



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 971**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07712817 .1**

96 Fecha de presentación : **02.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1989544**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Ensayos de células T.**

30 Prioridad: **02.03.2006 GB 0604170**
29.09.2006 GB 0619374
11.10.2006 GB 0620123

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73 Titular/es: **ANTITOPE LIMITED**
Babraham Institute
Babraham, Cambridge CB2 4AT, GB

72 Inventor/es: **Baker, Mathew;**
Carr, Francis, J.;
Rust, Alyson y
Davies, Laura

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 971 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos de células T

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos de ensayo de células T, en particular donde las respuestas de células T a antígenos de ensayo son incrementadas por la eliminación de células T reguladoras. La presente invención también se refiere a nuevos ensayos donde el tiempo de incubación con antígenos u otras muestras es variado para optimizar la detección de respuestas de células T. En particular, la invención se refiere a ensayos de células T con muestras proteínicas donde detección óptima de epítopes de células T se logra mediante la utilización de múltiples mediciones de puntos de tiempo de la proliferación de células T o liberación de citoquina. Además, la invención se refiere a ensayos de células T donde el tiempo de incubación con antígeno con células que presentan antígenos (APCs) o células T o ambos APCs y células T se varía para optimizar la detección de epítopes de células T. La invención particularmente se refiere a ensayos de células T con muestras inmunomoduladoras o tóxicas que directamente afectan las APCs, células T o ambas APCs y células T. La invención tiene aplicación particular para la medición de respuestas de células T humanas a productos farmacéuticos, alérgenos, irritantes u otras sustancias contactadas por el hombre.

Los ensayos de células T proporcionan un procedimiento efectivo para medir las respuestas de células T a antígenos y otras muestras, especialmente en seres humanos. Dichos ensayos son considerados como ensayos "ex vivo" donde las muestras sanguíneas son tomadas de donadores y procesadas de manera tal que se utilizan cultivos primarios de células sanguíneas directamente en dichos ensayos. Para las muestras proteínicas y peptídicas, se han utilizado ensayos de células T humanas *ex vivo* para detectar epítopes de células T humanas para varios fines incluyendo la evaluación de la potencial inmunogenicidad de dichas muestras en hombre (Jones et al., I., J. Interferon Cytokine Res., volumen 24 (2004) p560-572), lo que define epítopes de células T dentro de una secuencia proteica para la posterior inclusión en vacunas, y lo que define epítopes de células T dentro de una secuencia proteica para la eliminación posterior para evitar la inmunogenicidad (Jones et al., J., Interferon Cytokine Res., volumen 24 (2004) página 560-572, y Jones et al, Ja Thromb. Haemost., volumen 3 (2005) página 1-10). Los procedimientos de ensayo de células T actuales incluyen ampliamente incubar muestras proteínicas o peptídicas con una mezcla de APCs y células T previo a la medición de la respuestas de células T, o incubar muestras proteínicas o peptídicas con APCs y después añadir células T previo a la medición de las respuestas de células T. En ambos tipos de ensayo, se utilizan múltiples muestras sanguíneas individualmente para el ensayo paralelo de cada muestra proteínica o peptídica individual, y las respuestas de células T después se miden habitualmente en un único punto de tiempo. Las respuestas de células T típicamente se miden mediante la incorporación de un pulso de etiqueta radiactiva tal como timidina tritiada (3HTdR) en células T proliferantes ("Proliferación de células T" o mediante la liberación de citoquinas tales como IL-2 de células T activadas ("liberación de citoquinas").

Los procedimientos de ensayo de células T actuales para detectar epítopes de células T son limitados por uno o ambos de sensibilidad pobre y/o interferencia debido a las muestras tóxicas o inmunomoduladoras que inhiben, estimulan o de otra manera modifican las APCs, células T o ambas APCs y células T. Como tal, los procedimientos de ensayo de células T actuales pueden no detectar algunos o todos los epítopes de células T en ciertas muestras proteínicas y peptídicas y pueden no ser aplicables a la medición de las respuestas de células T a muestras tóxicas o inmunomoduladoras incluyendo muestras proteínicas y peptídicas, muestras no proteínicas incluyendo moléculas orgánicas, y formulaciones de muestras no proteínicas y proteínicas donde la misma formulación puede ser inmunomoduladora o tóxica.

En relación a la sensibilidad, una causa primaria de sensibilidad pobre en ensayos de células T *ex vivo* puede relacionarse con factores en la mezcla de ensayo que reducen las respuestas de células T o antígenos de ensayo incluyendo tipos de células o factores dentro del cultivo de ensayo o por el antígeno de ensayo o las mismas muestras de ensayo. Otras causa de sensibilidad pobre en ensayos de células T *ex vivo* pueden relacionarse con la cinética de las respuestas de células T a epítopes de células T dentro de las muestras proteínicas o peptídicas por donde los epítopes de células T individuales pueden inducir las respuestas de células T en diferentes tiempos. Para la proliferación de células T donde se utiliza un único punto de tiempo, la proliferación de células T con la adición de ciertas muestras puede, por otro lado ser, inicialmente rápida pero después se reducen en el momento cuando un pulso de etiqueta radiactiva se añade de manera tal que no se detecta ninguna respuesta a la proliferación significativa. Por otro lado, la proliferación de células T con la adición de ciertas otras muestras puede ser inicialmente lenta en el momento cuando un pulso de etiqueta radiactiva se añade de manera tal que no se detecta ninguna respuesta de proliferación significativa aunque la proliferación posterior se vuelva significativa. Para la liberación de citoquina donde se utiliza un único punto de tiempo, la producción de citoquinas con la adición de ciertas muestras, por un lado, puede ser inicialmente rápida pero estas citoquinas pueden ser posteriormente consumidas por las células dentro de la mezcla de ensayo de manera tal que no se detecte ninguna citoquina en el punto de tiempo único de ensayo. Por otro lado, la liberación de citoquinas puede ser inicialmente lenta de manera tal que ninguna respuesta de proliferación es detectada en el punto de tiempo único de ensayo aunque la posterior

liberación de citoquinas se vuelva significativa. La cinética de la proliferación o liberación de citoquina puede ser influenciada por un intervalo de factores tales como variación alotípica en respuestas de células T entre diferentes muestras sanguíneas, la eficiencia y cinética de captación y procesamiento por APCs, eficiencia de proteólisis de las muestras proteínicas o peptídicas dentro de APCs, fortaleza y frecuencia de los epítopes de células T dentro de una muestra proteínica o peptídica, afinidad de unión de los epítopes de células T a alotipos MHC de clase II específicos, eficiencia del reconocimiento de los complejos MHC de clase II peptídicos por los receptores de células T, frecuencia y concentración de moléculas de superficie celular co-estimuladora, concentraciones de citoquinas coestimuladoras, estimulación de otras células en la mezcla de ensayo tales como células T CD8⁺ o células T supresoras, la presencia de células T de memoria, y la capacidad de algunas muestras tales como péptidos pequeños de cargarse directamente en moléculas MHC de clase II expresadas en la superficie de APCs.

En relación a la interferencia del ensayo de las células T por las muestras tóxicas o inmunomoduladoras, dichas muestras pueden unirse directamente o ser captadas por APCs, células T o ambas APC y células T. Dichas muestras pueden disminuir o incrementar la función inmunológica normal de APCs y/o células T de manera tal que los epítopes de células T o respuestas de células T a las muestras no sea detectados. Otras causa de interferencia de ensayo de células T por las muestras inmunomoduladoras es a través de la toxicidad a APCs, células T o ambas APCs y células T. Otras causas de interferencia de ensayo de células T por muestras inmunomoduladoras incluyen la reducción o incremento de los subconjuntos de APCs o células T tales como el incremento de células T CD8⁺ o células T supresoras.

A fin de explotar en forma útil los ensayos de células T para un intervalo de aplicaciones especialmente en relación a productos farmacéuticos humanos, existe una necesidad de procedimientos de ensayos de células T más sensibles para la detección óptima de epítopes de células T y también una necesidad de ensayos de células T que puedan utilizarse con muestras tóxicas o inmunomoduladoras.

El documento WO 2004/050706 divulga moléculas CCR5 y FoxP3 que pueden ser moléculas para la depleción o reconocimiento en conformidad con la presente invención. En forma similar, el documento Ep-A-1241249 divulga otras moléculas tales como CTLA-4 y CD4. El documento WO97/39721 divulga genes de citoquina específicos Th2, donde la actividad de los factores de transcripción de los mismos puede modularse en conformidad con la presente invención para regular su expresión. El documento WO99/19484 divulga ciertas moléculas asociadas al receptor de células T (TRAMS).

La presente invención en parte se basa en el descubrimiento de que la eliminación de células T reguladoras de las mezclas de ensayo de células T da como resultado incrementos sustanciales en respuestas de células T colaboradoras a antígenos de ensayo. De ese modo, la presente invención proporciona nuevos procedimientos de ensayo de células T para la detección óptima de epítopes de células T donde la célula T supresora es eliminada de los cultivos dando como resultado un incremento en las respuestas de células T a antígenos de ensayo. Además, la presente invención proporciona nuevos procedimientos de ensayo de células T para la detección óptima de inmunogenicidad en proteínas que modulan las células T y/o APCs, o proteínas que tienen un efecto tóxico en células T y/o APC. La presente invención también puede aplicarse a la detección de compuestos no proteínicos que pueden estimular las células T directamente a través del receptor de célula T, o uniéndose covalentemente a las proteínas, o uniéndose directamente a péptidos unidos por moléculas MHC de clase II, o uniéndose directamente a moléculas MHC de clase II. En particular, la invención proporciona procedimientos donde las células T reguladoras que normalmente reducirían las respuestas de células T efectoras son eliminadas de los cultivos previo a la medición de las respuestas a antígenos de ensayo. Además, la invención proporciona procedimientos con múltiples puntos de tiempo de medición donde los puntos de tiempo después de la incubación con antígenos u otras muestras son optimizados para la detección de las respuestas de células T.

En el primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para medir una respuesta de células T colaboradoras a una sustancia de ensayo que comprende las siguientes etapas:

- (a) aislar células que presentan antígenos (APCs) y células T de una muestra obtenida de un organismo;
- (b) depletar las células T reguladoras de las células aisladas;
- (c) incubar dichas APCs y células depletadas de células T reguladoras obtenidas en el punto (b) con la sustancia de ensayo; y
- (d) ensayar las respuestas de células T a la sustancia de ensayo.

Las APCs y células T normalmente se obtienen de una muestra sanguínea. Sin embargo, pueden utilizarse diferentes fuentes de células T y/o APCs en la invención incluyendo aquellas obtenidas de amígdalas, parches de Peyer, tumores y líneas celulares. En una realización preferible, el procedimiento se lleva a cabo mediante la

utilización de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMCs).

Según se utiliza en la presente memoria el término "depleción" significa la eliminación de algunas de las células T reguladoras. Esto puede realizarse mediante la eliminación física de las células o mediante la inhibición o modulación de la acción de las células T. De ese modo la actividad de las células T reconocidas se reduce. Preferiblemente el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de la actividad de las células T reconocidas es eliminado mediante el proceso de depleción.

Los expertos en la técnica entenderán que, como parte de la presente invención, podría utilizarse un intervalo de procedimientos para la depleción o reconocimiento de células T reguladoras como alternativas a la depleción de células T reguladoras en virtud de CD25^{hi}. También se entenderá que la presente invención también incluirá procedimientos para la modulación de los efectos de células T reguladoras en ensayos de células T. Para la depleción o reconocimiento, pueden utilizarse las moléculas expresadas en la superficie de las células T reguladoras en conjunción con o como alternativas a CD25 para la depleción de estas células. Dichas moléculas pueden incluir pero sin limitarse a GITR, CTLA-4, CD103, receptor 4 de la quimioquina CC, CD62L y CD45RA y también pueden incluir citoquinas asociadas a la superficie o formas superficiales de citoquinas tales como IL-10 y TGFP. La depleción puede lograrse mediante varios procedimientos incluyendo unión a anticuerpos específicos para absorber las células T reguladoras en una fase sólida, o para causar la destrucción o inhibición de dichas células T reguladoras, o de otra manera separar las células T reguladoras de otras células T para los ensayos de células T. Para la modulación, las moléculas segregadas por células T reguladoras puede prevenirse de dicha secreción o pueden ser bloqueadas/inhibidas/destruidas después de la secreción. Dichas moléculas pueden incluir citoquinas tales como IL-10, IL-4, IL-5 y TGFP y dichas moléculas pueden bloquearse mediante la utilización de moléculas orgánicas o inorgánicas que se unen a dichas moléculas, por ejemplo anticuerpos o receptores solubles, o por ácidos nucleicos inhibidores tales como oligonucleótidos antisentido de ARNs, u otros ácidos nucleicos administrados a las células T reguladoras o inducidos dentro de dichas células. La modulación de la actividad de células T reguladoras también puede lograrse localizando los receptores u otras moléculas superficiales en las células T reguladoras incluyendo pero sin limitarse a GITR, CTLA-4, CD103, receptor 4 de la quimioquina CC, CD62L y CD45RA de tal manera como para romper la función supresora de estas células. Dicha inhibición de la función puede lograrse, por ejemplo, mediante anticuerpos específicos en una función agonista o que pueden bloquear las interacciones ligando-blanco de manera tal que las células T reguladoras no son eliminadas sino que se convierten en no funcionales. La modulación de la actividad de células T reguladoras también puede lograrse mediante el bloqueo de los receptores blanco de las moléculas segregadas por las células T reguladoras o mediante el bloqueo de mecanismos activados o reducidos por dichas moléculas segregadas. También para la modulación, las células T reguladoras pueden inhibirse directamente, por ejemplo mediante el bloqueo de los factores de transcripción tales como foxp3 o el bloqueo de otras funciones o mecanismos relacionados con las células T reguladoras. Dicha inhibición o bloqueo puede lograrse mediante moléculas orgánicas o inorgánicas, o mediante ácidos nucleicos inhibidores tales como ARNs, oligonucleótidos antisentido, u otros ácidos nucleicos administrados a las células T reguladoras o inducidos dentro de dichas células. En todos los casos donde se utilizan moléculas de ácido nucleico, inorgánicas u orgánicas para inhibir la acción de o de otra manera modular las células T reguladoras, donde dichas mismas moléculas interfieren con los ensayos de células T, dichas moléculas preferiblemente serán eliminadas de tales ensayos o modificadas a una forma que no interferirá con tales ensayos. Por ejemplo, los anticuerpos o proteínas específicos utilizados para eliminar las moléculas segregadas por células T reguladoras serán selectivamente eliminados previo a los ensayos de células T o serán utilizados en una forma específica que no interferirá con los ensayos de células T. Por ejemplo, para los ensayos de células T humanas, se utilizará una forma humana de un anticuerpo o proteína para evitar respuestas de células T al anticuerpo o la misma proteína.

En los ensayos de células T de la presente invención con antígenos de ensayo que no modulan las células T y/o APCs (típicamente proteínas o péptidos pero también compuestos no proteínicos) las etapas claves son las siguientes;

- (1) las PBMCs son aisladas de muestras sanguíneas humanas
- (2) Opcionalmente se eliminan las células T de CD8⁺
- (3) las células T son depletadas de CD25^{hi}
- (4) Los cultivos se incuban con los antígenos de ensayo en una o más concentraciones y son ensayados en uno o más puntos de tiempo para la proliferación de células T y/o liberación de citoquina

Las etapas claves en los ensayos de células T de la presente invención donde los antígenos de ensayo sí modulan las células T /o APCs son las siguientes;

- (1) Las PBMCs son aisladas de muestras sanguíneas humanas

(2) Las APCs son aisladas, típicamente por adherencia a plástico, las APCs son inducidas para diferenciarlas mediante la utilización de citoquinas y se añade el antígeno de ensayo a las APCs

(3) Las PBMCs autólogas, procesadas por la eliminación previa de células T CD25^{hi} y opcionalmente células T CD8⁺, se mezclan con las APCs

5 (4) Los cultivos son incubados con los antígenos de ensayo en una o más concentraciones y se ensayan en uno o más puntos de tiempo para la proliferación de células T y/o liberación de citoquina .

10 Cuando las sustancias de ensayo son muestras proteínicas y peptídicas o muestras no proteínicas que no son inmunomoduladoras o tóxicas para las APCs o células T, puede utilizarse sangre como una fuente de célula T CD4⁺ y APCs (en forma de monocitos células dendríticas). Típicamente se selecciona un cohorte de donadores que represente mejor el número y frecuencia de los alo tipos HLA-DR expresados en la población mundial o en la población en estudio. Los alo tipos expresados en el cohorte son típicamente >80% de aquellos expresados en la población con todos los alelos HLA-DR principales (alotipos individuales con una frecuencia >5% expresada en la población mundial) siendo bien representados. Alternativamente los alo tipos expresados en el cohorte se eligen para sobrerrepresentar o comprender los alo tipos HLA que se piensa que están asociados a una enfermedad particular

15 en estudio. En una realización preferible de la presente invención, las PBMCs se preparan a partir de muestras sanguíneas mediante el fraccionamiento en gradientes de densidad y después son depletadas de las células T de CD8⁺ y células T de CD25^{hi} de manera tal que la PBMC restante comprende principalmente las células T de CD4⁺ (~70%) y las APCs (monocitos 10-20% y células dendríticas 1-3%). Dichas PBMC depletadas de CD8⁺ CD25^{hi} se establecen en el cultivo celular o se añaden más muestras proteínicas o peptídicas o muestras no proteínicas y se incuban los cultivos.

20

La medición de las respuestas de células T después pueden ser conducidas en un punto de tiempo fijo, o en múltiples puntos de tiempo. Estos puntos de tiempo pueden determinarse mediante la medición de la cinética de las respuestas de células T a muestras similares o una sustancia de optimización.

25 Las condiciones óptimas para un ensayo pueden determinarse mediante la utilización de una sustancia de optimización. Una "sustancia de optimización" según lo que se utiliza en la presente memoria es un compuesto que es conocido por inducir las respuestas de células T, tales como péptidos/proteínas totales tóxicas/inmunomoduladoras, que tienen un tamaño y estructura similares a la muestras que deben ser ensayadas o con propiedades similares a la sustancia de ensayo. Para las muestras proteínicas o peptídicas o muestras no proteínicas, pueden utilizarse uno o más péptidos (típicamente con una longitud de 9-40 aminoácidos) o proteínas totales o compuestos no proteínicos con un tamaño y estructura similares a la muestras que deben ser ensayadas

30 como una sustancia de optimización. Las sustancias de optimización son ensayadas y los resultados se utilizan para definir la cinética de las respuestas típicas de células T. Por ejemplo, las respuestas de células T se miden en diversos puntos de tiempo, mucho más comúnmente entre los días 4 y 9 después de la adición de la muestra mediante la utilización de uno o más de un intervalo de diferentes ensayos alternativos. Una vez que se establece la cinética de las respuestas de células T a la sustancia de optimización, un conjunto de puntos de tiempo del ensayo pueden definirse para el ensayo posterior de las muestras. De esta manera, las respuestas de células T a las muestras de ensayo pueden ensayarse en uno o más puntos de tiempo apropiados. Alternativamente, o además, pueden utilizarse dos o más concentraciones para establecer la cinética de las respuestas de células T a la sustancia de optimización, y las muestras después pueden ensayarse en estas concentraciones.

35

40 La respuesta de células T puede medirse mediante la utilización de un número de diferentes ensayos tales como proliferación de células T por incorporación de un pulso de 3HTdR (u otros compuestos radioactivos, fluorescentes o quimioluminiscentes captados por las células T proliferantes), liberación de citoquinas tales como IL-2 o IFN γ , cambios de transcripción de ARNm, transcripción incrementada del ARNm marcador de activación, flux de Ca²⁺, y cambios en los marcadores fenotípicos especialmente marcadores para las células T activadas. Típicamente, para

45 las muestras proteínicas o peptídicas, las respuestas de células T se medirán mediante la incorporación de un pulso de 3HTdR en los días 5, 6, 7 y 8 después de la adición de la muestra o mediante la medición de la liberación de citoquinas (especialmente IL-2) a los 8 días después de la adición de la muestra (o mediante la incorporación de 3HTdR y las mediciones de liberación de citoquinas). Como una alternativa, especialmente para los péptidos con secuencias altamente superpuestas (por ejemplo 15mers de una secuencia proteica con superposiciones de 12 aminoácidos), puede utilizarse la incorporación de un pulso de 3HTdR y/o la medición de liberación de citoquinas en un único punto de tiempo, típicamente el día 7 después de la adición del péptido de ensayo. Los péptidos superpuestos adyacentes posiblemente contienen epítopes de células T que juntos potencian la sensibilidad para la detección de epítopes de células T.

50

55 Cuando las muestras proteínicas o peptídicas son inmunomoduladores o tóxicos a las APCs o células T, la muestra obtenida del organismo se procesa y las APCs se separan de las otras células. Esto típicamente se lleva a

cabo mediante la adherencia al plástico, y la muestra proteínica o peptídica después se incuba con estas APCs. Las APCs pueden incubarse con citoquinas tales como interleuquina 4, factor estimulador de colonia de macrófagos y granulocitos, factor de necrosis tumoral alfa e interleuquina 1 alfa para inducir un fenotipo de APC maduro. Las muestras en ensayos de células T estándar con APCs pre-fraccionadas habitualmente requerirán un tiempo de incubación de muestra:APC de hasta 48 horas. Preferiblemente, las APC semimaduras se generan mediante la incubación en medio de crecimiento que contiene interleuquina 4 y factor estimulador de colonia de macrófagos y granulocitos durante hasta 4 días. Las muestras incluyendo muestras tóxicas o inmunomoduladoras después se añaden a las APC semimaduras y se incuban durante un período corto. Dependiendo de la toxicidad o función inmunomoduladora de la muestra, los tiempos de incubación con APC semimaduras pueden variar de 3 a 10 horas. Después de la incubación de la muestra:APC, la muestra exógena se elimina mediante lavado repetido de las APC semimaduras. Las APCs usadas de la muestra madura después se generan mediante la incubación con un estímulo pro-inflamatorio tal como factor de necrosis tumoral o interleuquina 1 o ligando CD40 o lipopolisacárido. Se añaden células T autólogas, típicamente células T depletadas de CD4⁺ CD8⁻ CD25^{hi} preparadas a partir de PBMCs como más arriba a las APC pulsadas de la muestra madura. Las células T depletadas de CD4⁺ CD8⁻ CD25^{hi} son incubadas con APCs pulsadas de muestra madura durante un intervalo de puntos de tiempo de incubación adicional. Una sustancia de optimización según lo que se describe más arriba puede utilizarse para establecer la cinética de las respuestas con diferentes puntos de tiempo de incubación de APC y/o diferentes puntos de tiempo de incubación de células T. Los resultados obtenidos con la sustancia de optimización pueden utilizarse para definir un conjunto de puntos de tiempo de incubación de APCs y/o incubación de células T para el posterior ensayo de muestras. De esta manera, las respuestas de células T a las muestras de ensayo se detectan en uno o más de los puntos de tiempo del ensayo. Alternativamente, o además, pueden utilizarse dos o más concentraciones para establecer la cinética de las respuestas de células T a la sustancia de optimización y las muestras después pueden ensayarse en estas concentraciones.

Cuando la muestra que debe ser ensayada es no proteínica, puede utilizarse cualquiera de los procedimientos anteriores (es decir, procedimientos para muestras proteínicas o peptídicas con o sin propiedades inmunomoduladoras o tóxicas) dependiendo de si la muestra no proteínica es inmunomoduladora o tóxica para las APCs, células T o ambas.

Para las muestras no proteínicas o proteínica que son inmunomoduladoras respecto de las APCs, células T o ambas, una etapa adicional opcional es ensayar directamente en cuanto a la reducción o incremento de los marcadores fenotípicos de, por ejemplo, la activación de células T o diferenciación de APCs. Los marcadores típicos de la activación de células T incluyen cambios en la expresión de CD69, CD25, CTLA4, GITR y la medición del flux de Ca²⁺ intracelular. Los marcadores fenotípicos comunes utilizados para evaluar la diferenciación de APCs incluyen MHC clase II, CD80 y CD86, que se expresan altamente en APCs maduras. Estas etapas adicionales pueden proporcionar información acerca de la cinética de respuestas de células T a las muestras de ensayo que asisten en la definición de los puntos de tiempo de ensayo para el ensayo opcional de las respuestas de células T a las muestras de ensayo.

Los nuevos procedimientos de ensayo ex vivo de células T de la presente invención tienen un intervalo de aplicaciones especialmente con relación a los productos farmacéuticos para uso humano. Para las proteínas para el uso esperado como productos farmacéuticos, los ensayos de células T de la presente invención pueden utilizarse para identificar los epítopes de células T dentro de la secuencia proteica mediante el ensayo de péptidos superpuestos de la secuencia proteica. La ubicación y fortaleza de dichos epítopes de células T después pueden utilizarse para la evaluación de la potencial inmunogenicidad de la proteína en el hombre. Alternativamente, los epítopes de células T dentro de la proteína pueden eliminarse posteriormente por mutación de la secuencia proteica previo al uso en el hombre. Los epítopes de células T dentro de ciertas proteínas también pueden ser identificados por procedimientos de la presente invención y después pueden ser incorporados en vacunas mediante la inclusión de la secuencia de epítopes de células T (o variante de la misma) dentro de una vacuna proteica i para la adición a otros componentes como parte de una vacuna.

Los nuevos ensayos de células T de la presente invención pueden utilizarse para la evaluación de la potencial inmunogenicidad de un intervalo de tipos de moléculas incluyendo péptidos, proteínas y no proteínas, incluyendo moléculas orgánicas, lípidos, carbohidratos o moléculas compuestas de dos o más restos diferentes incluyendo conjugados, mezclas y formulaciones. Los ensayos de células T de la presente invención tienen amplia aplicación tanto en investigación, desarrollo, fabricación como en ensayo clínico de productos farmacéuticos. En investigación, por ejemplo, pueden utilizarse las respuestas de células T a diferentes análogos de moléculas activas para evaluar la potencial inmunogenicidad de estos análogos en el hombre. Dichas respuestas de células T de ese modo pueden utilizarse como criterios para la selección de productos farmacéuticos principales para el desarrollo adicional. En desarrollo, por ejemplo, las respuestas de células T a diferentes formulaciones de la misma molécula pueden determinarse para evaluar la potencial inmunogenicidad de estas formulaciones en el hombre. Dichas respuestas de células T de ese modo pueden utilizarse como criterios para la selección de la formulación óptima para los ensayos

clínicos. En fabricación, por ejemplo, las respuestas de células T a los lotes de fabricación de la misma molécula pueden determinarse para evaluar la potencial inmunogenicidad de estos lotes y también para evaluar cualquier cambio en la molécula entre los lotes. Dichas respuestas de células T pueden utilizarse como un ensayo de calidad para la fabricación. En el ensayo clínico, por ejemplo, las respuestas de células T pueden determinarse mediante la
 5 utilización de sangre del paciente, por ejemplo, para evaluar la inmunogenicidad al producto farmacéutico que pasa por los ensayos. Los ensayos de células T de la presente invención también podrían utilizarse en ensayos clínicos para determinar cualquier restricción MHC de las respuestas de células T al producto farmacéutico.

Como una alternativa al uso en la detección de epítopes de células T, los procedimientos de ensayo de células T de la presente invención pueden utilizarse para evaluar las reacciones adversas potenciales a los productos farmacéuticos, preferiblemente para el uso humano. Estas reacciones adversas incluyendo hipersensibilidad, alergia,
 10 carácter irritante, inmunosupresión, estimulación hiperinmune y reacciones en el sitio de inyección. Los procedimientos de ensayo de células T de la presente invención también pueden utilizarse para evaluar las reacciones adversas potenciales a tratamientos con productos no farmacéuticos tales como trasplante, a agentes del medio ambiente tales como alérgenos del polen de hierba, a alimentos, a cosméticos, y a un intervalo de reactivos producidos industrialmente tales como detergentes y enzimas.

Los expertos en la técnica entenderán que puede utilizarse un intervalo de variaciones en los procedimientos de ensayo de células T de la presente invención per que estas variaciones caerán dentro del alcance de la invención, por ejemplo mediante la utilización de múltiples puntos de tiempo de ensayo en el análisis de respuestas de células
 20 T. Por ejemplo, se entenderá que dentro del alcance hay un intervalo de diferentes procedimientos conocidos en la técnica para el análisis de las respuestas de células T incluyendo procedimientos tales como unión de péptido a MHC que determina las etapas individuales hacia una respuesta de las células T. Los ensayos de células T pueden llevarse a cabo con APCs enriquecidas para células Langerhan, diferentes subconjuntos de macrófagos o diferentes subconjuntos de APCs, y/o mediante la utilización de o enriquecimiento de diferentes subconjuntos de células T. También se entenderá que las citoquinas podrían añadirse a (o eliminarse de) la mezclas de ensayo de los ensayos de
 25 células T de la presente invención, por ejemplo, para potenciar la sensibilidad o para reducir o incrementar las APCs específicas o células T. Pueden utilizarse diferentes formatos de ensayos de células T en la invención, por ejemplo formatos de ensayo de memoria donde las células T son cebadas por la presentación de APC de una proteína o péptido y después se someten nuevamente a prueba de provocación por una proteína o péptido relacionado o igual.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar la invención y no deben considerarse como restrictivos del
 30 alcance de la invención.

Ejemplo 1: Efecto de CD25 + depleción de células T en las respuestas de células T

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de capas leucocitarias de dador de comunidad saludable (de sangre extraída dentro de las 24 horas) obtenidas del Servicio Nacional de Transfusión de Sangre (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, RU) y en conformidad con la aprobación otorgada por el Comité Etico de
 35 Investigación Local del Hospital de Addenbrooke. Se aislaron las PBMCs de las capas leucocitarias mediante centrifugación por densidad Ficoll (GE Healthcare, Chalfont St Giles, RU) y las células T de CD8+ se depletaron mediante la utilización de CD8+ RossetteSep™ (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Los dadores fueron caracterizados mediante la identificación de haplotipos de HLA-DR utilizando un kit de tipificación de tejidos en base a SSP-PCR Allset™ (Dynal, Wirral, RU) así como determinando las respuestas de células T a un antígeno de control
 40 *Hemocianina* extraída del molusco llamado lapa californiana (KLH) (Pierce, Cramlington, RU), Toxoide tetánico (Aventis Pasteur, Lyon, Francia) y epítope de péptido de control de Influenza HA (C32, páginas 307-319).

La depleción de las células T de CD25^{hi} se llevó a cabo mediante la utilización de microcuentas anti-CD25 de Miltenyi Biotech (Guildford, RU) mediante la utilización de el protocolo e imán estándar del proveedor. 10 viales de cada
 45 dador se descongelaron y las células se resuspendieron en 30mls de suero humano inactivo al 2%/PBS (Autogen Bioclear, Calne, Wiltshire, RU). 5x10⁷ células se transfirieron a 3 x tubos de 15ml con las células restantes mantenidas como PBMCs totales. Se realizó una mezcla de dilución de microcuentas anti-CD25 mediante la utilización de 300µl de cuentas + 4200µl de tampón de separación (suero humano al 0,5%/2mM EDTA/PBS). Los tubos de 15ml se centrifugaron y se resuspendieron en 500 µl de mezcla de dilución de microcuentas. Los tubos después se mantuvieron a 4°C durante 5, 10 o 20 minutos antes de la separación en la columna. Las columnas se
 50 pusieron hacia arriba mediante la colocación de la columna en el imán soportado en una plataforma, añadiendo 2mls de tampón de separación a la columna y permitiendo que gotee. Después de la incubación con cuentas, se añadieron 10ml de tampón de separación y los tubos se centrifugaron a 1500rpm durante 7 minutos. Las células después se resuspendieron en 500µl de tampón de separación y se añadieron a la columna seguido por 2 x lavados de 1ml con tampón de separación. El flujo a través de la columna se recolectó en tubos de 15ml y contenía la
 55 fracción depleta de células T de CD25^{hi} T. Estas células se centrifugaron a 1500rpm durante 7 minutos y se resuspendieron en 3ml de medio AIMV (Invitrogen, Paisley, RU) antes del recuento.

Las células se tiñeron para CD4 y CD25 y los números de células se detectaron mediante FACS. 5-10x10⁵ células de cada población celular se pusieron en un pocillo de una placa con base en U de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). La placa se centrifugó a 1200rpm durante 4 minutos. Se expulsó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50µl de dilución de anticuerpos. La dilución de anticuerpos consistió en una dilución 1/50 de anticuerpo anti-CD4 etiquetado con FITC (R&D Systems, Minneapolis, EEUU) + dilución 1/25 de anticuerpo anti-CD25 etiquetado con PE (R&D Systems, Minneapolis, EEUU) en tampón FACS (suero humano al 1% /azida de sodio al 0,01% /PBS). Los pocillos de control también se destiñeron, se tiñeron con controles de isotipos o se tiñeron con anticuerpo etiquetado una vez.

Se incubaron las placas en hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Las placas después se centrifugaron a 1200rpm durante 4 minutos. Se expulsó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200µl se tampón FACS. Esto se repitió dos veces y las células después se transfirieron a los tubos FACS. Las células se corrieron a través de un Calibur FACS (Becton Dickinson, Oxford, RU), y los datos se recoletaron y analizaron en base al tamaño, granularidad y etiquetas fluorescentes.

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación de la siguiente manera. Las PBMCs depletadas de células T de CD8+ totales y PBMCs depletadas de CD8+ CD25^{hi} se añadieron a 2 x 10⁵ por pocillo en 100µl de AIMV. Al utilizar placas de 96 pocillos de base plana, se establecieron cultivos por triplicado para cada condición de ensayo. Para cada péptido se añadieron 100µl a los cultivos celulares para dar una concentración final de 5µM. Las célula se incubaron con péptidos y antígenos de proteína durante 7 días antes de pulsar cada pocillo con 1mCl/ml de 3HTdR (GE Healthcare, Chalfont St Giles, RU), durante 18 horas.

Para el ensayo de proliferación, se utilizó un umbral de un índice de estimulación igual a o mayor que 2 (SI≥2) por el que los péptidos que inducen respuestas proliferativas por arriba de este umbral se consideraron positivos (línea puntuada). Todos los datos se analizaron para determinar el coeficiente de varianza (CV), desviación estándar (SD) y significancia (p<0,05) utilizando un ensayo de T no pareada de una dirección para estudiante. Todas las respuestas mostradas con SI≥2 fueron significativamente diferentes (p<0,05) de los controles medios no tratados.

Los resultados se muestran en la figura 1 que representa respuestas proliferativas de células T en PBMCs de tres dadores humanos (475, 440 y 462) a una serie de epitopes de células T débiles o límites (péptidos 1 (PGQTATITCSGHALG), 2 (GDKFVSWYQQSGQS), 6 (IKPEAPGCDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY), 9 (QSISNWLNWYQQKPG), 13 (KGLEWLVIWSDGSS), 17 (AASGFTFSSFGMSWV), 20 (DTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYTFWGQ -GTQV), 24 (HQLSVIKLMPNITLL) y a un par de epitopes de células T fuertes (péptidos 25 (PKYRNMQLNSLKIAT) y 26 (TVFYNIIPMPL) y al antígeno KLH. Los resultados muestran un incremento en las respuestas de células T para todos los péptidos después de la depleción de las células T de CD25^{hi}. Se determinaron las respuestas máximas para todos los péptidos después de la depleción de 10 o 20 minutos de las células T de CD25^{hi}. Estos resultados demostraron incrementos fuertes en las respuestas de células T después de la depleción de células T de CD25^{hi} que, en los ejemplos de péptidos tales como péptidos 1 y 2, permitió la detección de los epítopes de células T en los péptidos previamente clasificados como límites o negativos para las respuestas de células T.

Ejemplo 2 – Ensayos de secuencia temporal de células T de péptido

Los péptidos depletados de epitopes de células T y de tipo salvaje (WT) (HLRHCLSCSKCRKEM y HARHCLSCSKCRKEM, respectivamente) obtenidos de la secuencia de TNFR1s humanos se sintetizaron (Pepscan Systems, Leystad, Países Bajos) y se ensayaron utilizando el procedimiento del ejemplo 1 en el que las PBMC depletadas de las células T de CD8+ CD25^{hi} se utilizaron para comparar los péptidos obtenidos de TNFR-1s en cuanto a la capacidad de estimular las respuestas de células T de veinte dadores saludables. Se establecieron cultivos a granel mediante la adición de 1ml de 2-4x10⁶/ml de PBMC depletadas de células T de CD8+ CD25^{hi} en medio de cultivo AIM V a cada pocillo de una placa de 24 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Cada péptido se ensayó en forma separada contra cada dador mediante la adición de 1ml de 10µM péptido a cada cultivo a granel (concentración final de 5µM para 2ml por cultivo a granel). Para comparación, se establecieron cultivos a granel adicionales para controles no tratados y positivos (KLH). Las muestras replicadas (de blastos T) se eliminaron de los cultivos a granel en los días 6-9 y se evaluó la proliferación en placas de 96 pocillos de base redonda. Los datos se utilizaron para evaluar la magnitud y cinética de las respuestas de células T a cada péptido en los días 6, 7, 8 y 9 posteriores a la estimulación. Además, los mismos veinte dadores saludables utilizados en el ensayo de proliferación de secuencia temporal se ensayaron en cuanto a la producción de IL-2 después de 8 días de cultivo con péptidos TNFR1 utilizando un ensayo Elispot IL-2. Las placas Elispot se pre-humedecieron con etanol al 70% después se recubrieron con anticuerpo de captura IL-2 (R&D systems, Minneapolis, EEUU) durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con PBS (Invitrogen, Paisley, RU) después se bloquearon en BSA al 1%/PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron en PBS previo a la adición de PBMC depletadas de células T de CD8+ CD25^{hi} a 4X10⁵ de células por pocillo y las muestras de ensayo en una

concentración final de 5µM. Después de 7 días a 37°C/ CO₂ al 5% las placas se desarrollaron. Después del lavado con primero agua después PBS, se añadió el anticuerpo de detección de IL-2 (R&D systems, Minneapolis, EEUU) en PBS/BSA al 1% durante 2 horas a 37°C. Después del lavado adicional con PBS, se añadió estreptavidina-AP (R&D systems, Minneapolis, EEUU) durante 1,5 horas, las placas se lavaron nuevamente, después se añadió cromógeno BCIP/NBT (R&D systems, Minneapolis, EEUU) durante 30 minutos. Las placas se lavaron con agua, se secaron, después se analizaron los recuentos de manchas utilizando analizador Immunospot Elispot, software versión 3 (Cleveland, Ohio, EEUU).

Para ambos ensayos de proliferación de células T y Elispot IL-2, las respuestas que excedían un umbral de SI de 2 (línea puntuada) y son significativamente ($p < 0,05$) diferentes que el antecedente (*) se consideraron positivas. Los resultados que se muestran en la figura 2 indican que el péptido WT dio respuestas en los mismos tres dadores humanos (3, 8 y 11) en ambos ensayos de proliferación y Elispot IL-2m lo que indica que este péptido contiene un epítipo de células T. La secuencia temporal de la proliferación indicó que para estos tres dadores, las respuestas de proliferación pico se detectaron 7 días después de la adición de y, en cada caso, el péptido TNFR1 WT hubiera sido clasificado negativo como un epítipo de células T si las respuestas de proliferación se hubieran medido en los puntos de tiempo 8 o 9 días después de la adición de péptido. Estos resultados también muestran una fuerte correlación entre las respuestas de células T medidas por proliferación y Elispot IL-2.

Ejemplo 3 – Ensayos de secuencia temporal de células T de proteína total

Las proteínas TNFR1s humanas de epítipo de células T mutante y de tipo salvaje (WT) se prepararon como proteínas de fusión Fc humanas según lo que se describe en el documento WO/2004/113387 con la proteína depletada del epítipo que posee mutaciones I10Q, T20R, H23P, L56A, L108T, L110H y L149D. Los ensayos de proliferación y Elispot IL-2 se llevaron a cabo como en el ejemplo 2 excepto que 1ml de proteínas TNFR1s se añadieron hasta una concentración final de 10µg/ml. Los datos que se muestran en la figura 3 indican que, para el ensayo de proliferación, las respuestas significativas de células T fueron detectadas en los dadores 13 y 17 para WT pero no la proteína depletada del epítipo de células T mutante. Se observaron las respuestas pico en los días 8 y 9 y ni el dador 13 o 17 mostraron ninguna respuesta significativa el día 6. Para el ensayo de Elispot IL-2, ambos dadores 13 y 17 nuevamente fueron positivos para las respuestas de células T a WT pero no la proteína depletada del epítipo mutante. Además, el dador 4 do una respuesta significativa a la proteína WT en este ensayo. Tal como con el ejemplo 2, los resultados además demuestran la utilidad del ensayo de secuencia temporal en la detección de las respuestas de células T, en este caso a las proteínas totales. Tal como con el ejemplo 2, los resultados muestran una buena correlación entre las respuestas de células T medidas por la proliferación y Elispot IL-2.

Ejemplo 4 – Ensayos de secuencia temporal de células T de proteínas inmunomoduladoras

Este ejemplo ilustra la invención cuando se utiliza para medir las respuestas de células T a una proteína inmunomoduladora, interferona beta humana que es conocida por incrementar las moléculas inhibitoras en células dendríticas tales como HLA-G (Mitsdoerffer M et al J Neuroimmunol. 2005 159: 155-64) y B7-1H (Schreiner B et al J Neuroimmunol. 2004 155:172-82). Para ensayar si los epítopos de células T lineales presentes en la secuencia de IFN beta podrían estimular las células T *in vitro*, se desarrolló un procedimiento modificado para cargar el antígeno en las células dendríticas obtenidas de monocitos en el que los efectos biológicos de IFN beta en las células dendríticas (DC) y células T de CD4+ se minimizaron.

Se aislaron los monocitos de PBMC por adherencia al plástico del cultivo del tejido (>90% CD14+) y se cultivaron en placas de 24 pocillos en medio AIM V con suero AB humano inactivo caliente al 5 % (Autogen Bioclear, Calne, Wiltshire, RU) (medio de crecimiento) en una densidad aproximada de 1×10^6 por pocillo (placa de 24 pocillos). Los monocitos se incubaron en medio de crecimiento que contenía IL-4 humana (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EEUU) y GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EEUU) durante 3 días. El día 3, 44 µg/ml de Betaferon (Schering AG, Berlin, Alemania) se añadieron en 0,5ml de tampón de ensayo más suero AB humano inactivo caliente al 3% y 25mM (concentración final) HEPES pH 8. Los pocillos de control que contenían 50µg/ml de KLH o ningún antígeno (células no tratadas) se incubaron en 1ml de PBS+Tween 20 al 0,01% más suero AB humano inactivo caliente al 3% (tampón estándar). Las DC se incubaron con antígeno durante 6 horas después de los que las DCs se lavaron 6 veces para eliminar IFN beta exógeno. Las células después se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía TNF alfa (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EEUU), GM-CSF y IL-4 durante toda la noche.

El día 4, las células T de CD4+ depletadas de CD8+ CD25hi autólogas se aislaron mediante selección negativa de PBMC (Kit de aislación negativa de CD4+ humano Dynal, Wirral, RU) y después se añadieron a las DCs a 1×10^5 por pocillo en ambas placas de proliferación y Elispot. Se incubaron las placas Elispot durante 6 días antes del desarrollo (como en el ejemplo 2) y las placas de proliferación se incubaron durante 7 días antes de que se midiera la proliferación mediante la incorporación de 3HTdR (u pulso de 6 horas a 1 µCi/pocillo).

Como en el ejemplo 2, para os ensayos de proliferación y Elispot se seleccionó un umbral empírico de índice de

estimulación ≥ 2 donde las respuestas arriba de este umbral se consideraban positivas. Además, el análisis estadístico también se llevó a cabo para determinar si las respuestas eran significativamente deferentes ($p < 0,05$) del control no tratado (*). El análisis adicional para determinar el grado de variación intraensayo incluyó el coeficiente de varianza (CV).

- 5 Los resultados, según lo que se muestra en la figura 4, indican respuestas de células T significativas en 4 de los 29 dadores para el ensayo de proliferación y los mismos 4 de los 29 dadores para el ensayo Elispot IL-2. Estos datos muestran que las respuestas de las células T podrían ser demostradas en forma reproducible aún con una proteína inmunomoduladora.

Ejemplo 5 – Ensayos de secuencia temporal de células T de molécula pequeña

- 10 Carbamazepina (Novartis Pharmaceuticals, RU) y un iminoestilbeno de N-acetilo (un análogo de la carbamazepina sintetizada en conformidad con Ying et al Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 118:233-241) se compararon en cuanto a la capacidad de estimular las respuestas de células T en un panel de dadores saludables. Ambos compuestos se ensayaron a $25\mu\text{g/ml}$ en cultivos a granel separados para cada dador en conformidad con el procedimiento del ejemplo 2. En resumen, los cultivos a granel se establecieron mediante la utilización de $2-4 \times 10^6$ de
- 15 PBMC depletadas de células T de CD8+ CD25hi en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Las muestras replicadas (de blastos T) se eliminaron de los cultivos a granel en los días 5-8 y se evaluó la proliferación en placas de 96 pocillos. Los datos se utilizaron para evaluar la magnitud y cinética de las respuestas de células T a cada compuesto.

- 20 Como para el ejemplo 2, se utilizó un $SI \geq 2$ como umbral para las respuestas positivas y los datos además se analizaron para determinar el coeficiente de varianza (CV), desviación estándar (SD) y significancia ($p < 0,05$) mediante la utilización de análisis estadístico paramétrico o no paramétrico. Cualquier compuesto dado se consideró que era inmunógeno solamente si la respuesta es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con un $SI \geq 2$.

- 25 Los resultados muestran que el iminoestilbeno de N-acetilo del metabolito de carbamazepina estimula menos dadores que la carbamazepina (conocida pro ser un inductor potente de las respuestas alérgicas retrasadas en pacientes) cuando se ensayaron en un intervalo de concentraciones mediante la utilización del procedimiento de ensayo de células T de secuencia temporal. Es claro que la utilización de un ensayo de células T de único punto de tiempo en un gran número de respuestas de células T no habría sido detectado. En vez la mayoría de respuestas de células T contra carbamazepina son inducidas el día 5 con sólo una respuesta adicional detectada los días 6 y 7. La evaluación de las respuestas de células T contra N-acetil y carbamazepina en loa días 6, 7 o 8 no hubiera
- 30 discriminado ningún nivel de inmunogenicidad entre estos dos compuestos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir una respuesta de células T colaboradoras a una sustancia de ensayo que comprende las siguientes etapas:
 - (a) aislar células que presentan antígenos (APCs) y células T de una muestra obtenida de un organismo;
 - 5 (b) depletar células T reguladoras de las células aisladas;
 - (c) incubar dichas APCs y células depletadas de células T reguladoras obtenidas en el punto (b) con la sustancia de ensayo; y
 - (d) ensayar las respuestas de células T a la sustancia de ensayo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho procedimiento además comprende:
 - 10 (ai) separar las células que presentan antígenos (APCs) de otras células; y

la etapa (c) comprende incubar la sustancia de ensayo con las APCs separadas previo a la posterior adición de células depletadas de células T reguladoras.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que las APCs son tratadas con citoquinas previo a la adición de la sustancia de ensayo.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1 a 3 en el que las APCs y células T se obtienen de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que las APCs y células T son humanas.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que las células T reguladoras son depletadas de las células T de CD25^{hi}.
- 20 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que las células T son depletadas de células T de CD8⁺.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que las respuestas de células T son ensayadas mediante la medición de cualquiera o más de la proliferación de células T, liberaciones de citoquinas, Cambios de transcripción de células T, y/u otros marcadores asociados a la activación de células T
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que la proliferación de células T se mide mediante la captación de timidina tritiada.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que la liberación de citoquinas se mide mediante la liberación de IL-2 y/o IFN γ .
- 30 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que las respuestas de células T son ensayadas en más que un punto de tiempo durante la incubación.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11 en el que las APCs son incubadas con la sustancia de ensayo durante más de una longitud de tiempo previo a la adición de dichas células depletadas de las células T.
- 35 13. El procedimiento de la reivindicación 1-12 en el que la sustancia de ensayo es ensayada en más que una concentración.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que una sustancia de optimización es ensayada para determinar el/los tiempo/s óptimo/s y/o concentración/es para ensayar la sustancia de ensayo.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que la sustancia de ensayo es una proteína.
- 40 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que la sustancia de ensayo es un péptido
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que la sustancia de ensayo es una no proteína.

18. El procedimiento de la reivindicación 17 en el que la sustancia de ensayo es una molécula orgánica, un lípido, un carbohidrato o una molécula compuesta de dos o más restos incluyendo conjugados, mezclas y formulaciones.
19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en el que la sustancia de ensayo es inmunomoduladora o tóxica para células T y/o APCs.
- 5 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 en el que se utilizan PBMCs de dador que expresan alotipos HLA representando >80% de la expresión en la población mundial la población en estudio.
21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 en el que se utilizan PBMCs de dador para representar los alotipos HLA conectados a una enfermedad en estudio .
- 10 22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que los péptidos superpuestos de una secuencia proteica son ensayados para identificar epítopes de células T en la secuencia proteica.
23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que una serie de moléculas son ensayadas individualmente para evaluar la inmunogenicidad relativa.
24. El procedimiento de la reivindicación 23 en el que se utilizan las respuestas relativas de células T como base para seleccionar los productos farmacéuticos principales para el desarrollo adicional.
- 15 25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que una sustancia de ensayo es analizada para evaluar la potencial inmunogenicidad.
26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que diferentes formulaciones de una sustancia de ensayo son analizadas para evaluar la inmunogenicidad relativa.
- 20 27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que diferentes lotes de fabricación de una sustancia de ensayo son analizados para evaluar la potencial inmunogenicidad.
28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que una sustancia de ensayo es analizada mediante la utilización de sangre de paciente como una fuente de células T para evaluar la inmunogenicidad a la sustancia de ensayo.
- 25 29. El uso de un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para identificar los epítopes de células T en una secuencia proteica.
30. Uso de un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para evaluar la inmunogenicidad de una sustancia de ensayo.

Figura 1

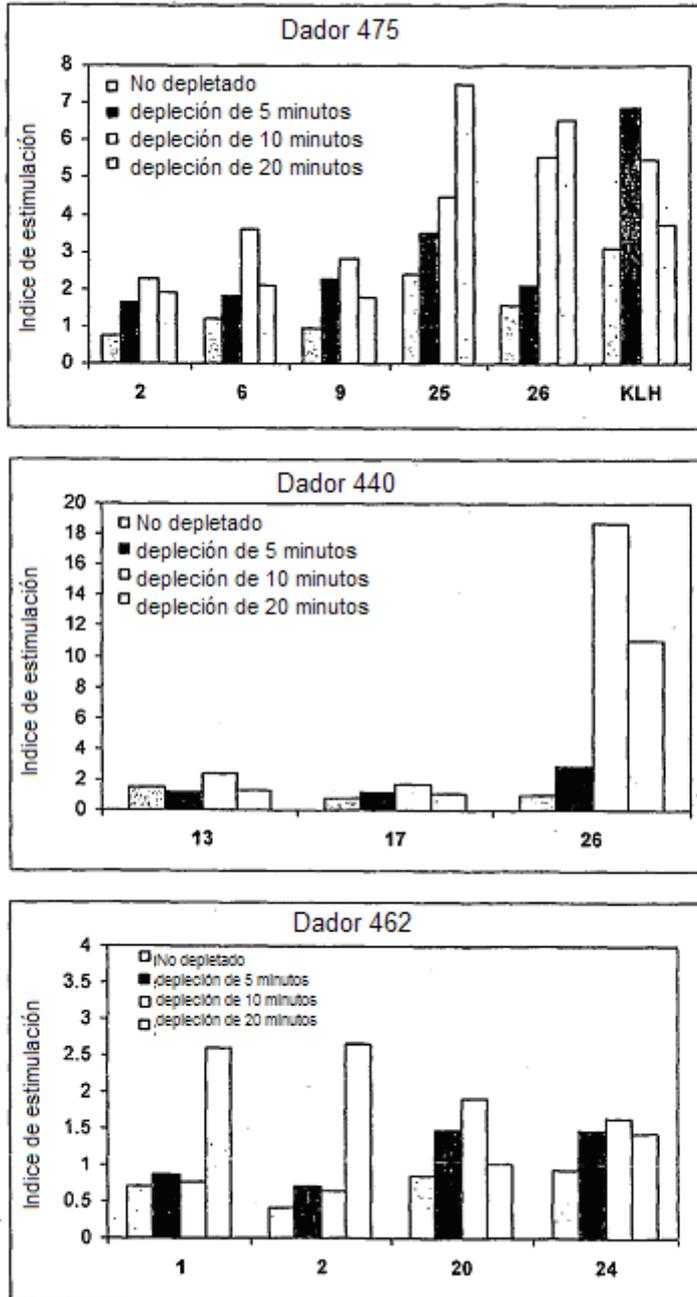


Figura 2

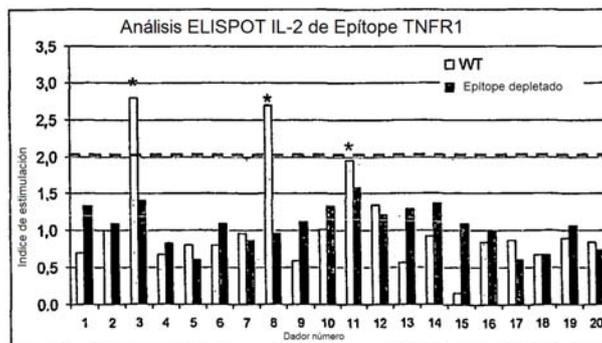
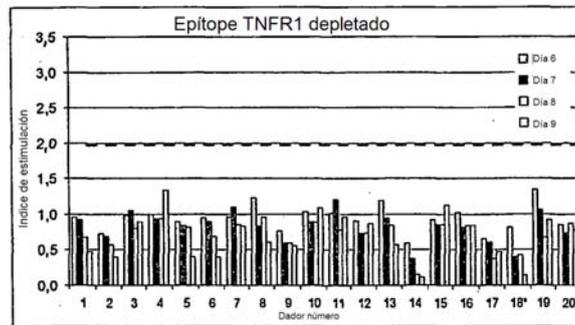
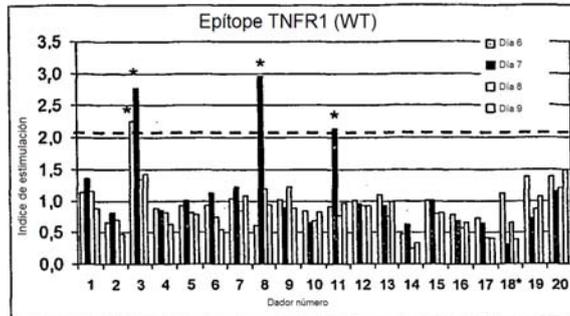


Figura 3

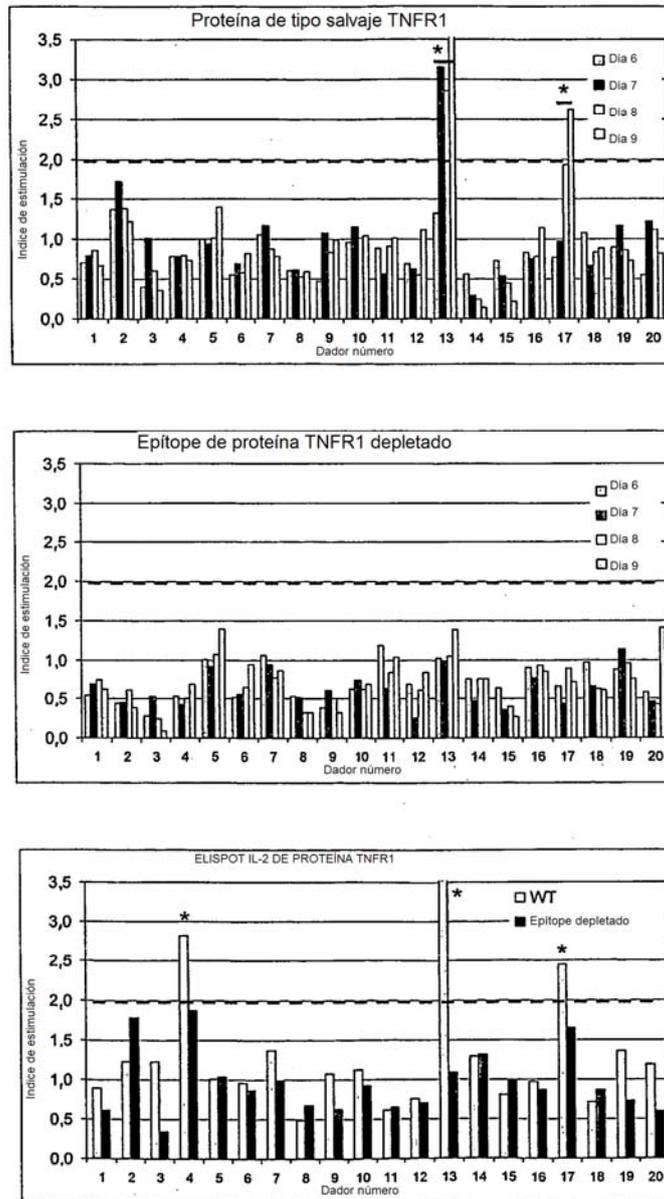


Figura 4

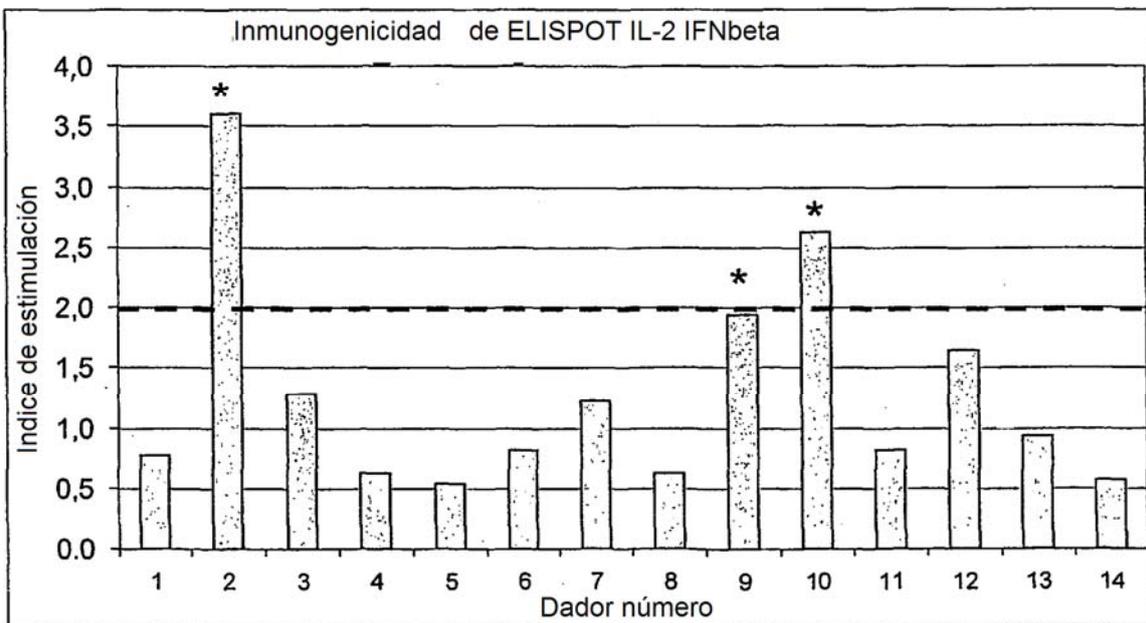
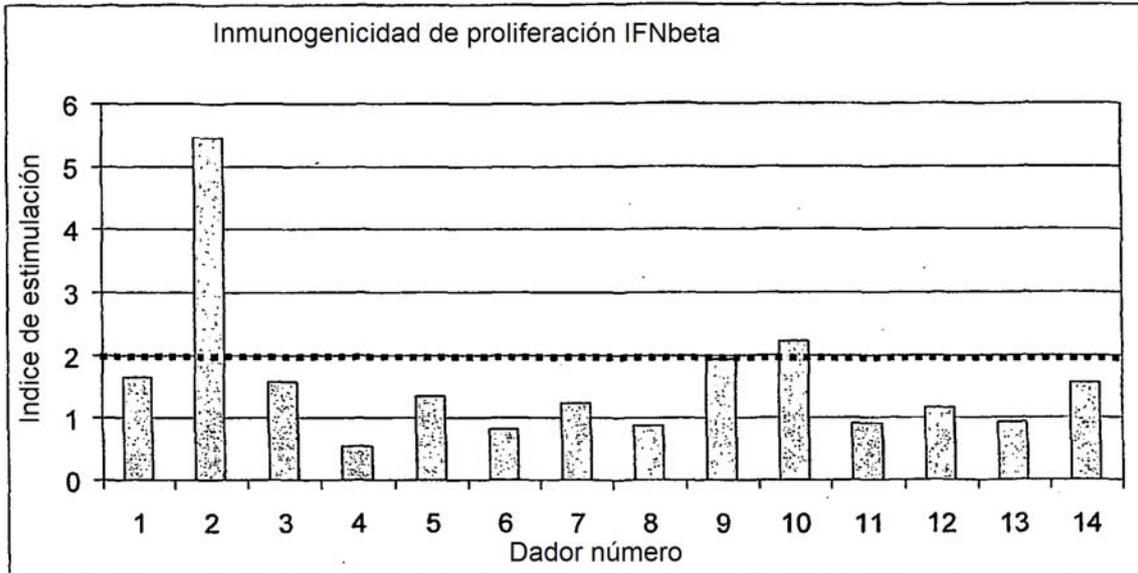


Figura 5

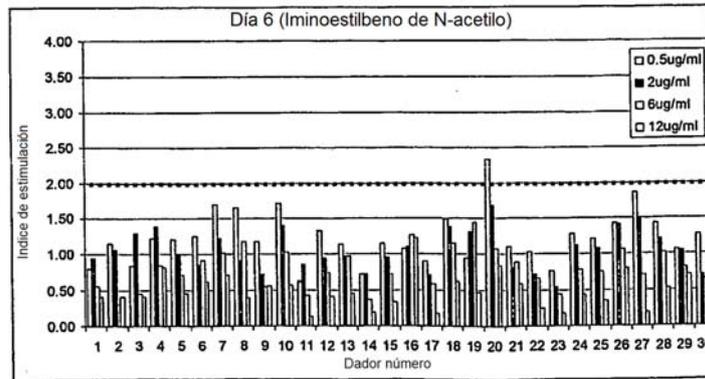
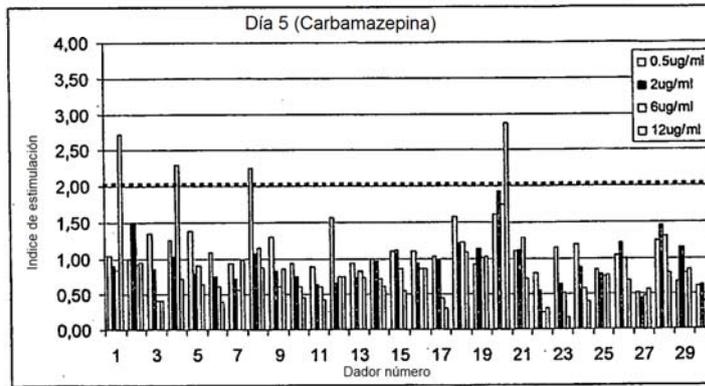
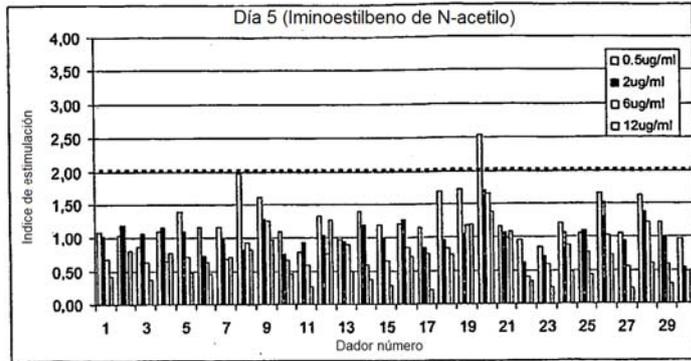


Figura 5 continuación

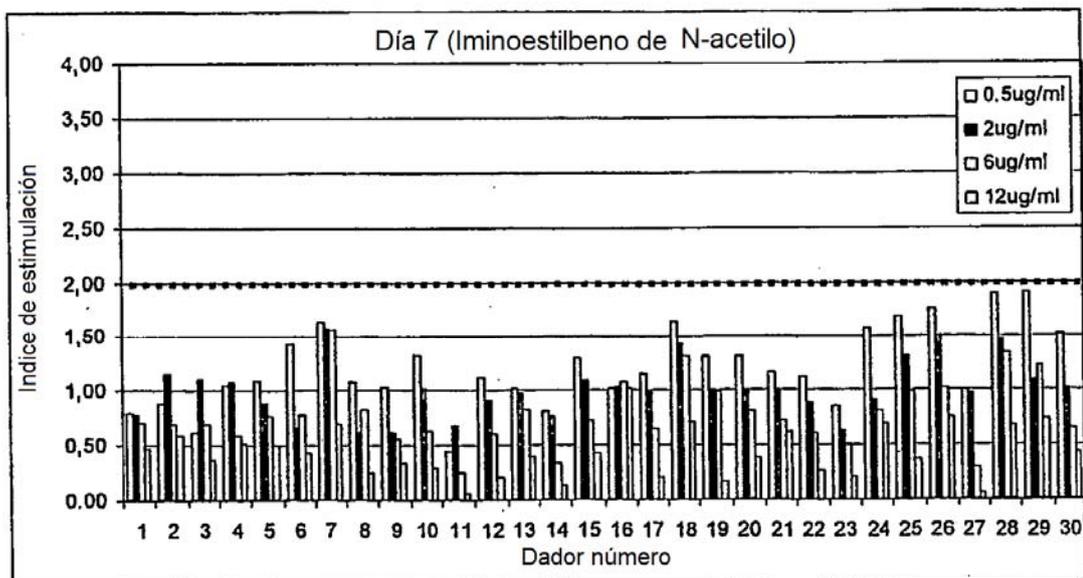
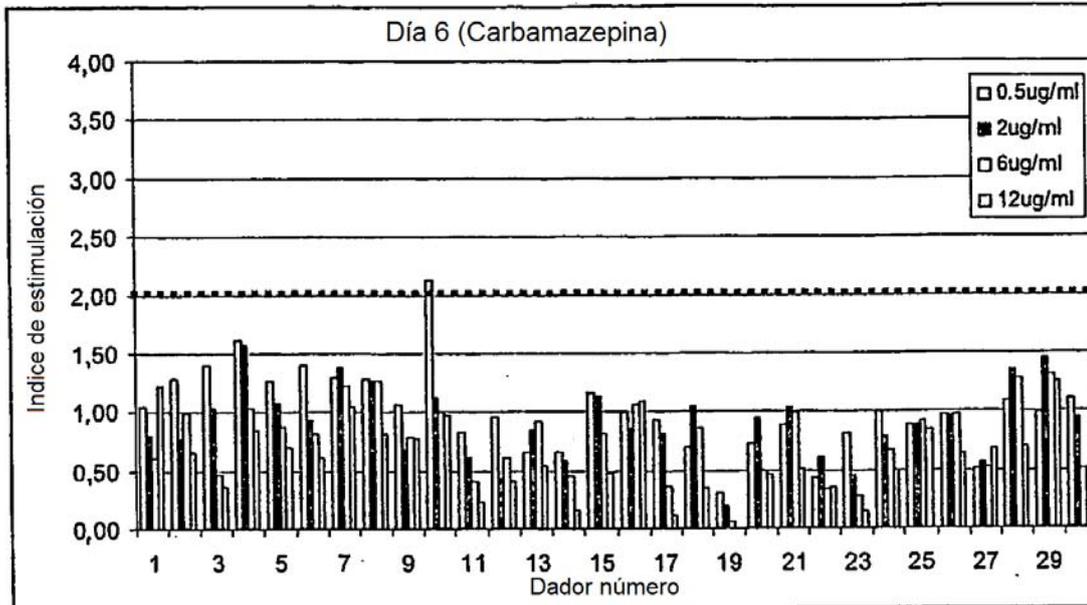


Figura 5 continuación

