	6	DVKAMTSNV	14
		HLA-A*0201	1	WKQGV ^A VDVK	10
		HLA-A*0201	2	KQGV ^A VDVKAM	9
		HLA-A*0201	8	KAMTSNVAS	9
		HLA-A*0201	4	GVDVKAMTS	8
		HLA-A*0201	7	VKAMTSNVA	8
		HLA-A*0203	7	VKAMTSNVA	12
		HLA-A*0203	1	WKQGV ^A VDVK	9
		HLA A1	4	GVDVKAMTS	10
		HLA A1	10	MTSNVASVQ	9
		HLA A3	4	GVDVKAMTS	19
		HLA A3	6	DVKAMTSNV	16
		HLA A3	10	MTSNVASVQ	12
		HLA A3	3	QGVDVKAMT	8
		HLA A3	8	KAMTSNVAS	8
		HLA A3	9	AMTSNVASV	8
	WKQGV ^Q VDKSMTSNVASV	HLA-A*0201	9	SMTSNVASV	27
		HLA-A*0201	6	DVKSMTSNV	14
		HLA-A*0201	2	KQGV ^A VDVKSM	10
		HLA-A*0201	4	GVDVKSMTS	8
		HLA-A*0203	7	VKSMTSNVA	9
		HLA A1	4	GVDVKSMTS	10
		HLA A1	10	MTSNVASVQ	9
		HLA A3	4	GVDVKSMTS	16
		HLA A3	6	DVKSMTSNV	14
		HLA A3	10	MTSNVASVQ	12
		HLA A3	3	QGVDVKSMT	8

		HLA A3	8	KSMTSNVAS	8
	PVYKYPGKGCPTLGDEG	HLA-A*0201	5	YPGKGCPTL	17
		HLA-A*0201	4	KYPGKGCPT	8
		HLA A1	3	YKYPGKGCPT	8
		HLA A3	1	PVYKYPGKG	16
		HLA A3	3	YKYPGKGCPT	10
		HLA A3	4	KYPGKGCPT	9
	PVYKYPGKWCPCLGDEG	HLA-A*0201	5	YPGKWCPCL	15
		HLA-A*0201	4	KYPGKWCPCL	8
		HLA A1	3	YKYPGKWCP	8
		HLA A3	1	PVYKYPGKW	16
		HLA A3	3	YKYPGKWCP	9
CD64	TEDGNVLKRSPELELQV	HLA-A*0201	5	NVLKRSPEL	19
		HLA-A*0201	7	LKRSPELEL	16
		HLA-A*0201	9	RSPELELQV	14
		HLA-A*0201	6	VLKRSPELE	10
		HLA-A*0201	1	TEDGNVLKR	9
		HLA A1	1	TEDGNVLKR	20
		HLA A1	9	RSPELELQV	10
		HLA A3	6	VLKRSPELE	15
		HLA A3	5	NVLKRSPEL	14
		HLA A3	9	RSPELELQV	11
		HLA A3	1	TEDGNVLKR	9
	TEDGNVLKHSPELELQV	HLA-A*0201	5	NVLKHSPEL	19
		HLA-A*0201	7	LKHSPELEL	16
		HLA-A*0201	9	HSPELELQV	14
		HLA-A*0201	6	VLKHSPELE	10
		HLA-A*0201	1	TEDGNVLKH	9
		HLA A1	1	TEDGNVLKH	20
		HLA A1	9	HSPELELQV	10
		HLA A3	5	NVLKHSPEL	12
		HLA A3	6	VLKHSPELE	12
		HLA A3	1	TEDGNVLKH	9
	LLQVSSRVFTEGEPLALR	HLA-A*0201	9	FTEGEPLAL	18
		HLA-A*0201	7	RVFTEGEPL	15
		HLA-A*0201	1	LLQVSSRVF	12
		HLA-A*0201	3	QVSSRVFTE	10
		HLA-A*0201	8	VFTEGEPLA	9
		HLA-A*0201	10	TEGEPLALR	9
		HLA-A*0201	2	LQVSSRVFT	8
		HLA-A*0203	8	VFTEGEPLA	9
		HLA A1	9	FTEGEPLAL	24
		HLA A1	4	VSSRVFTEG	10
		HLA A3	1	LLQVSSRVF	18

	HLA A3	3	QVSSRVFTE	18
	HLA A3	7	RVFTEGEPL	17
	HLA A3	10	TEGEPLALR	8
LLQVSSRVFMEGEPLALR	HLA-A*0201	9	FMEGEPLAL	22
	HLA-A*0201	7	RVFMEGEPL	15
	HLA-A*0201	1	LLQVSSRVF	12
	HLA-A*0201	8	VFMEGEPLA	11
	HLA-A*0201	10	MEGEPLALR	9
	HLA-A*0201	2	LQVSSRVFM	8
	HLA-A*0201	3	QVSSRVFME	8
	HLA-A*0203	8	VFMEGEPLA	9
	HLA A1	9	FMEGEPLAL	18
	HLA A1	4	VSSRVFMEG	10
	HLA A3	1	LLQVSSRVF	18
	HLA A3	7	RVFMEGEPL	17
	HLA A3	3	QVSSRVFME	15
	HLA A3	10	MEGEPLALR	8
NGTYHCSGMGKHRYTSA GI	HLA-A*0201	8	GMGKHRYTS	12
	HLA-A*0201	11	KHRYTSAGI	11
	HLA-A*0201	7	SGMGKHRYT	10
	HLA-A*0203	9	MGKHRYTSA	9
	HLA A1	6	CSGMGKHRY	21
	HLA A3	3	TYHCSGMGK	14
	HLA A3	5	HCSGMGKHR	9
	HLA A3	11	KHRYTSAGI	9
	HLA A3	6	CSGMGKHRY	8
NGTYHCSGKGKHHYTS GI	HLA-A*0201	11	KHHYTSAGI	11
	HLA-A*0201	7	SGKGKHHYT	9
	HLA-A*0201	2	GTYHCSGKG	8
	HLA-A*0203	9	KGKHHYTS	9
	HLA A1	6	CSGKGKHHY	21
	HLA A1	2	GTYHCSGKG	8
	HLA A3	1	NGTYHCSGK	13
	HLA A3	3	TYHCSGKGK	13
	HLA A3	5	HCSGKGKHH	10
	HLA A3	6	CSGKGKHHY	8
ELKRKKKWDLEISLDSG EK	HLA-A*0201	6	KKWDLEISL	16
	HLA-A*0201	9	DLEISLDSG	14
	HLA-A*0201	2	LKRKKKWDL	13
	HLA-A*0201	4	RKKKWDLEI	10
	HLA-A*0201	12	ISLDSGHEK	8
	HLA A1	7	KWDLEISLD	12
	HLA A1	9	DLEISLDSG	11
	HLA A3	12	ISLDSGHEK	18

	HLA A3	1	ELKRKKKKWD	16
	HLA A3	9	DLEISLDSG	13
	HLA A3	10	LEISLDSGH	10
	HLA A3	11	EISLDSGHE	10
	HLA A3	4	RKKKKWDLEI	8
ELKRKKKKWNLEISLDSGH EK	HLA-A*0201	6	KKWNLEISL	15
	HLA-A*0201	9	NLEISLDSG	15
	HLA-A*0201	2	LKRKKKKWNL	13
	HLA-A*0201	4	RKKKKWNLEI	10
	HLA-A*0201	12	ISLDSGHEK	8
	HLA A1	9	NLEISLDSG	11
	HLA A3	12	ISLDSGHEK	18
	HLA A3	1	ELKRKKKKWN	16
	HLA A3	9	NLEISLDSG	13
	HLA A3	10	LEISLDSGH	10
	HLA A3	11	EISLDSGHE	10
	HLA A3	4	RKKKKWNLEI	8
KVTSSLQEDRH	HLA-A*0201	1	KVTSSLQED	10
	HLA A3	1	KVTSSLQED	13
KVISSLQEDRH	HLA-A*0201	1	KVISSLQED	13
	HLA-A*0201	2	VISSLQEDR	10
	HLA A3	1	KVISSLQED	16
	HLA A3	2	VISSLQEDR	12
VSSRVFTEGEPLALR	HLA-A*0201	6	FTEGEPLAL	18
	HLA-A*0201	4	RVFTEGEPL	15
	HLA-A*0201	5	VFTEGEPLA	9
	HLA-A*0201	7	TEGEPLALR	9
	HLA-A*0203	5	VFTEGEPLA	9
	HLA A1	6	FTEGEPLAL	24
	HLA A1	1	VSSRVFTEG	10
	HLA A3	4	RVFTEGEPL	17
	HLA A3	7	TEGEPLALR	8
VSSRVFMEGEPLALR	HLA-A*0201	6	FMEGEPLAL	22
	HLA-A*0201	4	RVFMEGEPL	15
	HLA-A*0201	5	VFMEGEPLA	11
	HLA-A*0201	7	MEGEPLALR	9
	HLA-A*0203	5	VFMEGEPLA	9
	HLA A1	6	FMEGEPLAL	18
	HLA A1	1	VSSRVFMEG	10
	HLA A3	4	RVFMEGEPL	17
	HLA A3	7	MEGEPLALR	8
LQVSSRVFTEGEPLALR	HLA-A*0201	8	FTEGEPLAL	18
	HLA-A*0201	6	RVFTEGEPL	15
	HLA-A*0201	2	QVSSRVFTE	10

		HLA-A*0201	7	VFTEGEPLA	9
		HLA-A*0201	9	TEGEPLALR	9
		HLA-A*0201	1	LQVSSRVFT	8
		HLA-A*0203	7	VFTEGEPLA	9
		HLA A1	8	FTEGEPLAL	24
		HLA A1	3	VSSRVFTEG	10
		HLA A3	2	QVSSRVFTE	18
		HLA A3	6	RVFTEGEPL	17
		HLA A3	9	TEGEPLALR	8
	LQVSSRVFMEGEPLALR	HLA-A*0201	8	FMEGEPLAL	22
		HLA-A*0201	6	RVFMEGEPL	15
		HLA-A*0201	7	VFMEGEPLA	11
		HLA-A*0201	9	MEGEPLALR	9
		HLA-A*0201	1	LQVSSRVFM	8
		HLA-A*0203	7	VFMEGEPLA	9
		HLA A1	8	FMEGEPLAL	18
		HLA A1	3	VSSRVFMEG	10
		HLA A3	6	RVFMEGEPL	17
		HLA A3	2	QVSSRVFME	15
		HLA A3	9	MEGEPLALR	8
CD65	PATTPTPWRTRMLWPS	HLA-A*0201	5	PTPWRTRML	13
		HLA-A*0201	2	ATTPTPWRT	11
		HLA A1	2	ATTPTPWRT	11
		HLA A3	7	PWRTRMLW P	9
		HLA A3	3	TTPTPWRTTR	8
	PATTPTPRRTRMLWPS	HLA-A*0201	5	PTPRRTRML	13
		HLA-A*0201	2	ATTPTPRRT	11
		HLA A1	2	ATTPTPRRT	11
		HLA A1	3	TTPTPRRTR	8
		HLA A3	3	TTPTPRRTR	9
		HLA A3	7	PRRTRMLWP	9
		HLA A3	6	TPRRTRMLW	8
desmina	GGAGGSGSLRASRL	HLA-A*0201	1	GGAGGSGSL	19
		HLA-A*0201	6	SGSLRASRL	12
		HLA-A*0201	3	AGGSGSLRA	9
		HLA-A*0201	4	GGSGSLRAS	8
		HLA-A*0203	3	AGGSGSLRA	10
		HLA A1	3	AGGSGSLRA	9
		HLA A3	2	GAGGSGSLR	12
		HLA A3	5	GSGSLRASR	10
		HLA A3	6	SGSLRASRL	10
		HLA A3	1	GGAGGSGSL	8
	GGAGGLGSLRASRL	HLA-A*0201	1	GGAGGLGSL	23
		HLA-A*0201	5	GLGSLRASR	16

		HLA-A*0201	6	LGSLRASRL	12
		HLA-A*0201	4	GGLGSLRAS	10
		HLA-A*0201	3	AGGLGSLRA	9
		HLA-A*0201	2	GAGGLGSLR	8
		HLA-A*0203	3	AGGLGSLRA	10
		HLA A1	3	AGGLGSLRA	9
		HLA A3	5	GLGSLRASR	20
		HLA A3	2	GAGGLGSLR	12
		HLA A3	3	AGGLGSLRA	9
		HLA A3	6	LGSLRASRL	9
		HLA A3	1	GGAGGLGSL	8
	RRTFGGAPGFPLGSPLS SPVFPRAGFGSKGSSS	HLA-A*0201	12	LGSPVSSPV	15
		HLA-A*0201	11	PLGSPLSSP	14
		HLA-A*0201	4	FGGAPGFPL	12
		HLA-A*0201	15	PLSSPVFPR	12
		HLA-A*0201	2	RTFGGAPGF	11
		HLA-A*0201	8	PGFPLGSPL	11
		HLA-A*0201	6	GAPGFPLGS	10
		HLA-A*0201	16	LSSPVFPRA	9
		HLA-A*0201	5	GGAPGFPLG	8
		HLA-A*0201	7	APGFPLGSP	8
		HLA-A*0201	10	FPLGSPLSS	8
		HLA-A*0203	16	LSSPVFPRA	9
		HLA A1	16	LSSPVFPRA	13
		HLA A1	5	GGAPGFPLG	11
		HLA A1	2	RTFGGAPGF	9
		HLA A1	10	FPLGSPLSS	8
		HLA A3	21	FPRAGFGSK	20
		HLA A3	19	PVFPRAGFG	19
		HLA A3	2	RTFGGAPGF	15
		HLA A3	11	PLGSPLSSP	15
		HLA A3	15	PLSSPVFPR	14
		HLA A3	1	RRTFGGAPG	12
		HLA A3	10	FPLGSPLSS	10
		HLA A3	8	PGFPLGSPL	9
		HLA A3	13	GSPLSSPVF	9
		HLA A3	18	SPVFPRAGF	9
		HLA A3	22	PRAGFGSKG	9
		HLA A3	25	GFGSKGSSS	9
		HLA A3	14	SPLSSPVFP	8
		HLA A3	24	AGFGSKGSS	8
	RRTFGGAPVFSLGSPVSS PVFPRAPFGSKGSSS	HLA-A*0201	11	SLGSPLSSP	19
		HLA-A*0201	4	FGGAPVFSL	18
		HLA-A*0201	12	LGSPVSSPV	15
		HLA-A*0201	8	PVFSLGSPL	13

	HLA-A*0201	1	RRTFGGAPV	12
	HLA-A*0201	15	PLSSPVFPR	12
	HLA-A*0201	2	RTFGGAPVF	10
	HLA-A*0201	16	LSSPVFPRA	9
	HLA-A*0201	6	GAPVFSLGS	8
	HLA-A*0201	10	FSLGSPLSS	
	HLA-A*0203	16	LSSPVFPRA	9
	HLA A1	16	LSSPVFPRA	13
	HLA A1	10	FSLGSPLSS	12
	HLA A1	5	GGAPVFSLG	11
	HLA A1	2	RTFGGAPVF	10
	HLA A3	2	RTFGGAPVF	19
	HLA A3	19	PVFPRAPFG	18
	HLA A3	21	FPRAPFGSK	18
	HLA A3	8	PVFSLGSL	16
	HLA A3	11	SLGSPLSS	16
	HLA A3	15	PLSSPVFPR	14
	HLA A3	1	RRTFGGAPV	12
	HLA A3	10	FSLGSPLSS	10
	HLA A3	22	PRAPFGSKG	10
	HLA A3	13	GSPLSSPVF	9
	HLA A3	18	SPVFPRAPF	9
	HLA A3	25	PFGSKGSSS	9
	HLA A3	5	GGAPVFSLG	8
	HLA A3	14	SPLSSPVFP	8
	HLA A3	24	APFGSKGSS	8
VRFLEQQNALAAEVNRLK	HLA-A*0201	9	ALAAEVNRL	29
	HLA-A*0201	2	RFLEQQNAL	16
	HLA-A*0201	3	FLEQQNALA	16
	HLA-A*0201	6	QQNALAAEV	16
	HLA-A*0201	10	LAAEVNRLK	10
	HLA-A*0201	4	LEQQNALAA	8
	HLA-A*0201	8	NALAAEVNR	8
	HLA-A*0203	1	VRFLEQQNA	9
	HLA-A*0203	3	FLEQQNALA	9
	HLA-A*0203	4	LEQQNALAA	9
	HLA A1	3	FLEQQNALA	17
	HLA A3	9	ALAAEVNRL	16
	HLA A3	3	FLEQQNALA	13
	HLA A3	10	LAAEVNRLK	13
	HLA A3	8	NALAAEVNR	12
	HLA A3	7	QNALAAEVN	11
	HLA A3	6	QQNALAAEV	10
	HLA A3	2	RFLEQQNAL	8
RFLEQQNALAAEVNRLK	HLA-A*0201	9	ALAAEVNRL	29
	HLA-A*0201	2	FLEQQNAAL	23

		HLA-A*0201	6	QNAALAAEV	17
		HLA-A*0201	1	RFLEQQNAA	10
		HLA-A*0201	8	AALAAEVNR	10
		HLA-A*0201	10	LAAEVNRLK	10
		HLA-A*0201	3	LEQQNAALA	8
		HLA-A*0201	5	QQNAALAAE	8
		HLA-A*0203	1	RFLEQQNAA	9
		HLA-A*0203	3	LEQQNAALA	9
		HLA-A*0203	4	EQQNAALAA	9
		HLA A1	2	FLEQQNAAL	15
		HLA A3	9	ALAAEVNRL	16
		HLA A3	8	AALAAEVNR	15
		HLA A3	2	FLEQQNAAL	14
		HLA A3	10	LAAEVNRLK	13
		HLA A3	6	QNAALAAEV	11
		HLA A3	7	NAALAAEVN	9
		HLA A3	1	RFLEQQNAA	8
		HLA A3	4	EQQNAALAA	8
		HLA A3	5	QQNAALAAE	8
Glicoforina a	KIIFVLLLSAIVSISASS	HLA-A*0201	6	LLLSAIVSI	30
		HLA-A*0201	2	IIFVLLLSA	23
		HLA-A*0201	4	FVLLLSAIV	20
		HLA-A*0201	3	IFVLLLSAI	16
		HLA-A*0201	7	LLSAIVSIS	16
		HLA-A*0201	1	KIIFVLLLS	15
		HLA-A*0201	10	AIVSISASS	14
		HLA-A*0201	5	VLLLSAIVS	13
		HLA-A*0201	9	SAIVSISAS	13
		HLA-A*0201	8	LSAIVSISA	10
		HLA-A*0203	8	LSAIVSISA	12
		HLA-A*0203	2	IIFVLLLSA	9
		HLA A1	1	KIIFVLLLS	10
		HLA A1	8	LSAIVSISA	10
		HLA A3	5	VLLLSAIVS	20
		HLA A3	1	KIIFVLLLS	18
		HLA A3	6	LLLSAIVSI	18
		HLA A3	4	FVLLLSAIV	16
		HLA A3	10	AIVSISASS	16
		HLA A3	2	IIFVLLLSA	15
		HLA A3	7	LLSAIVSIS	15
		HLA A3	9	SAIVSISAS	8
	KIIFVLLLSEIVSISASS	HLA-A*0201	6	LLLSEIVSI	30
		HLA-A*0201	2	IIFVLLLSE	19
		HLA-A*0201	4	FVLLLSEIV	18
		HLA-A*0201	7	LLSEIVSIS	18

		HLA-A*0201	3	IFVLLLSEI	17
		HLA-A*0201	1	KIIFVLLLS	15
		HLA-A*0201	5	VLLLSEIVS	13
		HLA-A*0201	9	SEIVSISAS	9
		HLA-A*0201	10	EIVSISASS	9
		HLA-A*0203	8	LSEIVSISA	9
		HLA A1	8	LSEIVSISA	20
		HLA A1	1	KIIFVLLLS	10
		HLA A3	1	KIIFVLLLS	18
		HLA A3	6	LLLSEIVSI	18
		HLA A3	5	VLLLSEIVS	17
		HLA A3	2	IIFVLLLSE	15
		HLA A3	7	LLSEIVSIS	14
		HLA A3	4	FVLLLSEIV	13
		HLA A3	10	EIVSISASS	13
		HLA A3	9	SEIVSISAS	8
Raro	RTVCLDHANLGEGKLSP	HLA-A*0201	7	HANLGEGKL	19
		HLA-A*0201	9	NLGEGKLSP	17
		HLA-A*0201	2	TVCLDHANL	16
		HLA-A*0201	4	CLDHANLGE	12
		HLA-A*0201	5	LDHANLGEG	8
		HLA A1	4	CLDHANLGE	18
		HLA A1	9	NLGEGKLSP	9
		HLA A3	9	NLGEGKLSP	18
		HLA A3	6	DHANLGEGK	15
		HLA A3	2	TVCLDHANL	14
		HLA A3	4	CLDHANLGE	13
		HLA A3	8	ANLGEGKLS	10
	RTVCLDHAKLGEGKLSP	HLA-A*0201	2	TVCLDHAKL	18
		HLA-A*0201	9	KLGEGLSP	18
		HLA-A*0201	7	HAKLGEGKL	17
		HLA-A*0201	4	CLDHAKLGE	12
		HLA-A*0201	5	LDHAKLGEG	9
		HLA A1	4	CLDHAKLGE	17
		HLA A1	9	KLGEGLSP	9
		HLA A3	9	KLGEGLSP	21
		HLA A3	1	RTVCLDHAK	15
		HLA A3	2	TVCLDHAKL	14
		HLA A3	6	DHAKLGEGK	14
		HLA A3	4	CLDHAKLGE	13
		HLA A3	8	AKLGEGKLS	10
	KLAWDFSPGQLDHLFDC FKASW	HLA-A*0201	6	FSPGQLDHL	17
		HLA-A*0201	1	KLAWDFSPG	13
		HLA-A*0201	12	HLFDCFKAS	12

		HLA-A*0201	2	LAWDFSPGQ	11
		HLA-A*0201	3	AWDFSPGQL	11
		HLA-A*0201	10	QLDHLFDCF	11
		HLA-A*0201	9	GQLDHLFDC	8
		HLA-A*0203	12	DHLFDCFKA	9
		HLA A1	10	QLDHLFDCF	14
		HLA A1	5	DFSPGQLDH	12
		HLA A1	3	AWDFSPGQL	11
		HLA A1	14	LFDCFKASW	10
		HLA A1	6	FSPGQLDHL	8
		HLA A3	1	KLAWDFSPG	17
		HLA A3	10	QLDHLFDCF	16
		HLA A3	5	DFSPGQLDH	12
		HLA A3	13	HLFDCFKA S	12
		HLA A3	11	LDHLFDCF K	11
		HLA A3	3	AWDFSPGQL	8
	KLAWDFSPEQLDHLFDC FKASW	HLA-A*0201	6	FSPEQLDHL	17
		HLA-A*0201	1	KLAWDFSPE	13
		HLA-A*0201	2	LAWDFSPEQ	12
		HLA-A*0201	13	HLFDCFKA S	12
		HLA-A*0201	3	AWDFSPEQL	11
		HLA-A*0201	10	QLDHLFDCF	11
		HLA-A*0203	12	DHLFDCFKA	9
		HLA A1	7	SPEQLDHLF	14
		HLA A1	10	QLDHLFDCF	14
		HLA A1	3	AWDFSPEQL	11
		HLA A1	5	DFSPEQLDH	10
		HLA A1	14	LFDCFKASW	10
		HLA A3	1	KLAWDFSPE	17
		HLA A3	10	QLDHLFDCF	16
		HLA A3	13	HLFDCFKA S	12
		HLA A3	11	LDHLFDCF K	11
		HLA A3	5	DFSPEQLDH	10
	VLNLLWNLAQSDDPV	HLA-A*0201	1	VLNLLWNLA	18
		HLA-A*0201	3	NLLWNLAQS	18
		HLA-A*0201	8	LAQSDDPV	18
		HLA-A*0201	4	LLWNLAQSD	16
		HLA-A*0201	6	WNLAQSDDV	12
		HLA-A*0201	7	NLAQSDDPV	12
		HLA-A*0203	1	VLNLLWNLA	9
		HLA A3	3	NLLWNLAQS	18
		HLA A3	4	LLWNLAQSD	16
		HLA A3	7	NLAQSDDPV	15
		HLA A3	1	VLNLLWNLA	11
	VLNLLWNLAHSDDPV	HLA-A*0201	1	VLNLLWNLA	18

		HLA-A*0201	3	NLLWNL AHS	18
		HLA-A*0201	8	LAHSDDVPV	18
		HLA-A*0201	4	LLWNL AHS D	17
		HLA-A*0201	6	WNL AHSDDV	12
		HLA-A*0201	7	NLAHSDDVP	12
		HLA-A*0203	1	VLNLLWNLA	9
		HLA A3	4	LLWNL AHS D	16
		HLA A3	3	NLLWNL AHS	15
		HLA A3	7	NLAHSDDVP	15
		HLA A3	1	VLNLLWNLA	11
		HLA A3	2	LNLLWNLAH	11
	FSPGQLDHLFDC	HLA-A*0201	1	FSPGQLDHL	17
		HLA-A*0201	4	GQLDHLFDC	8
		HLA A1	1	FSPGQLDHL	8
	FSPEQLDHLFDC	HLA-A*0201	1	FSPEQLDHL	17
		HLA A1	2	SPEQLDHLF	14
Smcy	RYTLDELPTMLHKLKIR	HLA-A*0201	6	ELPTMLHKL	24
		HLA-A*0201	3	TLDELPTML	23
		HLA-A*0201	2	YTLDELPTM	20
		HLA-A*0201	9	TMLHKLKIR	14
		HLA-A*0201	8	PTMLHKLKI	13
		HLA A1	8	PTMLHKLKI	14
		HLA A1	4	LDELPTMLH	13
		HLA A1	3	TLDELPTML	12
		HLA A1	5	DELPTMLHK	10
		HLA A1	2	YTLDELPTM	8
		HLA A3	5	DELPTMLHK	18
		HLA A3	3	TLDELPTML	14
		HLA A3	6	ELPTMLHKL	10
		HLA A3	7	LPTMLHKLK	10
		HLA A3	1	RYTLDELPT	8
	RYTLDELPAMLHKLKVR	HLA-A*0201	3	TLDELPAML	25
		HLA-A*0201	6	ELPAMLHKL	24
		HLA-A*0201	2	YTLDELPAM	19
		HLA-A*0201	9	AMLHKLKVR	16
		HLA-A*0201	8	PAMLHKLKV	15
		HLA-A*0203	1	RYTLDELPA	9
		HLA A1	4	LDELPAMLH	13
		HLA A1	3	TLDELPAML	12
		HLA A1	5	DELPAMLHK	10
		HLA A1	2	YTLDELPAM	8
		HLA A1	8	PAMLHKLKV	8
		HLA A3	5	DELPAMLHK	18
		HLA A3	3	TLDELPAML	16
		HLA A3	9	AMLHKLKVR	14

		HLA A3	6	ELPAMLHKL	12
		HLA A3	7	LPAMLHKLK	11
		HLA A3	4	LDELPAMLH	9
		HLA A3	1	RYTLDELPA	8
Vimen- tina	MALDIEIATYRKLEGE	HLA-A*0201	2	ALDIEIATY	20
		HLA-A*0201	6	EIATYRKLL	17
		HLA-A*0201	5	IEIATYRKLL	16
		HLA-A*0201	8	ATYRKLLLEG	15
		HLA-A*0201	1	MALDIEIAT	12
		HLA-A*0201	4	DIEIATYRK	9
		HLA A1	2	ALDIEIATY	27
		HLA A1	8	ATYRKLLLEG	13
		HLA A1	4	DIEIATYRK	10
		HLA A1	7	IATYRKLLLE	8
		HLA A3	2	ALDIEIATY	27
		HLA A3	4	DIEIATYRK	19
		HLA A3	8	ATYRKLLLEG	14
		HLA A3	3	LDIEIATYR	12
		HLA A3	6	EIATYRKLL	10
	MALDIEIAAYRKLEGE	HLA-A*0201	2	ALDIEIAAY	19
		HLA-A*0201	6	EIAAYRKLL	17
		HLA-A*0201	5	IEIAAYRKLL	16
		HLA-A*0201	8	AAYRKLLLEG	15
		HLA-A*0201	1	MALDIEIAA	12
		HLA-A*0201	3	LDIEIAAYR	8
		HLA-A*0201	7	IAAYRKLLLE	8
		HLA-A*0201	9	AYRKLLLEGE	8
		HLA-A*0203	1	MALDIEIAA	11
		HLA A1	2	ALDIEIAAY	27
		HLA A1	4	DIEIAAYRK	10
		HLA A1	7	IAAYRKLLLE	8
		HLA A3	2	ALDIEIAAY	24
		HLA A3	4	DIEIAAYRK	22
		HLA A3	3	LDIEIAAYR	14
		HLA A3	8	AAYRKLLLEG	14
		HLA A3	6	EIAAYRKLL	12
		HLA A3	7	IAAYRKLLLE	8

Quadro 6

Péptidos de ligação ao HLA que representam trocas de aminoácido fora das regiões hipervariáveis dos antígenos de HLA. As variantes alélicas das moléculas de classe I foram identificadas por comparação com HLA-A*2502 de referência:

Alelo HLA-A					posição AA	troca de AA em comparação com (HLAA*250 2 de referência)
A*0230 A*2408 A*2420					3	H>Q
A*2305 A*2425					7	Y>C
A*01011	A*02016	A*0225	A*03011	A*7404	9	Y>F
A*01012	A*0202	A*0226	A*03012	A*7405		
A*0103	A*0203	A*0227	A*03013	A*7406		
A*0106	A*0204	A*0229	A*0302	A*7407		
A*0107	A*0205	A*0230	A*0304	A*7408		
A*0108	A*0206	A*0231	A*0305	A*8001		
A*0109	A*0207	A*0233	A*0306			
A*02011	A*0208	A*0234	A*0307			
A*02012	A*0209	A*0235	A*0308			
A*02013	A*0210	A*0236	A*0309			
A*02014	A*0211	A*0237	A*2503			
A*02015	A*0212	A*0238	A*3201			
A*02016	A*0213	A*0239	A*3202			
A*0202	A*0216	A*0240	A*3203			
A*0203	A*02171	A*0242	A*3204			
A*0204	A*02172	A*0245	A*3205			
A*0207	A*0218	A*0246	A*3206			
A*0209	A*0219	A*0247	A*3601			
A*02011	A*02201	A*0248	A*3602			
A*02012	A*02202	A*0249	A*3603			
A*02013	A*0222	A*0250	A*7401			
A*02014	A*0224	A*0252	A*7402			
A*02015			A*7403			

A*0102	A*2415	A*2616	9	Y>S
A*2301	A*2417	A*3001		
A*2302	A*2418	A*3002		
A*2303	A*2419	A*3003		
A*2305	A*2420	A*3004		
A*2306	A*2421	A*3006		
A*2402101	A*2422	A*3007		
A*2402102	A*2423	A*3009		
A*24022	A*2424	A*3010		
A*24031	A*2425	A*3011		
A*24032	A*2426	A*3207		
A*2404	A*2427			
A*2405	A*2428			
A*2406	A*2429		9	Y>T
A*2407	A*2430			
A*2408	A*2431			
A*2410	A*2432			
A*2413	A*2433			
A*2414	A*2434			
A*2416	A*3103			
A*2901101	A*3104			
A*2902	A*3105			
A*2903	A*3106			
A*2904	A*3301			
A*2905	A*3303			
A*2906	A*3304			
A*31012	A*3305		12	V>M
A*3102	A*3306			
A*0250				
A*6802			17	R>S
A*6815				
A*0102	A*3007			
A*3001	A*3008			
A*3002	A*3009			
A*3003	A*3010			
A*3004	A*3011			
A*3006			19	E>K
A*1102				
A*0242				
A*0221				
A*3006				
A*8001				
A*0109				
A*8001				
A*2615				
A*0231			24	A>S
			30	D>N
			31	T>A
			31	T>S
			33	F>L
			35	R>Q
			36	F>L
			41	A>G

A*0202		43	Q>R
A*0205			
A*0208			
A*0214			
A*0247			
A*01011	A*0108	44	R>K
A*01012	A*0109		
A*0102	A*3601		
A*0103	A*3602		
A*0106	A*3603		
A*0107			
A*3306		52	I>M
A*3305		54	Q>R
A*0107	A*3010	56	G>R
A*3001	A*31012		
A*3002	A*3102		
A*3004	A*3103		
A*3006	A*3104		
A*3007	A*3105		
A*3008	A*3106		
A*3009	A*3404		
A*0228		56	G>S
A*8008		56	G>E

<http://www.eurekah.com/reports/vaccines/kast/01/>

Lisboa, 3 de Novembro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Método para proporcionar epítomos de variantes alélicas de péptidos ou proteínas antigénicos de uma espécie específica com base em uma ou mais trocas de aminoácido relacionadas com a codificação de polimorfismo de um único nucleótido, em que o referido método compreende os passos:

- (i) definir uma proteína ou péptido de interesse ou um subconjunto deste;
- (ii) pesquisar uma base de dados que represente pelo menos duas ou mais bibliotecas de ADN da referida espécie em relação ao referido péptido ou proteína definido ou um subconjunto deste,
- (iii) identificar e seleccionar trocas de aminoácido de variantes alélicas de péptido/proteína, um produto de expressão ou um seu fragmento que é codificado por uma sequência de ADN contendo pelo menos um polimorfismo nucleico único na região de codificação,
- (iv) criar epítomos 8mero a 25mero compreendendo o resíduo aminoácido contendo o referido polimorfismo, e
- (v) seleccionar tais epítomos que se ligam à proteína MHC.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que um estado quimérico com respeito às variantes alélicas foi produzido ou provocado por células alo-transplantadas, e as células do receptor expressam e apresentam variantes alélicas diferentes do doador.

3. Método de acordo com a reivindicação 1-2, em que o péptido ou proteína antigénico está relacionado com uma doença ou distúrbio e a referida doença ou distúrbio requer alo-transplante.

4. Método da reivindicação 3, em que o referido péptido ou proteína antigénico é expressado no tecido ou órgão doente em comparação com células de tecido ou órgão normal.

5. Método da reivindicação 2 ou 4, em que a referida doença ou distúrbio é cancro e o referido tecido ou órgão são cancerosos.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que as células cancerosas do receptor expressavam a versão alélica que era diferente daquela das células alo-transplantadas do doador.

7. Método da reivindicação 1, em que a proteína MHC é uma molécula HLA.

8. Método de qualquer uma das reivindicações 1 - 7, em que os epítomos criados pelo passo (iv) da reivindicação 1 são péptidos 9meros a 16meros.

9. Método de qualquer uma das reivindicações 1 - 8, em que os epítomos induzem uma resposta imunológica de doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD).

10. Método de qualquer uma das reivindicações 1 - 8, em que os epítomos induzem uma resposta imunológica de enxerto contra o tumor (GVT).

11. Método de qualquer uma das reivindicações 1 - 10, em que a referida proteína ou polipéptido de interesse é seleccionado dos antigénios listados no Quadros 1 - 6.

12. Método para gerar um perfil de SNP de um ou mais indivíduos de uma dada espécie aplicando o método da reivindicação 1 em relação a uma multiplicidade de proteínas dos referidos indivíduos.

13. Método da reivindicação 12, em que o referido perfil de SNP estava relacionado com a doença.

14. Método da reivindicação 13, em que a referida doença é cancro.

15. Método para diagnosticar uma doença num indivíduo gerando o seu perfil polimórfico relacionado com SNP pelo método da reivindicação 12.

16. Método ex-vivo para determinar e seleccionar variantes alélicas diferentes de uma proteína específica de um primeiro indivíduo em comparação com a de um segundo indivíduo da mesma espécie, em que a referida diferença provém de uma condição patogénica ou doença específica de um dos referidos indivíduos, em que o método compreende os passos seguintes:

- (i) recolher uma amostra do tecido ou órgão seleccionado do primeiro indivíduo bem como do segundo indivíduo,
- (ii) pesquisar cada amostra em relação a pelo menos uma disparidade de um único aminoácido de variantes alélicas da referida proteína, disparidade essa que se liga à proteína HLA e é codificada por um SNP único, ou seu produto de expressão, ou um fragmento deste produto de expressão, e
- (iii) seleccionar as disparidades que ocorrem apenas num dos indivíduos.

17. Método da reivindicação 16, em que a amostra provém de tecido doente e a disparidade de aminoácido ocorre no indivíduo que está numa condição patogénica.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que um péptido ou polipéptido que representa a referida disparidade de um único aminoácido se liga apenas ou preferencialmente à célula que apresenta o antigénio ou à proteína HLA do indivíduo doente.

19. Método da reivindicação 18, em que o referido péptido ou polipéptido é reconhecido por linfócitos T citotóxicos (CTLs).

Lisboa, 3 de Novembro de 2009