

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 105**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2010** **PCT/EP2010/054826**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010** **WO10119033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2010** **E 10714449 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2419730**

54 Título: **Método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno usando células dendríticas cocultivadas aceleradas**

30 Prioridad:

14.04.2009 WO PCT/IB2009/052793

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

14.02.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MALLONE, ROBERTO y
MARTINUZZI, EMANUELA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 601 105 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno usando células dendríticas cocultivadas aceleradas

Sector de la técnica

La invención se refiere a un método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno

Estado de la técnica

El estudio de respuestas de células T específicas de antígeno (Ag) posee formidables retos técnicos [Kern, Trends Immunol. 26:477, 2005]. Esto se debe principalmente al hecho de que fracciones específicos de Ag están habitualmente representadas a muy bajas frecuencias en sangre periférica, una característica que hace su detección problemática [Mallone, Clin.Immunol. 110:232, 2004]. Esta detección es incluso más problemática cuando se consideran las células T CD4+, ya que estas fracciones están frecuentemente presentes a frecuencias incluso inferiores que sus equivalentes CD8+ [Homann, Nat.Med. 7:913, 2001; Seder, Nat.Immunol. 4:835, 2003].

Actualmente están disponibles varias estrategias de detección que permiten detectar dichas células T específicas de antígeno (CD4+ y CD8+) usando una diversidad de lecturas estructurales o funcionales [Kern, Trends Immunol. 26:477, 2005]. Sin embargo, un inconveniente compartido por todas técnicas es que las células T CD4+ específicas de antígeno raramente pueden detectarse directamente *ex vivo*. De forma más habitual, estas células tienen que expandirse de forma preliminar a través de etapas de cultivo *in vitro* de 5-14 días para alcanzar el umbral de detección [Mallone, Clin.Immunol. 110:232, 2004]. Pueden usarse varios enfoques para esta expansión *in vitro*. Como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) contienen cantidades adecuadas de células T CD4+ así como células presentadoras de antígeno (APC; monocitos, células B y fracciones mínimas de células dendríticas en circulación) (DC), pueden pulsarse con los epítomos peptídicos o Ag proteicos de interés y expandirse con o sin la adición de citoquinas coestimuladoras tales como interleuquina (IL)-2 e IL-7.

Como alternativa, primero pueden aislarse los monocitos y diferenciarse en DC inmaduras con el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) e IL-4 durante 5-7 días, a madurarse posteriormente con diferentes estímulos proinflamatorios durante 24-48 h adicionales [Zhou *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:2588, 1996]. Esta estrategia explota la mayor potencia estimuladora de la DC para conseguir una mayor expansión de células T CD4+. Aunque es atractivo, requiere, sin embargo, volúmenes más grandes de sangre de partida, ya que los monocitos representan solamente ~5-15 % de las PBMC, y deben usarse de forma ideal monocitos autólogos para evitar la selección de células T CD4+ aloespecíficas. Las células, por lo tanto, tienen que mantenerse en cultivo o congelarse mientras las DC derivadas de monocitos se están generando. Además de las mayores necesidades de PBMC, este procedimiento también es más largo que los que dependen exclusivamente de las APC naturales de la sangre.

Además, el uso de epítomos peptídicos para la estimulación de células T requiere identificación preliminar de esos epítomos abordados por la respuesta inmunitaria. Este procedimiento de identificación es muy laborioso y específico para un alelo HLA Clase I o Clase II. Por tanto, tienen que identificarse diferentes epítomos para diferentes alelos HLA, dependiendo de los sujetos humanos que se desea estudiar.

También cabe señalar que frecuentemente es de interés no solamente detectar las células T CD4+, sino también aislar y expandirlas para, el perfilado funcional adicional.

Por lo tanto, aún existe una necesidad sin cumplir en la técnica de proporcionar un método sensible, versátil y fácil de usar para medir las respuestas de células T y para aislar clones de células T, en particular células T CD4+.

Ramadan *et al.* (Cytotherapy, vol. 6, 2004, pág. 223-234), Dauer *et al.* (J Immunol. Methods, vol. 302, 2005, pág. 145-155) y Ho *et al.* (J Immunol. Methods, vol. 310, 2006, pág. 40-52), Narendran Parth *et al.* (Immunology, vol. 111, 2004, pág. 422-429), Meidenbauer *et al.* (Prostate, vol. 43, 2000, pág. 88-100) y Horiguchi Yotaka *et al.* (Clinical Cancer Res, vol. 8, 2002, pág. 3885-3892) describen, todos, la generación de DC que se generan usando solamente la fracción adherente de PBMC o DC derivadas de monocitos.

Objeto de la invención

Los inventores han descubierto que es posible estimular respuestas de células T específicas de antígeno cocultivándolas con células dendríticas en maduración directamente de sangre completa no fraccionada o muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), usando cócteles de citoquinas y condiciones de cultivo apropiadas.

Por tanto, la invención proporciona un método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno (Ag) en una muestra de sangre o muestra de PBMC no fraccionada aislada de un sujeto, que comprende las siguientes

etapas:

- a) cultivar dicha sangre o muestra de PBMC en un medio que induce diferenciación de células dendríticas (DC);
- b) madurar dichas DC;

donde se añade un Ag durante las etapas a) y/o b).

La invención también se refiere al uso de dicho método para diagnosticar una enfermedad y/o para controlar los efectos de una inmunoterapia en un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de dicho método para producir clones de células T específicas de Ag.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de dicho método para evaluar la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas y para el descubrimiento de Ag y análisis de mapeo de epítomos.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de dicho método para generar células reguladoras T específicas de Ag.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para estimular respuestas de células T específicas de Ag en una muestra de sangre o PBMC aislada de un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar dicha muestra de sangre o muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC;
- b) madurar dichas DC;

donde se añade un Ag durante las etapas a) y/o b).

En una realización, las respuestas de células T específicas de Ag son respuestas de células T CD4+.

En otra realización, las respuestas de células T específicas de Ag son respuestas de células T CD8+.

Los inventores han demostrado que muestra biológicas adecuadas para realizar el método de la invención son una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada purificada a partir de sangre completa usando protocolos convencionales de separación en gradiente de densidad. En una realización preferida, la muestra biológica de la invención es una muestra de PBMC. La expresión "PBMC" o "células mononucleares de sangre periférica" o "PBMC no fraccionadas", como se usa en este documento, se refiere a PBMC completas, es decir, a una población de glóbulos blancos que tienen un núcleo redondo, que no se ha enriquecido en una subpoblación dada. Típicamente, la muestra de PBMC no fraccionada de acuerdo con la invención no se ha sometido a una etapa de selección para que contenga solamente PBMC adherentes (que consiste esencialmente en >90 % de monocitos) o PBMC no adherentes (que contienen células T, células B, células citolíticas naturales (NK), células T NK y precursores DC). Una muestra de PBMC de acuerdo con la invención, por lo tanto, contiene linfocitos (células B, células T, células NK, células NKT), monocitos y precursores de los mismos.

Típicamente, estas células pueden extraerse de sangre completa usando ficol, un polisacárido hidrófilo que separa capas de sangre, formando las PBMC un anillo celular bajo una capa de plasma. Adicionalmente, las PBMC pueden extraerse de sangre completa usando una lisis hipotónica que lisará preferentemente los glóbulos rojos. Dichos procedimientos son conocidos para los expertos en la materia.

Como alternativa, la muestra biológica de acuerdo con la invención puede ser una muestra de sangre.

La expresión "muestra de sangre" o "muestra de sangre no fraccionada", como se usa en este documento, se refiere a una muestra de sangre cruda que se ha aislado de un sujeto y se ha recogido en tubos u otros recipientes que contienen un anticoagulante apropiado (por ejemplo, heparina de litio o citrato sódico). La muestra de sangre es sangre completa no fraccionada y contiene plasma y células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos). Puede ser una muestra de sangre recién aislada (<48 h) o una muestra de sangre que se ha obtenido previamente y se ha mantenido congelada hasta su uso.

El término "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), un felino, un canino o un primate. En una realización preferida, dicho sujeto es un sujeto humano.

El sujeto de acuerdo con la invención puede ser un sujeto sano o un sujeto que padece una enfermedad dada.

El término "antígeno" ("Ag"), como se usa en este documento, se refiere a preparaciones de proteínas, péptidos, tejido o células capaces de provocar una respuesta de células T. En una realización preferida, dicho Ag es una

proteína que puede obtenerse por tecnología de ADN recombinante o por purificación a partir de diferentes fuentes tisulares o celulares. Dichas proteínas no están limitadas a las naturales, sino que también incluyen proteínas modificadas o construcciones quiméricas, obtenidas, por ejemplo, cambiando secuencias seleccionadas de aminoácidos o fusionando partes de diferentes proteínas. En otra realización de la invención, dicho Ag es un péptido sintético, obtenido por procedimientos bioquímicos con Fmoc, síntesis de péptidos en múltiples clavijas a gran escala, tecnología de ADN recombinante u otros procedimientos adecuados.

En otra realización de la invención, el Ag es una preparación tisular o celular cruda o parcialmente purificada obtenida por diferentes procedimientos bioquímicos (por ejemplo, fijación, lisis, fraccionamiento subcelular, separación en gradiente de densidad) conocidos para los expertos en la materia.

Etapas a): cultivo de la muestra de sangre o muestra de PBMC en un medio que induce la diferenciación de DC

El método de la invención comprende la etapa de cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC. Los medios adecuados para realizar la invención son cualquier medio de cultivo adecuado para el crecimiento, supervivencia y diferenciación de PBMC. Típicamente, consiste en un medio básico que contiene nutrientes (una fuente de carbono, aminoácidos), un tampón de pH y sales, que puede suplementarse con suero de origen humano u otro origen y/o factores de crecimiento y/o antibióticos, al que se añaden los agentes que inducen diferenciación de DC.

Típicamente, el medio básico puede ser medio RPMI 1640, DMEM, IMDM, X-VIVO o AIM-V, todos los cuales son medios convencionales disponibles en el mercado.

En la realización de la invención donde se cultiva una muestra de sangre en lugar de una muestra de PBMC, el uso de dicho medio básico es dispensable, y pueden añadirse agentes de diferenciación directamente a la sangre, que sirve como medio de cultivo.

El cultivo celular puede realizarse a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, usando incubadoras de cultivo tisular adecuadas para este fin.

Dicho medio comprende factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF). Típicamente, se usa GM-CSF en una cantidad comprendida entre 1 y 10.000 U/ml preferiblemente entre 10 y 5.000 U/ml incluso más preferiblemente a aproximadamente 1.000 U/ml.

Puede obtenerse GM-CSF a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser GM-CSF purificado o recombinante. El GM-CSF está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

Dicho medio comprende adicionalmente interleuquina 4 (IL-4). Típicamente se usa IL-4 en una cantidad comprendida entre 0 y 10.000 U/ml, preferiblemente entre 10 y 1.000 U/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 500 U/ml. La IL-4 puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser IL-4 purificada o recombinante. La IL-4 está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

En una realización preferida, dicho medio comprende ligando de tirosina quinasa 3 tipo FMS (Flt-3), el ligando de Flt-3 puede usarse en solitario o en combinación con GM-CSF y/o IL-4. Típicamente, se usa ligando Flt-3 en una cantidad comprendida entre 1 y 1.000 ng/ml, preferiblemente entre 10 y 100 ng/ml.

El ligando de Flt-3 puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser ligando de Flt-3 purificado o recombinante. El ligando de Flt-3 está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

De acuerdo con la invención, la etapa de incubar la muestra de sangre o muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC se realiza durante una cantidad de tiempo suficiente para enriquecer dicha muestra de sangre o muestra de PBMC no fraccionada en DC. Para los expertos en la materia, esto puede ensayarse fácilmente examinando la expresión relativa de marcadores que se sabe que se expresan o no se expresan por DC. Por ejemplo, un enriquecimiento de la muestra de sangre o muestra de PBMC puede reflejarse por un aumento en marcadores tales como CD11c, HLA-DR, CD80 y CD86 y/o por una disminución en marcadores tales como CD14. La especificidad de expresión de estos marcadores sobre poblaciones de DC puede evaluarse limitando las células en análisis a PBMC no fraccionadas seleccionadas o subconjuntos de sangre completa, usando una diversidad de estrategias de sincronización. Por ejemplo, las DC pueden identificarse como células que no expresan marcadores típicos de otras subpoblaciones (por ejemplo, CD3, CD14, CD16, CD19, CD34; las llamadas células lin^{neg}), y que expresan HLA-DR.

En una realización preferida, dicha etapa se realiza durante una cantidad de tiempo t(a) comprendida entre t(a)_{mín.} y t(a)_{máx.}

Típicamente, la incubación mínima para la etapa a), t(a)mín. puede ser de 12 horas, preferiblemente 16 horas, incluso más preferiblemente 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, incluso más preferiblemente 24 horas.

- 5 Típicamente, la incubación máxima para la etapa a), t(a)máx. puede ser de 10 días, preferiblemente 7 días, incluso más preferiblemente 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, incluso más preferiblemente 1 día.

Los tiempos mínimos y máximos de incubación t(a)mín. y t(a)máx. descritos anteriormente pueden combinarse.

- 10 En una realización preferida, la etapa a) se realiza durante de una cantidad de tiempo t(a) comprendida entre 16 horas y 7 días, preferiblemente entre 20 horas y días.

En una realización preferida, la etapa a) se realiza durante una cantidad de tiempo t(a) de 24 horas.

- 15 De hecho, los inventores han demostrado que los protocolos convencionales para producir DC, que posteriormente son capaces de estimular respuestas de células T específicas de Ag cuando se añaden a células T aisladas, usando monocitos purificados como material de partida, pueden aplicarse a la producción de DC en cocultivo y, por tanto, al método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno de la invención. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Caux *et al.* Nature 360:258, 1992; Romani *et al.*, J Exp Med. 180: 83, 1994 y Sallusto *et al.*, J Exp Med. 179:1109, 1994. Además, los inventores han demostrado que, inesperadamente, el protocolo acelerado descrito por Dauer *et al.*, [Dauer *et al.*, J Immunol, 170:4069, 2003], también puede usarse para el método de la invención, para estimular respuestas de células T específicas de Ag, usando muestras de sangre no fraccionada o muestra de PBMC como material de partida.
- 20

25 Etapla b): maduración de las DC

De acuerdo con el método de la invención después de enriquecer la muestra de sangre o muestra de PBMC en DC durante la etapa a), dichas DC se maduran durante la etapa b).

- 30 En una realización preferida, se añaden estímulos proinflamatorios y/o agentes que imitan una agresión vírica o bacteriana al medio de la etapa a).

Ejemplos de estímulos proinflamatorios adecuados para el método de la invención son, aunque sin limitación, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-1 beta (IL-1 β), prostaglandina E2 (PGE2), anticuerpos (mAb) monoclonales anti-CD40, proteínas quiméricas recombinantes de ligando de CD40 (CD40L), interferón alfa (IFN- α), interferón gamma (IFN- γ), interleuquina-7 (IL-7). Dichos agentes pueden usarse en solitario o en diferentes combinaciones con otros estímulos proinflamatorios o agentes de imitación vírica/bacteriana. Ejemplos de agentes que imitan una agresión vírica o bacteriana adecuados para el método de la invención son, aunque sin limitación, lipopolisacáridos (LPS), oligodesoxinucleótidos CpG, ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C), Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4), imiquimod. Dichos agentes pueden usarse en solitario o en diferentes combinaciones con otros estímulos proinflamatorios o agentes de imitación vírica/bacteriana.

35

40

En una realización, la etapa b) se realiza en presencia de al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en TNF- α , IL-1 β , PGE2, anticuerpo anti-CD40, y IFN- α 2a, LPS, poli I:C, IFN- γ , IL-7 y mezclas de los mismos.

- 45 Dicho agente o agentes son agentes que se sabe que estimulan respuestas inmunitarias, y los expertos en la materia serán capaces de seleccionar las concentraciones apropiadas de cada agente para obtener la maduración de DC limitando al mismo tiempo la activación de células T no específicas.

- 50 Además, los expertos en la materia interpretarán fácilmente que también pueden usarse otros agentes que se sabe que estimulan la maduración de DC de acuerdo con el método de la invención.

En una realización preferida, la etapa b) se realiza en presencia de TNF- α , IL-1 β y PGE2.

- 55 Típicamente, se usa TNF- α en una cantidad comprendida entre 1 y 10.000 U/ml, preferiblemente entre 10 y 5.000 U/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 1.000 U/ml. Puede obtenerse TNF- α a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser TNF- α purificado o recombinante. El TNF- α está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

- 60 Típicamente, se usa IL-1 β en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml, preferiblemente entre 1 y 100 ng/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 10 ng/ml. La IL-1 β puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser IL-1 β purificada o recombinante. La IL-1 β está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

- 65 Típicamente, se usa PGE2 en una cantidad comprendida entre 0,01 y 100 μ M, preferiblemente ente 0,1 y 10 μ M, incluso más preferiblemente a aproximadamente 1 μ M. La PGE2 puede obtenerse a partir de una diversidad de

fuentes. La PGE2 está disponible en el mercado como un producto de síntesis de diferentes empresas, por ejemplo, Calbiochem/Merck o Sigma.

En otra realización, la etapa b) se realiza en presencia de anti-CD40 (por ejemplo, clon de mAb G28-5) e IFN- α .

Típicamente, se usa mAb anti-CD40 en una cantidad comprendida entre 0,1 y 50 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$, incluso más preferiblemente a aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$. En una realización preferida, el mAb anti-CD40 es el clon G28-5. Los mAb G28-5 purificados u otros mAb anti-CD40 pueden producirse de forma local a partir de sobrenadantes de cultivo de hibridoma de acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la materia, o pueden adquirirse a partir de diferentes fuentes comerciales tales como BioLegend o eBioscience.

En una realización alternativa, los mAb anti-CD40 pueden sustituirse con moléculas de ligando de CD40 recombinantes, sintetizadas en forma monomérica o multimérica. Las moléculas de ligando de CD40 recombinantes pueden producirse de forma local usando metodologías de ADN recombinante conocidas para los expertos en la materia, o pueden adquirirse a partir de diferentes fuentes comerciales tales como R&D Systems.

Típicamente, se usa IFN- α en una cantidad comprendida entre 1 y 10.000 U/ml, preferiblemente entre 10 y 5.000 U/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 1.000 U/ml. En una realización preferida, el IFN- α es IFN- α 2a. El IFN- α puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser IFN- α purificado o recombinante. El IFN- α está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, Roche (Roferon-A), R&D Systems o PeproTech.

En otra realización, la etapa b) se realiza en presencia de LPS.

Típicamente, se usa LPS en una cantidad comprendida entre 1 y 10.000 ng/ml, preferiblemente entre 10 y 1.000 ng/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 100 ng/ml. El LPS puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede purificarse a partir de diferentes cepas bacterianas. Las cepas adecuadas son, aunque sin limitación, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. typhosa*, *S. marcescens*. El LPS está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, Sigma.

En otra realización, la etapa b) se realiza en presencia de poli I:C.

Típicamente, se usa poli I:C en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$, incluso más preferiblemente a aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$. Poli I:C puede obtenerse de una diversidad de fuentes. Puede sintetizarse usando metodologías conocidas para los expertos en la materia. Poli I:C está disponible en el mercado de diferentes empresas, por ejemplo, Sigma.

En realizaciones preferidas, puede añadirse una dosis de IL-7 a los agentes de la etapa b).

Típicamente, se usa IL-7 en una cantidad comprendida entre 0,01 y 10 ng/ml, preferiblemente entre 0,1 y 1 ng/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 0,5 ng/ml. IL-7 puede obtenerse de una diversidad de fuentes. Puede ser IL-purificada o recombinante. IL-7 está disponible en el mercado a partir de diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

De acuerdo con una realización preferida del método de la invención, la etapa b) se realiza durante una cantidad de tiempo t(b) suficiente para madurar las DC. Típicamente, esta cantidad de tiempo t(b) es comprendida entre 12 y 72 horas, preferiblemente entre 16 y 48 horas, incluso más preferiblemente durante 24 horas.

En la realización alternativa, la etapa b) se realiza durante una cantidad más corta de tiempo t(b) comprendida entre 0 y 12 horas.

Antígeno

Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que la muestra de sangre o muestra de PBMC sometida al método de la invención contiene un cocultivo de DC en diversas fases de maduración (monocitos, DC inmaduras, DC maduras) y de células T, entre otras células.

Se cree que, dentro de esta población heterogénea de células, las DC recogerán el Ag y lo presentarán sobre su superficie a las células T, que de ese modo se estimularán de un modo específico de Ag.

En una realización preferida, dicho Ag es una proteína que puede obtenerse por tecnología de ADN recombinante o por purificación a partir de diferentes fuentes tisulares o celulares. Típicamente, dicha proteína tiene una longitud mayor de 10 aminoácidos, preferiblemente mayor de 15 aminoácidos, incluso más preferiblemente mayor de 20 aminoácidos sin límite superior teórico. Dichas proteínas no están limitadas a las naturales, sino que también incluyen proteínas modificadas o construcciones quiméricas, obtenidas, por ejemplo, cambiando secuencias seleccionadas de aminoácidos o fusionando partes de diferentes proteínas.

En otra realización de la invención, dicho Ag es un péptido sintético. Típicamente, dicho péptido sintético es de 3-40 aminoácidos de longitud, preferiblemente 5-30 aminoácidos de longitud, incluso más preferiblemente 8-20 aminoácidos de longitud. Los péptidos sintéticos pueden obtenerse por procedimientos bioquímicos de Fmoc, síntesis a gran escala de péptidos en múltiples clavijas, tecnología de ADN recombinante u otros procedimientos adecuados. Dichos péptidos no están limitados a los naturales, sino que también incluyen péptidos modificados o péptidos quiméricos, obtenidos, por ejemplo, cambiando secuencias seleccionadas de aminoácidos o fusionando partes de diferentes proteínas. En otra realización de la invención, el Ag es una preparación tisular o celular cruda o parcialmente purificada obtenida por diferentes procedimientos bioquímicos (por ejemplo, fijación, lisis, fraccionamiento subcelular, separación en gradiente de densidad) conocidos para los expertos en la materia.

Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar el Ag apropiado, dependiendo de la estimulación deseada de las células T.

Los expertos en la materia también sabrán la etapa en que deben introducir dicho Ag.

Típicamente, si el Ag es una proteína o una preparación tisular o celular, generalmente se añadirá durante las etapas a). Típicamente, si el Ag es un péptido, puede añadirse en la etapa b) en lugar de la etapa a). Aunque no existe un punto de corte claro de longitud de aminoácidos para predecir si un péptido dado se unirá directamente a moléculas MHC Clase II o se captará y procesará por células dendríticas para su presentación sobre moléculas MHC Clase II, pertenece a las capacidades de los expertos en la materia optimizar el tiempo de adición de péptidos de longitud intermedia para cada caso.

Detección de las células T estimuladas

Los métodos para la detección de células T estimuladas son conocidos para los expertos en la materia. Los procedimientos descritos a continuación proporcionan unos pocos ejemplos de métodos adecuados. Sin embargo, los expertos en la materia pueden interpretar fácilmente que puede usarse cualquier método adecuado para evaluar la estimulación de células T en respuesta a un Ag.

Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISpot):

Este procedimiento se describe en detalle a continuación, en el Ejemplo 1.

Se transfieren células no adherentes de pocillos de precultivo a una placa que se ha recubierto con los anticuerpos de captura anticitoquina deseados (Ab; por ejemplo, anti-IFN- γ , -IL-10, -IL-2, -IL-4). El revelado se realiza con Ab secundarios biotinilados y métodos convencionales de detección colorimétrica o fluorimétrica tales como estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT-BCIP y se cuentan las manchas. Las lecturas ELISpot después se expresan como células formadoras de manchas (SFC)/ 10^6 PBMC.

Ensayo de citoquinas en sobrenadante:

Las citoquinas liberadas en el sobrenadante de cultivo se miden por diferentes técnicas, tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), serie de perlas citométricas BD, serie Biorad Bio-Plex y otras.

Tetrámeros HLA Clase II:

Con este procedimiento, se detectan células T reactivas al Ag que reconocen epítopos peptídicos específicos, usando reactivos disponibles en el mercado (por ejemplo, ProlImmune MHC Class II Ultimers) o los generados de forma local (por ejemplo, de Dr. G.T. Nepom, Benaroya Research Institute, Seattle, EE. UU.) [Novak *et al.*, J.Clin.Invest. 104:R63, 1999].

Regulación positiva de marcadores de activación (por ejemplo, CD69, CD25, CD137):

Con este procedimiento, se detectan respuestas de células T específicas de Ag por su expresión diferencial de marcadores de activación expuestos sobre la membrana después de reconocimiento de Ag.

Ensayos de captura de citoquinas:

Este sistema desarrollado por Miltenyi Biotech es una alternativa válida al ELISpot para visualizar células T específicas de Ag de acuerdo con su respuesta de citoquinas. Además, permite la clasificación directa y clonación de las células T de interés (véase a continuación).

Ensayo de CD154:

Este procedimiento se ha descrito recientemente en detalle [Chattopadhyay *et al.*, Nat.Med. 11:1113, 2005; Frentsch *et al.*, Nat.Med. 11: 1118, 2005]. Está limitado a la detección de células T CD4+ específicas de Ag.

Ensayo de CD107:

Este procedimiento [Betts *et al.*, J.Immunol.Methods 281:65, 2003] permite la visualización de células T CD8+ específicas de Ag con potencial citotóxico.

Ensayo de dilución de CFSE:

Este procedimiento detecta células T específicas de Ag (CD4+ y CD8+) de acuerdo con su proliferación después del reconocimiento de Ag [Mannering *et al.*, J.Immunol.Methods 283:173, 2003].

Aplicaciones del método

El método para estimular respuestas de células T específicas de Ag descrito en la presente solicitud es un procedimiento rápido, eficaz, específico y versátil. Para resumir, las ventajas en comparación con las metodologías tradicionales son:

1. Mayor sensibilidad;
2. Pueden usarse PBMC no fraccionadas o incluso sangre no fraccionada, frescas o congeladas. No existe necesidad de etapas preliminares de purificación, haciendo que la técnica sea más simple y menos demandante en términos de volúmenes de sangre;
3. No se requiere expansión preliminar a largo plazo;
4. Cuando se usan Ag proteicos o Ag de preparaciones tisulares o celulares, puede detectarse el repertorio completo de células T contra esos Ag, en lugar del repertorio contra un conjunto limitado de epítomos específicos;
5. Sin limitaciones de restricción a HLA;
6. Compatible también con Ag peptídicos;
7. Compatible con diferentes lecturas de activación de células T;
8. Puede usarse la misma técnica de estimulación para expandir y posteriormente clasificar células T CD4+ específicas de Ag y para generar líneas de células T CD4+ y clones para caracterización adicional.

Por tanto, el método descrito tiene muchas aplicaciones.

La invención, por lo tanto, también se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto como se define en las reivindicaciones, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

donde se añaden uno o más Ag asociados a enfermedad durante las etapas a) y/o b).

La invención también se refiere a un método para controlar los efectos de una inmunoterapia en un sujeto que padece una enfermedad como se define en las reivindicaciones, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

donde se añaden uno o más Ag asociados a enfermedad durante las etapas a) y/o b).

De hecho, los inventores han descubierto que el método de la invención para estimular respuestas de células T específicas de Ag puede ser útil tanto para diagnosticar una enfermedad como para controlar los efectos inmunológicos de una inmunoterapia en varios entornos.

En una realización preferida, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunitarias. Este grupo comprende, aunque sin limitación, diabetes tipo 1 (T1D), granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple.

En otra realización de la invención, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad cancerosa. Este grupo comprende, aunque sin limitación, melanoma, cáncer de colon, cáncer renal y neoplasias hematológicas tales como leucemias, linfomas y mieloma múltiple.

En otra realización, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedades infecciosas. Este grupo comprende, aunque sin limitación, enfermedades causadas por agentes infecciosos tales como *M. tuberculosis*, VIH, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la gripe.

En otra realización, dicha enfermedad es una enfermedad de injerto contra hospedador, que complica el trasplante de médula ósea y procedimientos similares.

Para aplicaciones de diagnóstico, el método de la invención puede usarse para detectar una o más respuestas de células T específicas de Ag que están correlacionadas con la enfermedad, preferiblemente una enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, el método puede usarse para detectar respuestas de células T específicas de preproinsulina o ácido glutámico descarboxilasa (GAD) que están correlacionadas con diabetes tipo 1.

La expresión "control de inmunoterapia" como se usa en este documento se refiere a la medición de cambios en respuestas de células T inducidas en un sujeto dado después de administración *in vivo* de agentes inmunomoduladores.

Para aplicaciones de control, se encuentran diferentes tipos de situaciones, de acuerdo con el tipo de enfermedad.

En enfermedades autoinmunitarias, pueden usarse terapias inmunomoduladoras para entorpecer las respuestas inmunitarias patológicas. Una estrategia para conseguir ese resultado depende de intervenciones no específicas de Ag basadas en varios agentes inmunomoduladores. Por ejemplo, se han ensayado, se están ensayando o probablemente se van a ensayar agentes tales como ciclosporina A (Stiller *et al.*, Science 223:1362, 1984; Feutren *et al.*, Lancet 19:119, 1986; Bougneres *et al.*, Diabetes 39:1264, 1990), Daclizumab, micofenolato mofetilo, rapamicina, interleuquina-2, anticuerpos monoclonales anti-CD3 (Herold *et al.*, N.Engl.J.Med. 346:1692, 2002; Keymeulen *et al.*, N.Engl.J.Med. 352:2598, 2005), anticuerpos monoclonales anti-CD20 tales como Rituximab (Pescovitz *et al.*, N.Engl.J.Med. 361:2143, 2009), trasplante de células madre hematopoyéticas no mieloablativas autólogas (VOLTARELLI *et al.*, JAMA 297:1568, 2007), infusión de células sanguíneas de cordón umbilical autólogas (Haller *et al.*, Diabetes Care 32:2041, 2009), vitamina D, terapias adaptativas de células reguladoras T, para la prevención y/o intervención de T1D. Un segundo enfoque depende de estrategias específicas de Ag, es decir, la administración de un Ag relacionado con la enfermedad en una forma tolerogénica. Por ejemplo, se han ensayado, se están ensayando, o probablemente se van a ensayar agentes tales como (pro)insulina (DPT-1, N.Engl.J.Med. 346:1685, 2002; Skyler *et al.*, Diabetes Care 28:1068, 2005; Nanto-Salonen *et al.*, Lancet 372:1746, 2008), GAD (Ludvigsson *et al.*, N.Engl.J.Med. 359:1909, 2008), NBI-6024 (Alleva *et al.*, Scand.J.Immunol. 63:59, 2006), DiaPep277 (Raz *et al.*, DiabetesMetab.Res.Rev. 23:292, 2007) y combinaciones de los mismos, anti-CD3 en combinación con Ag de células β (Bresson *et al.*, J.Clin.Invest. 116:1371, 2006), carga de Ag en DC *in vitro* o *in vivo* (Mukhopadhyaya *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:6374, 2008), multímeros epítipo-HLA (Casares *et al.*, Nat.Immunol. 3:383, 2002; Masteller *et al.*, J.Immunol. 171:5587, 2003; Mallone *et al.*, Blood 106:2798, 2005), para la prevención y/o intervención de T1D.

En enfermedades cancerosas e infecciosas, la patogénesis no está dirigida por respuestas inmunitarias patológicas, sino en su lugar por células tisulares o agentes infecciosos que escapan del control del sistema inmunitario. Las respuestas inmunitarias contra el cáncer o células infectadas/agentes infecciosos son, por lo tanto, adaptaciones fisiológicas que intentan contrarrestar la enfermedad. Estos mecanismos fisiológicos pueden reforzarse terapéuticamente, usando estrategias no específicas de Ag (por ejemplo, bloqueo de antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos, en solitario o en combinación con diversos agentes, en melanoma; Yuan *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 105:20410, 2008; Maker *et al.*, Ann.Surg.Oncol. 12:1005, 2005) o enfoques específicos de Ag, es decir, administración (llamada vacunación) de Ag relacionados con la enfermedad en una forma inmunogénica. Estos últimos enfoques pueden perseguir administrando el Ag en solitario o en combinación con diferentes agentes adyuvantes (por ejemplo, administración de Ag asociado a tumor en melanoma; Di Pucchio *et al.*, Cancer Res. 66:4943, 2006; Peterson *et al.*, J.Clin.Oncol. 21:2342, 2003); administrando DC pulsadas con el Ag (por ejemplo, infusión de DC pulsadas con Ag asociado a tumor en melanoma; Palucka *et al.*, J.Immunother. 26:432, 2003; Banichereau *et al.*, Cancer Res. 61:6451, 2001; Thurner *et al.*, J.Exp.Med. 190:1669, 1999) o por transferencia adoptiva de células T específicas de Ag asociado a enfermedad (por ejemplo, infusión de células T específicas de Ag asociado a tumor en melanoma; Vignard *et al.*, J. Immunol. 175:4797, 2005).

Por lo tanto, es de interés terapéutico seguir los cambios inmunitarios inducidos por dicha intervención. Las intervenciones satisfactorias deben traducirse en una disminución (en el caso de enfermedades autoinmunitarias) o aumento (en el caso de enfermedades cancerosas e infecciosas) de las respuestas de células T específicas de Ag relacionado con enfermedad. Dichos cambios en las respuestas de células T específicas de Ag relacionado con enfermedad podrían ser cuantitativos (por ejemplo, cambio en la frecuencia de células T específicas de Ag) o cualitativos (por ejemplo, cambio en el fenotipo y/o función de dichas células T). La disponibilidad de estos marcadores sustitutos inmunitarios de eficacia clínica puede ser de gran utilidad para una diversidad de aplicaciones. Por ejemplo: mejor selección de pacientes a tratar y agentes terapéuticos a usar basándose en las respuestas inmunitarias del paciente (por ejemplo, administración de GAD en pacientes que presentan respuestas de células T específicas de GAD); optimización y/o adaptación de dosis terapéuticas o regímenes de administración (por ejemplo, aumento en dosis/frecuencia de administración si no se registra cambio inmunitario), mejorando por tanto la relación de riesgo a beneficio; estratificación del pronóstico de pacientes tratados de acuerdo con su probabilidad de responder al tratamiento; decisión de si tratar los pacientes de nuevo basándose en el mantenimiento o no de los cambios inmunitarios inducidos.

El método de estimulación de respuestas de células T específicas de Ag de la invención puede, por lo tanto, ser muy útil para controlar la inducción de estos cambios inmunitarios.

La etapa c) de detectar respuestas de células T puede realizarse como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, midiendo la cantidad de una citoquina dada que se secreta.

En una realización preferida, la etapa c) de detectar respuestas de células T se realiza por ELISpot.

La expresión "antígenos (Ag) asociados a enfermedad", como se usa en este documento, se refiere a proteínas o péptidos que constituyen las dianas moleculares de una respuesta inmunitaria. Dichas dianas moleculares se expresan por el tejido o tejidos o célula o células abordadas por la respuesta inmunitaria. La expresión de Ag asociados a enfermedad puede limitarse al tejido diana o ampliarse hasta compartimentos corporales adicionales. Los Ag asociados a enfermedad pueden identificarse inicialmente como dianas de autoanticuerpos o respuestas inmunitarias de células T, o se pueden basar en su expresión selectiva por el tejido diana. Algunos ejemplos de antígenos proteicos asociados a enfermedad son preproinsulina (PP), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), proteína 2 asociada a insulinoma (IA-2), proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP) y transportador 8 de zinc (ZnT8) para T1D; mieloperoxidasa y proteinasa 3 para granulomatosis de Wegener; glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y proteína básica de mielina (MBP) en esclerosis múltiple; gliadinas en enfermedad celíaca; tirosinasa, melan-A, MART-1, gp100 y NY-ESO-1 en cáncer de melanoma; ESAT-6 para infección por *M. tuberculosis*; y gag para infección por VIH.

Ejemplos de Ag peptídicos asociados a enfermedad se obtienen de dichos Ag proteicos anteriores después de procesamiento por células presentadoras de Ag - incluyendo DC - y presentación en el contexto de diferentes moléculas HLA Clase I o Clase II. Por lo tanto, dichos Ag peptídicos son diferentes dependiendo no solamente de su Ag fuente, sino también de las moléculas HLA por las cuales se presentan. Por ejemplo, puede encontrarse una lista de Ag peptídicos asociados a T1D tanto para ratón como para ser humano en DiLorenzo *et al.*, Clin.Exp.Immunol. 148:1, 2007.

La expresión "antígenos asociados a enfermedad" también se refiere a tejidos o células que constituyen las dianas de una respuesta inmunitaria. Los tejidos/células asociados a enfermedad pueden identificarse como dianas de la enfermedad basándose en la fisiopatología y presentación clínica de dicha enfermedad. Algunos ejemplos de tejidos/células asociados a enfermedad son células beta pancreáticas productoras de insulina para T1D; oligodendrocitos en esclerosis múltiple; epitelios intestinales en enfermedad celíaca; melanocitos malignos en cáncer de melanoma; *M. Tuberculosis* para infección de tuberculosis; y VIH para infección por VIH.

La respuesta inmunitaria montada contra Ag asociados a enfermedad puede ser una patológica (es decir, en el caso de enfermedades autoinmunitarias) o una fisiológica, potencialmente una beneficiosa dirigida a limitar las consecuencias de otro proceso patológico en curso (es decir, en el caso de cáncer o enfermedades infecciosas). En virtud de las respuestas inmunitarias patológicas o fisiológicas subyacentes a dichas enfermedades, la detección de dichas respuestas puede usarse para diagnosticar estas enfermedades, o para hacer un seguimiento de su evolución natural o terapéuticamente modificada. Midiendo las respuestas de células T específicas de Ag asociado a enfermedad, el método descrito en este documento puede aplicarse, por lo tanto, tanto al diagnóstico como al control inmunitario (por ejemplo, estadificación inmunitaria, seguimiento terapéutico) de dichas enfermedades.

Los expertos en la materia sabrán el modo de seleccionar Ag asociados a enfermedad apropiados. Dicha selección se basa en una amplia serie de estrategias. Ejemplos de dichas estrategias para Ag asociados a T1D pueden encontrarse en Wenzlau *et al.* Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2007; Peakman *et al.*, J.Clin.Invest. 1999; Nepom *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2001; Arif *et al.*, J.Clin.Invest. 2004; Toma *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2005; Blancou *et al.*, J.Immunol. 2007; Skowera *et al.*, J.Clin.Invest. 2009. Revisiones de dichas estrategias para epítomos peptídicos asociados a T1D pueden encontrarse en Di Lorenzo *et al.*, Clin.Exp.Immunol. 148:1, 2007 y en Martinuzzi *et al.*, Ann.N.Y.Acad.Sci. 1150:61, 2008.

Otra aplicación del método de la invención se refiere a su uso para el estudio *in vitro* de la inmunogenicidad (o tolerogenicidad) de proteínas terapéuticas.

La expresión "proteínas terapéuticas", como se usa en este documento, se refiere a compuestos proteicos o peptídicos de cualquier longitud de aminoácidos que se administran o están programados para administrarse *in vivo* a sujetos humanos para conseguir un efecto terapéutico. Ejemplos de dichas proteínas terapéuticas son, aunque sin limitación, Ag asociados a enfermedad (como se ha definido anteriormente), anticuerpos de diferentes especies (en su forma nativa o parcial/completamente humanizados), citoquinas, hormonas o análogos hormonales, factores de coagulación, enzimas, proteínas bacterianas o víricas. Dichas proteínas no se limitan a las naturales, sino que también incluyen proteínas modificadas o construcciones quiméricas, obtenidas, por ejemplo, cambiando secuencias seleccionadas de aminoácidos o fusionando partes de diferentes proteínas. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, existen dos entornos terapéuticos diferentes donde la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas es de relevancia.

Un primer entorno terapéutico se refiere al uso de Ag asociados a enfermedad (como se ha definido anteriormente) para administración *in vivo*, con el objetivo de inducir un efecto tolerogénico (por ejemplo, en el caso de enfermedades autoinmunitarias) o un efecto inmunogénico (por ejemplo, en el caso de cáncer o enfermedades infecciosas). Es importante evaluar primero *in vitro* el potencial de conseguir dicho efecto terapéutico deseado.

En otros entornos terapéuticos, el objetivo no es inducir respuestas inmunogénicas de algún tipo contra la proteína administrada, sino en su lugar evitar dichas respuestas de modo que se permita que dicha proteína consiga el efecto terapéutico para el cual está diseñada. Ejemplos de dichos entornos incluyen, aunque sin limitación, inmunoterapias basadas en citoquinas, terapias de remplazo de hormonas y terapias de remplazo para factores de coagulación (por ejemplo, factor VIII en hemofilia A) o déficits enzimáticos (por ejemplo, beta-glucuronidasa en mucopolisacaridosis VII). En todas estas situaciones, no es deseable que se monten respuestas inmunogénicas contra la proteína administrada, ya que esto sería contraproducente para conseguir el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, efectos secundarios tales como síndromes de liberación de citoquinas; o neutralización/degradación de la proteína terapéutica).

La invención, por lo tanto, también se refiere a un método para evaluar la inmunogenicidad de una proteína terapéutica como se define en las reivindicaciones, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

donde dicha proteína terapéutica se añade durante las etapas a) y/o b).

Otra aplicación del método de la invención es su uso para descubrimiento de Ag o epítopos (también conocido como "mapeado"), es decir, para explorar Ag y epítopos para seleccionar aquellos que provocan una respuesta de células T específicas de Ag.

El término "epítipo" como se usa en este documento, se refiere a la parte de un Ag proteico reconocido por una célula T. Los epítopos son péptidos de diferente longitud de aminoácidos que pueden unirse a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) Clase I o Clase II. El complejo péptido-MHC así formado puede reconocerse por el receptor de células T (TCR) expresado en células T, conduciendo por tanto a activación de células T y montaje de respuestas de células T específicas de Ag epitópico.

Como los Ag y epítopos son las dianas moleculares definidas de las células T, a menudo es relevante identificar de forma precisa dichas dianas para diseñar proteínas o péptidos apropiados a usarse para aplicaciones *in vitro* (por ejemplo, detección de respuestas de células T específicas de Ag para propósitos de diagnóstico, pronóstico o terapéuticos) o para administración *in vivo* (por ejemplo, terapias tolerogénicas basadas en Ag o epítopos en enfermedades autoinmunitarias; o vacunaciones basadas en Ag o epítopos en cáncer y enfermedades infecciosas). Además, la definición de normas comunes que gobiernan la unión de epítopos a una molécula MHC dada (por ejemplo, HLA-A2, A*0201; o HLA-DR4, DR*0401) y/o la activación de la señalización TCR y la activación de células T a menudo se persigue con el objetivo de desarrollar algoritmos informáticos capaces de predecir el comportamiento de un epítipo dado. El desarrollo de dichos algoritmos frecuentemente requiere la disponibilidad de grandes conjuntos de datos experimentales.

La invención, por lo tanto, también se refiere a un método para explorar Ag y epítopos candidatos como se define en las reivindicaciones, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

donde se añade un Ag o epítipo candidato durante las etapas a) y/o b).

Dicho Ag candidato también puede ser un tejido o tejidos o una célula o células abordadas por una respuesta inmunitaria o cualquier tipo de célula recubierta, cargada o forzada a expresar Ag o epítopos candidatos por técnicas bioquímicas o de biología molecular conocidas para los expertos en la materia.

Otra aplicación más del método de la invención se refiere a su uso para producir clones de células T.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para producir clones de células T que presentan propiedades inmunológicas específicas a partir de un sujeto como se define en las reivindicaciones, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC;
- b) madurar dichas DC;
- c) aislar al menos una célula T que presente dichas propiedades inmunológicas específicas;

5 donde se añade un Ag durante las etapas a) y/o b).

10 Dichas propiedades inmunológicas específicas incluyen reconocimiento por las células T aisladas del Ag añadido durante la etapa a) y/o b). Dichas propiedades inmunológicas específicas también pueden incluir la producción de IFN- γ o la capacidad de ejercer efectos citotóxicos sobre células que presentan el Ag reconocido. Los clones de células T que producen IFN- γ o presentan citotoxicidad pueden ser útiles, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.

15 Otra posible propiedad inmunológica específica puede ser la producción de IL-10. Los clones de células T que producen IL-10 pueden usarse como células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

20 Los expertos en la materia están familiarizados con los métodos para expandir dichas células T específicas de Ag una vez aisladas de una muestra de sangre o de una muestra de PBMC. Ejemplos de dichos métodos, también conocidos como métodos de clonación de células T, pueden encontrarse en Reijonen et al., Diabetes 51:1375, 2002; Mallone et al., Blood 106:2798, 2005; Mannering et al., J.Immunol.Methods 298:83, 2005; Yee et al., J.Immunol. 162:2227, 1999; Mandruzzato et al., J.Immunol. 169:4017, 2002; Oelke et al., Nat.Med. 9:619, 2003; Skowera et al., J.Clin.Invest. 118:3390, 2009.

25 Los expertos en la materia también están familiarizados con métodos adecuados para aislar dichas células T específicas de Ag en un estado viable basándose en diferentes propiedades inmunológicas. Por ejemplo, la selección de células T productoras de IFN- γ o IL-10 puede obtenerse por ensayos de captura de citoquinas de Miltenyi. Como otro ejemplo, la selección de células T citotóxicas puede obtenerse basándose en la regulación positiva de CD107 [Betts et al., J.Immunol.Methods 281:65, 2003].

30 Otra aplicación más del método de la invención se refiere a su uso para generar células reguladoras T específicas de Ag.

35 La expresión "célula reguladora T" como se usa en este documento se refiere a la subpoblación especializada de células T que actúa controlando y suprimiendo la activación del sistema inmunitario y manteniendo de ese modo la homeostasis del sistema inmunitario y la tolerancia a auto-Ag. Dichas células T reguladoras que reconocen Ag relacionados con enfermedad pueden usarse terapéuticamente para restaurar la tolerancia inmunitaria en situaciones patológicas tales como enfermedades autoinmunitarias y de injerto contra hospedador. Se han descrito métodos eficaces para generar altas cantidades de células reguladoras T policlonales (es decir, que reconocen grandes cantidades de Ag indefinidos) [Putnam et al., Diabetes 58:652, 2009]. No obstante, la generación de altas

40 cantidades de células reguladoras T específicas para un Ag dado aún tiene que conseguirse. El método descrito en este documento puede demostrar utilidad para este fin.

45 Por consiguiente, la invención se refiere a un método para generar células reguladoras T específicas de Ag que presentan propiedades inmunológicas específicas a partir de un sujeto como se define en las reivindicaciones, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC con propiedades tolerogénicas;
- b) madurar dichas DC;
- c) aislar al menos una célula T que presenta dichas propiedades inmunológicas específicas;

50 donde se añade un Ag durante las etapas a) y/o b).

55 Dichas propiedades inmunológicas específicas incluyen reconocimiento por las células T aisladas del Ag añadido durante la etapa a) y/o b). Dichas propiedades inmunológicas específicas también pueden incluir: la capacidad de suprimir la proliferación, secreción de citoquinas, citotoxicidad y otras funciones efectoras de las células T puestas en contacto físico y en proximidad especial con dichas células reguladoras T, o puestas en contacto con sobrenadantes de cultivos de células reguladoras T; la capacidad de producir citoquinas reguladoras tales como IL-10, miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β , IL-35, en solitario o en combinación con citoquinas no reguladoras tales como IFN- γ ; la capacidad de proliferar solamente en presencia de IL-2; la capacidad de expresar marcadores típicos de poblaciones de células reguladoras T. Dichos marcadores incluyen CD25, CD127, receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR), caja forkhead P3 (FoxP3), HLA-DR, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD45RA, co-estimulador de células T inducible (ICOS).

65 Los expertos en la materia están familiarizados con los métodos para expandir dichas células reguladoras T una vez aisladas de una muestra de sangre o de una muestra de PBMC no fraccionada. Pueden encontrarse ejemplos de

dichos métodos en Putnam et al., Diabetes 58:652, 2009 y en Miyara et al., Immunity 30:899, 2009.

Los expertos en la materia también están familiarizados con métodos adecuados para aislar dichas células reguladoras T en un estado viable basándose en diferentes propiedades inmunológicas. Por ejemplo, la selección de células reguladoras T productoras de IL-10 puede obtenerse por ensayos de captura de citoquinas de Miltenyi. Como otro ejemplo, la selección de células reguladoras T CD-127 negativas CD25^{alto} puede obtenerse basándose en tinción de superficie celular [Liu et al., J. Exp. Med. 203:1701, 2006, Seddiki et al., J. Exp. Med. 203:1693, 2006, Putnam et al., Diabetes 58:652, 2009 y en Miyara et al., Immunity 30:899, 2009].

La expresión "DC con propiedades tolerogénicas" como se usa en este documento se refiere a DC capaces de dar lugar a células reguladoras T. dichas DC con propiedades tolerogénicas pueden obtenerse añadiendo citoquinas que poseen propiedades reguladoras a los protocolos de cultivo descritos previamente.

En una realización preferida, dicha citoquina reguladora es IL-10. Típicamente, se usa IL-10 en una cantidad comprendida entre 1 y 1000 ng/ml, preferiblemente entre 10 y 100 ng/ml. La IL-10 puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser IL-10 purificada o recombinante. La IL-10 está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

En otra realización preferida, dicha citoquina reguladora es un miembro de la familia de TGF- β tal como TGF- β 1. Típicamente, se usa TGF- β 1 en una cantidad comprendida entre 1 y 1000 ng/ml, preferiblemente entre 1 y 100 ng/ml, incluso más preferiblemente entre 1 y 10 ng/ml. El TGF- β 1 puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Puede ser TGF- β 1 purificado o recombinante. El TGF- β 1 está disponible en el mercado en diferentes empresas, por ejemplo, R&D Systems o PeproTech.

En otras realizaciones más, dichas citoquinas reguladoras son otras citoquinas que se sabe que ejercen una actividad reguladora o cualquier combinación de IL-10, un miembro de la familia de TGF- β y/u otras citoquinas reguladoras. Ejemplos de otras citoquinas con actividad reguladora incluyen, aunque sin limitación, IL-5, IL-13 e IL35.

En una realización preferida, la etapa a) se realiza durante una cantidad de tiempo t(a) comprendida entre t(a)_{mín.} y t(a)_{máx.}

Típicamente, la incubación mínima para la etapa a), t(a)_{mín.}, puede ser de 12 horas, preferiblemente 16 horas, incluso más preferiblemente 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, incluso más preferiblemente de aproximadamente 24 horas.

Típicamente, la incubación máxima para la etapa a), t(a)_{máx.}, puede ser de 10 días, preferiblemente 7 días, incluso más preferiblemente de 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, incluso más preferiblemente de 1 día.

Los tiempos mínimos y máximos de incubación t(a)_{mín.} y t(a)_{máx.} descritos anteriormente pueden combinarse.

En una realización preferida, la etapa a) se realiza durante una cantidad de tiempo t(a) comprendida entre 16 horas y 7 días, preferiblemente entre 20 horas y 4 días.

En una realización preferida, la etapa a) se realiza durante una cantidad de tiempo t(a) de 24 horas.

La invención se describirá adicionalmente por los siguientes ejemplos.

Descripción de las figuras

Figura 1. Las PBMC humanas no fraccionadas dan lugar a acDC que estimulan células T. (a) Comparación de respuestas ELISpot de IFN- γ contra TTX o Ag de control obtenido madurando acDC con estímulos diferentes, como se indica (véase Métodos y la Figura 1 complementaria para los detalles). La línea de puntos marca la señal de IFN- γ obtenida en ausencia de citoquinas. * $p < 0,03$ y ** $p < 0,001$ para comparación con condiciones "sin citoquina" en ausencia de aumento de fondo significativo. (b-d) Comparación de protocolos de maduración de acDC seleccionados anteriormente para la detección de respuestas ELISpot de IFN- γ (b), IL-10 (c) e IL-4 (d) contra TTX, KLH y Ag de control. Las líneas de puntos indican las señales de citoquinas específicas de TTX obtenidas en ausencia de citoquinas. * $p < 0,04$ para comparación con condiciones "sin citoquinas" en ausencia de aumento de fondo significativo. En todos los paneles, se muestra un representante de al menos tres experimentos.

Figura 2. Comparación entre acDC y moDC y reproducibilidad de ensayos ELISpot de IFN- γ amplificados con acDC. (a) Comparación de fenotipos entre acDC (superior) y moDC (inferior). Se obtuvieron acDC cultivando PBMC no fraccionadas durante 48 horas con GM-CSF/IL-4 en solitario (perfiles azules) o en combinación con TNF- γ /PGE₂/IL-1 β (añadidos durante las últimas 24 horas; perfiles rojos). Se generaron moDC cultivando monocitos purificados durante 7 días con los mismos cócteles de citoquinas (TNF- γ /PGE₂/IL-1 β añadidos durante las últimas 24 horas). Se muestran comparaciones con tinción de control de isotipo (perfil

sombreado) y con cultivos en ausencia de citoquinas (perfiles de puntos). Se obtuvieron resultados similares madurando las acDC y moDC con anti-CD40/IFN- α (no mostrado). **(b)** Potencia estimuladora en ensayos ELISpot de IFN- γ de acDC y moDC maduras con TNF- α /PGE₂/IL-1 β o dejadas inmaduras. Para acDC, se cultivaron PBMC completas (1×10^6 /pocillo) como anteriormente en presencia o ausencia de PPD de *M. tuberculosis* durante 48 horas. Se aislaron monocitos autólogos por adherencia de PBMC (1×10^6 /pocillo) y se estimularon como anteriormente durante 7 días para obtener moDC. Después se añadieron PBMC autólogas frescas (1×10^6 /pocillo) a las moDC con o sin PPD durante 48 horas. Posteriormente se recuperaron las células no adherentes y se sometieron a ELISpot de IFN- γ . **(c)** Variabilidad entre ensayos analíticos de ELISpot de IFN- γ con acDC. Se descongelaron 3 alícuotas de PBMC congeladas de la misma extracción de sangre y se ensayaron como se describe. Coeficiente de variación (CV)=9,6 %. Se indican aquí los recuentos de manchas de IFN- γ basales ("sin Ag") e inducidas por TTX junto con las respuestas TTX netas (con el basal sustraído) y en posteriores paneles d, e (cultivos de acDC madurados con anti-CD40/IFN- α). **(d)** Variabilidad entre ensayos pre-analíticos y analíticos de ELISpot de IFN- γ con acDC. Se obtuvieron PBMC del mismo individuo en 4 ocasiones diferentes y se ensayaron como se describe. CV=5,4 %. **(e)** Variabilidad entre muestras frescas y crioconservadas. Las PBMC de una única extracción de sangre se ensayaron frescas o congeladas y posteriormente se ensayaron tras descongelarse. CV=6,9 %. Todos los paneles son representativos de experimentos realizados por triplicado.

Figura 3. Las células T específicas de Ag expandidas en acDC pueden aislarse y clonarse. **(a)** Esquema del ELISpot con acDC y procedimiento de generación de clones de células T. se indujeron acDC añadiendo GM-CSF e IL-4 junto con Ag proteico a PBMC marcadas con CFSE en el día 0, seguido en el día 1 por TNF- α /PGE₂/IL-1 β . En el día 2, se transfirieron las células no adherentes a pocillos de ELISpot durante 6 horas y posteriormente se recubrieron y pusieron de vuelta en cultivo. Se cuantificaron respuestas específicas de Ag por ELISpot. En el día 8-10, la fracción correspondiente de células en proliferación (CFSE^{bajo}) se clasificó en células individuales, se expandió a través de 3 ciclos de estimulación y se ensayó para la especificidad de Ag en el día 28. **(b)** ELISpot de IFN- γ con acDC representativo después de estimulación con TTX o control. **(c)** Proliferación con CFSE de PBMC recuperadas de pocillos ELISpot. Se muestra una comparación de la expansión convencional frente a la dirigida por acDC. **(d)** La fracción CFSE^{bajo} específica de TTX se clasificó y clonó. Se muestra un ensayo de recuerdo de uno de estos clones sobre DC pulsadas con TTX y control por tinción de IFN- γ intracelular.

Figura 4. Ag proteicos/peptídicos y diferentes periodos de estimulación desencadenan diferentes respuestas de células T. **(a)** Se realizaron ensayos ELISpot de IFN- γ dirigidos por acDC y moDC como en la Fig. 1b sobre PBMC con reducción magnética de CD4 o son reducción estimuladas con una vacuna hexavalente (Hexa). **(b)** ELISpot de IFN- γ realizado sobre PBMC cultivadas con o sin el cóctel de acDC. Las PBMC de un sujeto HLA-A2* (A*0201)-DR4+ (DR*0401) se estimularon con el péptido Flu MP₅₈₋₆₆ restringido a HLA-A2, péptido Flu HA₃₀₆₋₃₁₈ restringido a DR4 o TTX, como se indica. Los péptidos se añadieron después de las primeras 24 horas de cultivo, mientras se introdujo TTX *ab initio*. **(c)** Respuestas ELISpot de IFN- γ específicas de TTX en estimulaciones de acDC realizadas sobre PBMC con reducción magnética de células CD45RA+ o CD45RO+ o dejadas sin reducir. Los resultados se expresan como respuestas relativas de IFN- γ normalizadas a las PBMC no reducidas. **(d)** Respuestas ELISpot de IFN- γ e IL-10 contra TTX y KLH sobre PBMC estimuladas con acDC marcadas con CFSE. **(e)** Se recuperaron PBMC marcadas con CFSE de los pocillos de ensayo del panel **(d)** y se cultivaron durante 10 días adicionales en ausencia de estímulos adicionales y citoquinas. Se muestra la proliferación en CFSE de células T CD4+ y CD8+ contra diferentes Ag. Se realizaron estimulaciones en los paneles **(a-e)** madurando las acDC con TNF- α /PGE₂/IL-1 β y son representativas de tres experimentos independientes (excepto para el panel **c**, donde se muestra la media $\pm$ ETM de tres experimentos diferentes).

Figura 5. La secreción de IFN- γ específica de antígeno y regulación positiva de CD137 se amplifican por acDC en PBMC y sangre completa. **(a)** Ensayo de captura de IFN- γ realizado sobre PBMC en ausencia (fila superior) o presencia (fila inferior) de acDC. Después de 48 horas de incubación, se capturó IFN- γ secretado sobre la superficie de células no adherentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los números porcentuales indican la fracción IFN- γ +CD4+ (izquierda) o IFN- γ +CD8 (derecha) entre las PBMC. **(b)** Ensayos de regulación positiva de CD137 realizados sobre PBMC purificadas con (fila inferior) o sin (fila superior) amplificación por acDC durante un cultivo de 48 horas, como anteriormente. **(c)** Se estimuló la sangre completa de la misma extracción en paralelo añadiendo Ag con (inferior) o sin (superior) acDC. Al final del cultivo de 48 horas, se lisaron los glóbulos rojos y se analizaron las muestras como para el panel **(b)**. Aquí los diagramas de puntos se sincronizaron sobre células T CD4+ (izquierda) o CD8+ (derecha) para permitir la comparación entre las PBMC y la sangre completa. Los números porcentuales, por lo tanto, indican la fracción CD137+ entre células T CD4+ o CD8+. Los resultados se refieren a experimentos representativos realizados por triplicado usando el cóctel de maduración anti-CD40/IFN- α .

Figura 6. Las acDC amplifican la secreción de citoquinas en sangre completa. **(a)** Se cultivó sangre completa (250 ml) durante 48 horas con o sin TTX en presencia (círculos) o ausencia (cuadrados) de acDC (incluyendo antiCD40/IFN- α para la maduración). Se recuperaron los sobrenadantes de plasma y se midieron las citoquinas por ensayo Luminex de perlas. Se muestran solamente las citoquinas que muestran secreción específica de Ag significativa. Los resultados se expresan como concentraciones netas de citoquinas estimuladas por TTX (símbolos rellenos) después de sustraer los valores basales (representados por símbolos abiertos). **(b)** Comparación de la secreción de citoquinas de PBMC (símbolos rellenos) y sangre completa (símbolos abiertos) después de estimulación con acDC en dos sujetos diferentes (símbolos de círculo y rombo, respectivamente). Los resultados se expresan como concentraciones netas de citoquinas estimuladas por TTX

después de sustraer los valores basales. Se representan experimentos representativos en ambos paneles de 10 o más realizados.

Figura 7. Esquema de ensayos basados en acDC. Se incubaron PBMC no fraccionadas (frescas o congeladas) o sangre completa heparinizada no diluida con GM-CSF e IL-4 durante 24 horas en presencia de Ag proteicos. Posteriormente se añadieron estímulos de maduración durante otras 24 horas, después de los cual pueden medirse respuestas de células T amplificadas mediante una diversidad de lecturas. El panel gris superior enumera las lecturas de células T ensayadas con PBMC; el panel gris inferior muestra las lecturas obtenidas con sangre completa. La técnica de amplificación de acDC también es compatible con Ag peptídicos, que se añaden a las 24 horas junto con estímulos de maduración.

Figura 8. Amplificación con acDC de respuestas ELISpot de IFN- γ en ratones inmunizados con KLH. Se inmunizaron s.c. ratones Balb/c con KLH o adyuvante en solitario ($n=3$ /cada uno) y sus células mononucleares sanguíneas (1×10^6) se sometieron a recuerdo *in vitro* con KLH o Ag de control usando el cóctel de acDC (maduración de LPS) o sin citoquinas. * $p<0,001$; n.s., no significativo. Los resultados se refieren a un experimento representativo realizado por triplicado.

Figura 9. Expansión dirigida por acDC de células T específicas de epítipo identificadas por multímeros HLA. (a) Detección *ex vivo* de células T CD8+ específicas de Flu MP₅₈₋₆₆ usando pentámeros HLA-A2 cargados con Flu o péptido de control (PMr). (b) Expansión *in vitro* de células T CD8+ específicas de Flu MP₅₈₋₆₆ detectadas por PMr. Se cultivaron PBMC sin (primera columna) o con péptido Flu MP₅₈₋₆₆ (segunda y tercera columnas). Los cultivos se realizaron durante 48 h (primera y segunda fila), o las células no adherentes se lavaron, se volvieron a sembrar y se cultivaron adicionalmente hasta el día 7 (tercera y cuarta fila). Estos cultivos se realizaron con o sin el cóctel de acDC, según se indica. Las células T CD8+ específicas de Flu se identificaron con los correspondientes HLA-A2 PMr (primera y segunda columna). Y se determinó la tinción de fondo con PMr de control (tercera columna). (c, d) Se realizó el mismo experimento para detectar células T CD4+ específicas de Flu HA₃₀₆₋₃₁₈ usando tetrámeros HLA-DR4 cargados con Flu o péptido de control (TMr). Se indujo maduración de acDC con anti-CD40/IFN- α . Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 10. La secreción de IL-1 β amplificada por acDC se obtiene de células adherentes. Se estimularon PBMC con TTX o sin Ag después del procedimiento de acDC (maduración con anti-CD40/IFN- α). Después de 48 h, las células adherentes y no adherentes se ensayaron por separado en ensayos ELISpot de IL-1 β durante 6 h. * $p<0,01$; n.s., no significativo. Los resultados se refieren a un experimento representativo realizado por triplicado.

Ejemplos

Ejemplo 1: PBMC derivadas de DC cocultivadas aceleradas (acDC) amplifican las respuestas específicas de Ag de células T cocultivadas - estimulación con Ag proteico

Material y métodos:

En el día 0, se sembraron PBMC completas ($2,5 \times 10^6$ células/pocillo) en placas de 48 pocillos en medio AIM-V (Invitrogen) suplementado con 1.000 U/ml de GM-CSF, 500 U/ml de IL-4 (ambos de R&D Systems), y Ag proteicos relevantes (10 μ g/ml). Los antígenos proteicos ensayados fueron toxoide tetánico (TTX), derivado de proteína purificada de *M. tuberculosis* (PPD), vacuna hexavalente Infanrix hexa (GlaxoSmithKline), proinsulina (PI), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), péptido C de insulina, secuencia líder pre-PI, mieloperoxidasa, proteinasa 3. Un ejemplo de proteína usada como control negativo es albumina sérica bovina (BSA).

En el día 1, se añadieron estímulos proinflamatorios para inducir maduración de DC.

Se desarrollaron varios protocolos de maduración y se ensayaron como se detalla a continuación.

Protocolo de maduración A: 1000 U/ml de TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β (ambos de R&D) y PGE2 1 μ M (Calbiochem).

Este es el mismo cóctel de citoquinas usado para obtener FastDC [Dauer *et al.*, J.Immunol. 170:4069, 2003], y se ha descrito por otros varios grupos para generar DC convencionales (7 días). Además, se añadió IL-7 a baja dosis (0,5 ng/ml; R&D), que se ha descrito previamente que amplifica enormemente las respuestas de células T CD8+ de un modo específico de Ag (es decir, sin aumentar el fondo) usando un sistema de detección ELISpot [Martinuzzi *et al.*, J.Immunol.Methods 333:61, 2008]. Este protocolo fue adecuado para detectar respuestas de células T CD4+ específicas de Ag que producen, por ejemplo, IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-4.

Protocolo de maduración B: anticuerpo monoclonal anti-CD40 (mAb; clon G28-5, 10 μ g/ml), IFN- α 2a (Roferon-A, Roche; 1.000 U/ml).

Se ha descrito un cóctel de maduración similar para DC convencional de 7 días [Luft *et al.*, Int.Immunol. 14:367, 2002]. Además, se usó IL-7 a baja dosis (0,5 ng/ml) para amplificar adicional las respuestas.

Este protocolo fue adecuado para detectar respuestas de células T CD4+ específicas de antígeno que producen, por ejemplo, IFN- γ y IL-10.

Protocolo de maduración C: LPS 100 ng/ml e IL-7 a baja dosis (0,5 ng/ml).

Este protocolo fue adecuado para detectar respuestas de células T CD4+ específicas de Ag que producen, por ejemplo, IFN- γ , pero no IL-10, debido a un gran aumento en la secreción basal (no estimulada) de IL-10.

Protocolo de maduración D: poli I:C 20 μ g/ml e IL-7 a baja dosis (0,5 ng/ml).

Este protocolo fue adecuado para detectar respuestas de células T CD4+ específicas de Ag que producen, por

ejemplo, IFN- γ , pero no IL-10, debido a un gran aumento en la secreción basal (no estimulada) de IL-10.

Procedimiento de detección de células T: ELISpot. Se lavaron las células no adherentes, se resuspendieron en medio AIM-V fresco y se distribuyeron en pocillos triplicados ($0,3 \times 10^6$ células/pocillos) de placas de PVDF de 96 pocillos, que se habían recubierto durante una noche con los Ab de captura anti-citoquina deseados (por ejemplo, anti-IFN- γ , -IL-10, -IL-2, -IL-4; todos de U-CyTech). No se añadieron Ag o citoquinas adicionales, y las placas se incubaron durante 6 h a 37 °C, CO₂ al 5%. El revelado se realizó con Ab secundarios biotinilados y detección colorimétrica convencional tal como estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT-BCIP. Se contaron las manchas en un lector ELISpot Bioreader 5000 Pro S-F (BioSys) o equivalente, y se calcularon las medias de pocillos triplicados. Todas las lecturas de ELISpot se expresaron como células formadoras de manchas (SFC)/ 10^6 PBMC. El punto de corte para una respuesta positiva se estableció a 3SD por encima de la reactividad basal promedio (es decir, reactividad contra BSA o sin Ag)

Análisis fenotípico de acDC:

Se determinaron los fenotipos de acDC y DC convencionales (7 días, derivadas de monocitos) - inmaduras o maduras - por tinción con mAb específicos para HLA-DR, CD14, CD80, CD86, CD11c. Se evaluó la actividad endocítica por incubación con dextrano-FITC y posterior evaluación de fluorescencia captada. Todas las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSaria (BD).

Resultados:

La caracterización de una acDC reveló un fenotipo idéntico al de DC convencionales de 7 días. La regulación negativa de CD14 estaba equiparada por expresión aumentada de HLA-DR y moléculas coestimuladoras, mientras que la captación de dextrano disminuyó tras la maduración.

Se ensayó la capacidad de acDC de amplificar respuestas de células T específicas de Ag tras pulsar con Ag proteicos usando un sistema de detección ELISpot. Después del período de maduración de 24 h las células no adherentes se transfirieron a placas ELISpot recubiertas con un Ab de captura anti-IFN- γ , anti-IL-10, anti-IL-2 o anti-IL-4, y se cultivaron adicionalmente durante 6 h sin ningún Ag adicional o suplementación con citoquinas. Los cultivos dirigidos por acDC fueron mucho más eficaces en provocar respuestas de células T específicas de Ag en comparación con condiciones dirigidas con monocitos convencionales (es decir, sin ninguna adición de citoquinas). Las respuestas de fondo contra proteínas irrelevantes o diluyente de Ag en solitario no aumentaron significativamente. Además, las acDC fueron mucho más eficaces cuando maduraron con estímulos proinflamatorios, en comparación con acDC dejadas inmaduras (es decir, tratadas con GM-CSF e IL-4 solamente). La eficacia de acDC fue similar a la de DC convencionales de 7 días y fue eficaz de forma similar en la amplificación de diferentes respuestas de citoquinas, incluyendo IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4. Por ejemplo, el aumento medio en la señal específica con acDC maduras con TNF- α , PGE2 e IL-1 β en comparación con monocitos fue de 2,2 veces (intervalo 1,5-8,7) para IFN- γ y 1,4 veces (intervalo 1,2-5,0) para IL-10.

Ejemplo 2: estimulación de Ag peptídico.

Material y métodos:

Se realizó el mismo experimento que el descrito en el Ejemplo 1, usando estimulación con antígeno peptídico en lugar de estimulación con Ag proteico. Ejemplos de Ag proteicos ensayados fueron: proteína de matriz de *Influenza* (MP)⁵⁸⁻⁶⁶, hemaglutinina de *Influenza* (HA)³⁰⁶⁻³¹⁸, GAD⁵⁵⁵⁻⁵⁶⁷, GAD¹¹⁴⁻¹²³, PlB¹⁰⁻¹⁸. Ejemplos de péptidos usados como controles negativos fueron piruvato deshidrogenasa (PD)⁵⁻¹³ y colágeno II (CII)²⁶¹⁻²⁷³.

Resultados:

La señal provocada en cultivos de acDC pulsados con Ag proteicos se originó exclusivamente a partir de células T CD4+, ya que se anulaba completamente cuando estas células se retiraban. Las respuestas de células T CD8+ específicas de Ag solamente pudieron provocarse tras períodos de cultivo más largos (7 días). Lo mismo fue cierto cuando se usaron DC de 7 días para estimular PBMC completas o CD4-reducidas, descartando de este modo una característica deficiente específica de acDC. Esta estimulación específica de CD4 no se debía a activación ineficaz de células T CD8+, sino en su lugar a las condiciones de cultivo no óptimas para provocar presentación cruzada de Ag internalizados. De hecho, cuando se usaban epítopos peptídicos en lugar de Ag proteicos, se desencadenaban respuestas de células T tanto CD4+ como CD8+, y ambas se amplificaron significativamente por acDC en comparación con monocitos. Por tanto, se elaboró una variación de la técnica de cultivo de acDC para expandir y detectar células T específicas de Ag que reconocen un epítipo peptídico específico. En este caso, los péptidos de interés se añaden en el día 1 junto estímulos proinflamatorios. Esta variación permite detectar células T tanto CD4+ como CD8+ específicas para un epítipo dado.

Por tanto, el protocolo de cultivo de acDC puede usarse para estimular células T con Ag proteicos o peptídicos.

Ejemplo 3: inducción de acDC directamente en sangre.

Se añadieron cócteles de citoquinas y Ag proteicos/peptídicos como en el Ejemplo 1 (para Ag proteicos) o el Ejemplo 2 (para Ag peptídicos) directamente en muestras de sangre heparinizadas recién extraídas, sin ninguna purificación preliminar de PBMC o dilución de la sangre. Al final del cultivo de 48 h, se recuperó el plasma y/o las PBMC y se analizaron para respuestas de células T específicas de Ag por medición de citoquinas en plasma usando ELISA (R&D), serie de perlas citométricas (BD), o ensayos Bio-Plex (Biorad), o por ensayos de captura de citoquinas de Miltenyi sobre la fracción celular después de lisis de glóbulos rojos. Además, en este caso, las respuestas específicas de Ag provocadas en cultivos dirigidos por acDC fueron mayores que las provocadas en los dirigidos por monocitos. Dependiendo del protocolo de maduración usado, esto fue cierto para varias citoquinas ensayadas, incluyendo IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-6, IL-13, TNF- α , G-CSF, IL-1 β .

Ejemplo 4: expansión, clasificación y clonación de células T corriente abajo del cultivo de acDC y análisis de la respuesta de células T.

El sistema de cultivo de acDC también es adecuado: 1) para clasificar células T específicas de Ag para caracterización funcional adicional (por ejemplo, por técnicas de RT-PCR); y 2) para generar líneas y clones de células T para análisis adicionales.

Las PBMC se marcaron de forma preliminar con CFSE (succinimidil éster de carboxifluoresceína, 0,5-1 μ M), se sometieron al cultivo de acDC y se transfirieron a placas ELISpot como anteriormente. Después de la incubación ELISpot de 6 h, las células se recuperaron y se pusieron de nuevo en cultivo durante 5 días adicionales sin estímulos adicionales. Al final de este cultivo, la proliferación de células CFSE^{bajo} se clasificaron en células individuales y se expandieron adicionalmente a través de 3 rondas de estimulación usando protocolos descritos previamente [Mannering *et al.*, J.Immunol. Methods 298:83, 2005]. Como un ejemplo, se detectó respuesta específica de toxoide tetánico (TTX) por ELISpot con una frecuencia del 0,044 % que se correlacionaba con la selección de una fracción CFSE^{bajo} específica de TTX del 3,0 %, correspondiente a una expansión de ~68 veces. También para este cultivo *in vitro*, el cultivo basado en acDC demostró ser superior a expansiones convencionales basadas en monocitos que producían 10 veces menos células específicas de TTX (0,29 %). La fracción CFSE^{bajo} específica de TTX se clasificó y clonó, produciendo clones CD4⁺ específicos de TTX. Este enfoque también confirmó que las respuestas detectadas de los cultivos de acDC son, de hecho, específicas de Ag.

Ejemplo 5: el sistema de cultivo de acDC detecta respuestas de células T CD4⁺ específicas de células β .

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmunitaria mediada por células T que aborda células β productoras de insulina. Su incidencia está creciendo de forma continua (hasta 15 nuevos diagnósticos/100.000 /año en Francia, aumento del 3-4 % en la incidencia por año). Dada su epidemiología distintiva (afecta principalmente a niños y adultos jóvenes durante toda la vida), es una enfermedad crónica, costosa e incapacitante, que conduce a complicaciones graves: enfermedad cardiovascular, nefropatía y enfermedad renal en fase final, retinopatía y ceguera.

La aparición y diagnóstico de T1D clínica es un evento tardío en la cascada patogénica, que tiene lugar cuando la mayoría de las células β ya se han destruido durante los meses/años previos por células T autorreactivas. En esa fase, queda poco espacio para terapias relacionadas con la causa dirigidas a corregir los mecanismos inmunitarios, y el remplazo de insulina es la única opción terapéutica. Por lo tanto, existe una ausencia importante de biomarcadores adecuados para la predicción y seguimiento de la enfermedad, y de terapias específicas de antígeno (Ag) apropiadas capaces de inactivar selectivamente las respuestas de células T específicas de célula β evitando al mismo tiempo la supresión inmunitaria generalizada.

Para T1D, los autoanticuerpos actualmente en uso tienen limitaciones importantes, ya que el 15 % de los pacientes con T1D son negativos a autoanticuerpos; los autoanticuerpos no predicen el momento hasta la aparición de T1D; y no cambian después de intervenciones inmunitarias satisfactorias.

Como alternativa, las respuestas de células T sean respuestas de células T CD8⁺ o respuestas de células T CD4⁺, pueden usarse como biomarcadores prematuros.

El ELISpot de citoquinas es un ensayo ampliamente usado para la investigación de respuestas inmunitarias específicas en diversas afecciones. Las respuestas de células T CD8⁺ pueden detectarse fácilmente por este método. Aunque la poca información disponible acerca de epítomos diana de células β CD8⁺ para T1D sigue siendo una limitación, las técnicas existentes para medir las respuestas de células T CD8⁺ (ELISpot y basadas en tetrámero) han dado resultados prometedores (Toma *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 102:10581, 2005; Mallone *et al.*, Diabetes 56:613, 2007).

Las células T CD4⁺ específicas de Ag están presentes en sangre periférica a frecuencias muy bajas (~0,001-0,0001 %, incluso inferiores que sus equivalentes CD8⁺), haciendo problemática su detección - particularmente en el entorno autoinmunitario.

Alleva *et al.* (J Clin Invest. 107:173, 2001) informaron de la detección de una respuesta celular contra el epítipo de insulina B9-23 en pacientes con T1D, usando un ensayo ELISpot directo. Arif *et al.*, (J Clin Invest. 113:451, 2004) informaron de la detección de una respuesta celular contra varios péptidos derivados de proinsulina usando un ensayo ELISpot indirecto. En este artículo, se incubaron células mononucleares de sangre periférica con péptidos antigénicos antes del ensayo ELISpot.

Sin embargo, esos estudios han sido globalmente difíciles de reproducir fuera de sus laboratorios de origen. Esto pone de relieve los impedimentos técnicos de dichos procedimientos, y la baja sensibilidad global de estos sistemas de detección.

Por lo tanto, se usaron los procedimientos basados en acDC descritos en esta solicitud para investigar las respuestas de células T CD4+ específicas de células β de T1D. Se consideraron diferentes grupos de pacientes y se hicieron varias observaciones clave: en primer lugar, se caracterizaron adultos con T1D captados en el diagnóstico por una alta prevalencia (83,3 %) de respuestas específicas de proinsulina (PI), que contrastaba con la rareza de estas respuestas en pacientes antiguos (5,4 %; $P < 0,0001$). Por el contrario, las respuestas específicas de GAD estuvieron representadas de forma similar - aunque a frecuencias más bajas - independientemente de la duración de T1D. En segundo lugar, niños con T1D de nueva aparición no presentaban ninguna respuesta de células T específicas de PI. Controles sanos (tanto adultos como niños) no presentaban ninguna respuesta de células T específicas de PI excepto en dos casos (frecuencia del 8,7 %). En ambos casos, estos sujetos albergaban factores de riesgo de T1D no reconocidos previamente, que son positivos para el haplotipo de susceptibilidad HLA-DR4/DQ8 en un caso, y para Ab anti-GAD en el otro. Los parientes de 1^{er} grado en riesgo (n=10; definidos como individuos positivos para Ab contra células de los islotes, frecuentemente junto con otros marcadores de Ab) presentaban un cuadro algo intermedio, con un 30,0 % de los individuos ensayados positivos para respuestas específicas de PI. De forma importante, solamente 1 de los 10 individuos ensayados ha desarrollado T1D hasta ahora, y se había identificado correctamente como en alto riesgo de progresión de T1D por el ensayo ELISpot asado en acDC. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se hipotetiza de que la diferencia que se observa entre pacientes de T1D de nueva aparición y antiguos refleja una respuesta reguladora inducida por tratamiento con insulina, con implicaciones importantes para ensayos clínicos dirigidos a prevenir la enfermedad bloqueando la destrucción autoinmunitaria de células β en sujetos en riesgo. Esta respuesta reguladora puede ser, en algunos casos, una natural independiente de terapia con insulina, como se observa en niños.

Ejemplo 6: detección potenciada de respuestas de células T específicas de antígeno por células dendríticas cocultivadas aceleradas (acDC)

Resumen

La detección de células T específicas de antígeno (Ag) a menudo está limitada por la sensibilidad del ensayo. Por lo tanto, se ideó un enfoque para potenciar el procesamiento y presentación de Ag a células T en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas y de ratón acelerando la inducción y maduración de células dendríticas (DC) *in situ* (mencionadas como DC cocultivadas aceleradas, acDC). Las PBMC no fraccionadas o sangre completa se incubaron durante 48 h con Ag proteico o peptídico y cócteles de citoquinas para inducir, pulsar y madurar rápida y secuencialmente las acDC. De forma simultánea, se procesó y/o presentó el Ag a células T adyacentes, abreviando, por tanto, múltiples etapas que conducen a la activación de células T y minimizando las necesidades de tiempo, manipulación y sangre. Las respuestas de células T provocadas eran específicas de Ag, como se detecta por diferentes lecturas (secreción de citoquinas, proliferación, regulación positiva de CD137, unión de multímeros de Ag de leucocitos humanos). Los ensayos basados en acDC puede encontrar aplicaciones valiosas para controlar las respuestas de células T en diferentes entornos, tales como en enfermedades víricas, tumorales o autoinmunitarias.

Introducción

A pesar del papel central de las células T en el montaje de respuestas contra diferentes antígenos (Ag) foráneos y autoantígenos, la detección diagnóstica rutinaria de procesos mediados por el sistema inmunitario, por ejemplo, en enfermedad infecciosos o autoinmunitarias, depende en gran medida, si no exclusivamente, de la medición de respuestas de anticuerpos (Ab). Sin embargo, los Ab no siempre median o reflejan la patología subyacente y pueden ser poco informativos cuando el proceso inmunitario está predominantemente mediado por células T (1). La única aplicación clínica fiable de los ensayos de células T específicas de Ag hasta la fecha ha sido en el diagnóstico de infección por *M. Tuberculosis* (2). Además, la importancia de medir de forma eficaz la inmunidad de células T alcanza más allá de las aplicaciones de diagnóstico (3). El control de células T también es necesario para evaluar las terapias de inmunomodulación dirigidas a reforzar la inmunidad específica de virus o tumor, o la inactivación de la inmunidad contra tejidos propios (4) o trasplantados (5). Las herramientas de exploración de células T para evaluar el potencial inmunogénico de proteínas de remplazo (por ejemplo, factores de coagulación) (6) o de vacunas (7) están igualmente demandadas.

La ausencia de ensayos rutinarios de células T humanas, se debe a las dificultades intrínsecas en la medición de las respuestas de células T. Las células T específicas para un Ag dado están presentes en una frecuencia muy baja en

la sangre (es decir, 0,1-0,001 %) (8). Aunque estas células a veces son detectables *ex vivo*, su rareza desafía la sensibilidad de las tecnologías tales como inmunotransferencia ligada a enzimas (ELISpot) y citometría de flujo. Como alternativa, la frecuencia de estas células puede aumentarse por etapas preliminares de expansión, pero estas requieren tiempo y manipulación adicionales. Los péptidos epitópicos que se unen a moléculas Ag de leucocitos humanos (HLA) para la presentación y reconocimiento por el receptor de células T se usan frecuentemente para provocar respuestas de células T, ya que no requieren el procesamiento por células presentadoras de Ag (APC). Aunque se supera esta primera etapa limitante para la activación de células T, los epítomos, no obstante, tienen que identificarse de forma preliminar como de unión a moléculas HLA específicas para estimular las células T. Además, los péptidos estimulan un repertorio limitado de respuestas de células T contra secuencias Ag seleccionadas.

Las células dendríticas (DC) son APC especializadas dotadas con propiedades inigualables de procesamiento y estimulación (9). Estas características las hacen atractivas para la activación de células T de refuerzo, potenciando de ese modo la detección de células T específicas de Ag *in vitro*. Para este fin, las DC se inducen de forma rutinaria a partir de precursores de monocitos, un procedimiento que muy habitualmente requiere una diferenciación de 6 días con factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) e interleuquina (IL)-4 (10, 11), y posterior maduración durante al menos otro día con una gama de estímulos proinflamatorios para conseguir la capacidad estimuladora completa de células T (10-12). Estas necesidades de tiempo no son compatibles con la práctica de laboratorio clínico. Aunque se han descrito protocolos más cortos (13), aún requieren aislamiento preliminar de monocitos CD14+, aumentando por tanto enormemente las necesidades de sangre y el trabajo manual.

Para superar estas limitaciones, nos preguntamos si las DC podrían inducirse y madurarse para promover la presentación de Ag y la activación de células T *in situ* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La ventaja de este enfoque sería de dos factores. Por un lado, reduciría el tiempo, las etapas de purificación y las necesidades de sangre. Por el otro, mantendría los linfocitos en contacto con DC en diferenciación, estimulando por tanto las células T según sucediera el procesamiento de Ag, presentación y maduración de DC. Como estas DC se inducen y pulsan con Ag en 48 h mientras están rodeadas por linfocitos T afines y otras células sanguíneas, se mencionan como DC cocultivadas aceleradas (acDC). Por consiguiente, se desarrolló un procedimiento eficaz a corto plazo que amplifica las respuestas de células T específicas de Ag detectadas con una diversidad de plataformas de ensayo.

Resultados

Las acDC amplifican las respuestas de células T específicas de Ag

Para investigar si las acDC podrían amplificar las respuestas específicas de Ag de células T co-cultivadas, las acDC se indujeron en mezclas de PBMC por GM-CSF e IL-4 durante 24 horas. Al mismo tiempo, se añadieron diferentes Ag proteicos [por ejemplo, toxoide tetánico (TTX), derivado de proteína purificada de *M. tuberculosis* (PPD), vacuna hexavalente o sin Ag] desde el inicio del cultivo. Después de 24 horas adicionales de maduración, las células no adherentes se transfirieron a placas de inmunotransferencia ligada a enzimas (ELISpot) recubiertas con Ab anti-interferón (IFN)- γ y se cultivaron adicionalmente durante 6 horas sin Ag adicional o suplementación con citoquinas (para un esquema, véase la Fig. 7).

Para seleccionar los protocolos de maduración más adecuados, primero se comparó el potencial estimulador de las acDC maduras con estímulos diferentes con el de PBMC cultivadas en ausencia de citoquinas (Fig. 1a). Las respuestas de IFN- γ de ELISpot se amplificaron significativamente por acDC maduras por diferentes protocolos. Los más eficaces fueron factor de necrosis tumoral (TNF)- α /prostaglandina(PG)E2/IL-1 β (aumento de la señal del 42,0 % sobre las PBMC solamente, $p=0,03$), ácido poliinosínico:policitidílico (poliI:C) (aumento de la señal del 69,3 %; $p<0,001$), lipopolisacárido (LPS; aumento del 55,2 %, $p=0,01$), y anti-CD40/IFN- α (aumento del 170 %, $p<0,001$). De forma importante, todos estos protocolos aumentaron la señal de IFN- γ específica de Ag pero no el fondo, descartándose de este modo la activación de células T no específicas por citoquinas. La ausencia de regulación positiva de marcadores de activación (es decir, CD69, CD25, CD137) en células T de PBMC expuestas o no a citoquinas en ausencia de Ag excluyó adicionalmente la activación no específica (datos no mostrados; para CD137, véase la Fig. 5). Otros cócteles de maduración se excluyeron porque no amplificaban la señal específica de Ag (TNF- α /PGE2, oligodesoxinucleótidos CpG, poliI:C/PGE2, anti-CD40, anti-CD40/IFN- γ) o porque lo hacían junto con un aumento significativo en el fondo (anti-CD40/IL-1 β).

Las acDC humanas no solamente fueron capaces de amplificar las respuestas de secreción de IFN- γ sino también otras respuestas de citoquinas detectadas por ELISpot (Fig. 1b-d). Aunque la maduración anti-CD40/IFN- α amplificó las respuestas de IFN- γ al máximo (2,7 veces), TNF- α /PGE2/IL-1 β fue la única combinación que reforzaba todas las respuestas de citoquinas ensayadas (1,2-, 50,0- y 2,9 veces para IFN- γ , IL-10 e IL-4, respectivamente). Estos dos cócteles de maduración, por lo tanto, se retuvieron. Las respuestas de IL-17 no se amplificaron por ninguno de estos protocolos (datos no mostrados). Además, solamente las respuestas de memoria contra TTX, no las respuestas vírgenes al neoAg KLH, estuvieron significativamente por encima del fondo (Fig. 1b-d).

La amplificación de respuestas de células T por acDC también se obtuvo con células mononucleares de sangre de ratón incubadas con GM-CSF/IL-4 seguido por LPS para la maduración. Las células de ratones inmunizados con una única dosis baja de hemocianina de lapa californiana (KLH) mostraron respuestas de recuerdo ELISpot de IFN- γ específicas de KLH significativamente mayores en presencia de las citoquinas acDC (Fig. 8).

La caracterización de las acDC reveló un fenotipo idéntico al de DC derivadas de monocitos convencionales (moDC) (Fig. 2a). La regulación negativa de CD14 estaba equiparada por una expresión aumentada de moléculas HLA-DR y co-estimuladoras, mientras que la captación de dextrano, aunque más eficaz en moDC, disminuyó tras la maduración. Las acDC también eran al menos tan eficaces como las moDC en provocar respuestas de células T específicas de Ag (Fig. 2b). Como se esperaba, tanto las acDC como las moDC fueron más eficaces después de la maduración con estímulos pro-inflamatorios (Fig. 2b).

Reproducibilidad de respuestas de células T amplificadas por acDC

La reproducibilidad se evaluó ensayando diferentes alícuotas celulares congeladas a partir de la misma preparación de PBMC (es decir, variabilidad entre ensayos en el nivel analítico, que excluye diferencias introducidas por la extracción de sangre y el procesamiento; Fig. 2c) y diferentes preparaciones de PBMC obtenidas de extracciones de sangre recogidas en diferentes ocasiones del mismo individuo (es decir, variabilidad entre ensayos a nivel pre-analítico y analítico, que incluye diferencias debido a la extracción de sangre y el procesamiento; Fig. 2d). En ambos casos, la variabilidad del ensayo fue <10 %. De forma notable, la variación entre muestras frescas y congeladas (6,9 %) también fue pequeña (Fig. 2e).

Las células T específicas de Ag expandidas por acDC también pueden aislarse y clonarse

Para seleccionar y expandir células T específicas de Ag, se usó dilución de un colorante unido a células, diacetato succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE), como lectura de proliferación (14) y se combinó con el procedimiento de acDC (Fig. 3a). Las PBMC primero se marcaron con CFSE y después se usaron en el procedimiento ELISpot amplificado por acDC. Se recuperaron de la placa ELISpot y se cultivaron durante otros 6-8 días sin manipulación adicional. Las células en proliferación (CFSEbajo) después se identificaron por citometría de flujo, se clasificaron en células individuales y se expandieron adicionalmente a través de tres rondas de estimulación con Ab anti-CD3, IL-2 e IL-4 (15). Se muestra un ejemplo representativo en la Fig. 3b-d. se detectó respuesta ELISpot de IFN- γ específica de TTX (441 células formadoras de manchas (SFC) de IFN- γ /10⁶ PBMC; 0,044 %) (Fig. 3b), que dio lugar a una fracción CFSEbajo específica de TTX del 3,0 %, correspondiente a una expansión de ~68 veces. La condición de acDC fue superior a la expansión convencional en ausencia de citoquinas, que produjo 10 veces menos células específicas de TTX (0,29 %, $p < 0,001$). No se observó aumento significativo en la proliferación de fondo (Fig. 3c). La fracción CFSEbajo específica de TTX (células divididas) se clasificó y clonó, generando clones de células T específicas de TTX, evaluadas por ensayo de recuerdo sobre DC pulsadas con TTX frente a control (Fig. 3d).

Se obtuvieron expansiones similares después de estimulación con epítopos peptídicos y detección por células T CD4⁺ o CD8⁺ teñidas con péptido-multímero HLA (Fig. 9). Se tiñeron PBMC frescas con multímeros HLA *ex vivo* y a las 48 horas y 7 días después de la estimulación con péptido en ausencia o presencia de acDC. Las células T CD8⁺ específicas de Flu MP58-66 restringidas a HLA A2 detectadas *ex vivo* (0,063 % después de sustracción de la tinción de fondo) (Fig. 9a) se expandieron después de 7 días, pero no después de 48 horas, de estimulación específica de péptido (expansión de 13,3 veces frente a 0,54 veces en ausencia de citoquinas) (Fig. 9b). Se obtuvieron resultados similares analizando células T CD4⁺ restringidas a HLA-DR4 específicas de Flu HA306-318. La frecuencia de células T CD4⁺ específicas de péptido *ex vivo* (0,24 % después de sustracción del fondo) (Fig. 9c) aumentó tras la expansión específica de péptido solamente después de 7 días de cultivo, y solamente cuando se usaba el cóctel de acDC (expansión de 13,5 veces frente a 0,79 veces en ausencia de citoquinas) (Fig. 9d). Juntos, estos datos muestran que las acDC potencian significativamente la expansión de células T específicas de Ag tras cultivo prolongado y que las respuestas de células T amplificadas con acDC son específicas de Ag.

Ag proteicos y peptídicos desencadenan diferentes respuestas de células T

A continuación, se comparó la estimulación de células T por acDC pulsadas con Ag proteicos y peptídicos. Cuando se usaron Ag proteicos, las respuestas provocadas en cultivos de acDC de 48 horas seguidos por ELISpot de IFN- γ se originaron exclusivamente de células T CD4⁺, ya que su reducción al inicio o al final de la estimulación anulaba completamente las respuestas (Fig. 4a). Lo mismo fue cierto con moDC, lo que demuestra que esta característica no era peculiar para las acDC. La débil activación de células T CD8⁺ se debía probablemente a una ineficaz presentación cruzada de Ag captados durante el cultivo de 48 horas. Por tanto, cuando los Ag proteicos se reemplazaban por epítopos peptídicos restringidos a HLA clase II o clase I, las respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ se desencadenaban, respectivamente (Fig. 4b), confirmando de nuevo por la reducción de células T CD4⁺ y CD8⁺ (no mostrado). Además, ambos tipos de respuestas se amplificaron significativamente por acDC en comparación con PBMC convencionales (3,2 y 6,3 veces para células T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente; $p < 0,05$), lo que demuestra la utilidad de la técnica de acDC para Ag tanto proteicos como peptídicos.

Las células T CD4⁺ específicas de Ag detectadas por ELISpot amplificado por acDC eran predominantemente células de memoria, ya que la reducción de células T CD45RO⁺ (pero no de CD45RA⁺) reducía significativamente la respuesta (disminución del 81,4 %, $p < 0,05$; Fig. 4c). Esto se confirmó comparando las respuestas contra el Ag de recuerdo TTX con las del neoAg KLH. De hecho, KLH no provocó respuestas de células T de IFN- γ o IL-10 significativas durante la estimulación de acDC de 48 horas (Fig. 4d). Sin embargo, cuando estas células (que primero se habían marcado con CFSE) se cultivaron durante otra semana, se detectó una respuesta CD4⁺ específica de KLH de grado bajo (Fig. 4e). Además, también se observaron células T CD8⁺ específicas de TTX, lo que sugiere que sucedía sensibilización cruzada con estimulación más larga.

Las acDC potencian diferentes respuestas de células T en PBMC o en sangre completa

Se investigó adicionalmente si la amplificación con acDC se aplicaba a otras lecturas de células T funcionales usando PBMC purificadas. Se detectó la secreción de IFN- γ por un ensayo de captura (Miltenyi) con mAb biespecíficos contra CD45 (que se une a la superficie de células inmunitarias) e IFN- γ (Fig. 5a). No se detectó secreción significativa de IFN- γ específica de TTX en ausencia de citoquinas. Sin embargo, se detectó IFN- γ en células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ después de amplificación con acDC, sin aumento en el fondo. La cantidad de células T IFN- γ fue mayor que la detectada por ELISpot, que puede explicarse porque también se visualizaban respuestas de células T CD8⁺. Se obtuvieron resultados similares con expresión superficial de CD137, un marcador de activación I de células T (16, 17) (Fig. 5b). Ambas lecturas también fueron compatibles con la clasificación y clonación corriente abajo de células T específicas de Ag (datos no mostrados).

A continuación, nos preguntamos si las acDC podrían amplificar respuestas de células T específicas de Ag en sangre completa. Estos experimentos se realizaron en paralelo a aquellos sobre PBMC purificadas mostrados en la Fig. 5b, usando la misma extracción de sangre, añadiendo el cóctel de acDC (GM-CSF/IL-4 seguido por anti-CD40/IFN- α) directamente a sangre heparinizada diluida (250 ml) junto con Ag. Después de 48 horas, la sangre hemolisada se examinó para la activación de células T por análisis citométrico de flujo de la expresión de CD137 (Fig. 5c). La regulación positiva de CD137 se detectó de forma más sensible en sangre completa que en PBMC purificadas cuando no se añadían citoquinas, mientras que lo opuesto fue cierto para condiciones de acDC. La inferior amplificación obtenida por acDC sobre sangre completa fue, no obstante, suficiente para potenciar las respuestas de células T CD4⁺, pero no CD8⁺.

Las acDC amplifican la secreción de citoquinas estimulada por Ag en sangre completa

Finalmente, se exploró si la amplificación de acDC podría detectar secreción de citoquinas a granel específica de Ag sobre plasma recogido de estimulación de sangre completa. Para este fin, sin incubó sangre completa heparinizada con el cóctel de acDC (GM-CSF/IL-4 seguido por anti-CD40/IFN- α) y Ag como anteriormente. Después de 48 horas, se recuperaron los sobrenadantes de plasma para las mediciones de citoquinas. Varias citoquinas presentaban aumentos significativos tras estimulación con Ag (Fig. 6a). Excepto para la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , la señal neta (es decir, con el fondo sustraído) específica de Ag fue mayor en las acDC que en la condición "sin citoquinas" para todos los marcadores (amplificación media de la señal de 6,1 veces; intervalo 3,6-41,9; $p < 0,001$). De forma importante, la secreción basal no aumentó tras exposición a acDC e incluso disminuyó en algunos casos, apuntando hacia un efecto de amplificación específico de Ag. Como para la regulación positiva de CD137, se comparó la sensibilidad de la detección de citoquinas en sangre completa y PBMC (Fig. 6b). Las citoquinas se detectaron a mayor sensibilidad con PBMC que con sangre completa, siendo las concentraciones medias ~4 veces mayores con PBMC (intervalo 1,0-34,0; $p < 0,001$).

Sorprendentemente, algunas citoquinas que no se sabía que estaban secretadas por células T (G-CSF, IL-1 β) también se comportaron como marcadores de activación específica de Ag. La tinción intracelular de citoquinas mostró adicionalmente que la secreción de IL-1 β específica de Ag derivaba de células adherentes y no las no adherentes (Fig. 10).

Discusión

El potencial terapéutico de las DC se está explorando de forma activa para inducir respuestas de células T inmunogénicas y tolerogénicas contra Ag relacionados con enfermedad (18, 19). Sin embargo, a pesar de sus potentes propiedades de procesamiento y presentación de Ag, las DC no se han explotado para el diagnóstico de células T. Esto se debe probablemente a restricciones dictaminadas por la baja frecuencia de DC en circulación accesibles y por los grandes volúmenes de sangre necesarios para generar APC de tipo DC partiendo de monocitos y otros precursores. La técnica de acDC rellena este hueco, proporcionando el medio para amplificar las respuestas de células T específicas de Ag en un método corto y simple susceptible a aplicación rutinaria de laboratorio. La comparación lado a lado de las acDC y moDC reveló similitudes llamativas, tanto en términos de fenotipo como de potencia estimuladora. La ventaja notable de las acDC es que se generan *in situ* en 48 horas en el entorno más fisiológico de PBMC no fraccionadas o sangre completa. Además, las necesidades de muestras son mínimas, con solamente 10⁶ PBMC (~1 ml de sangre) o 250 μ l de sangre completa necesarios. Esta es una consideración crítica en el control longitudinal de las respuestas de células T, especialmente en niños, y una ventaja clara en la exploración de bibliotecas de péptidos para epítomos de células T.

En cultivo en masa, la inducción y pulsación con Ag de acDC está acoplada con activación simultánea - de un modo específico de Ag - de las células T, alineando por tanto tres etapas críticas que conducen a una respuesta de células T. Un problema potencial en este tipo de ensayo es la activación de células T no específicas por las citoquinas usadas para inducir y madurar las acDC. Este no fue, sin embargo, el caso, ya que los valores basales para las lecturas de células T (proliferación, regulación positiva de CD137, secreción de citoquinas) se veían afectadas de forma solamente marginal por el protocolo de acDC. Es relevante que aumentos limitados (hasta 10 veces) en los valores de fondo no excluían la detección de respuestas de células T raras (frecuencia del 0,001 %), como se ha demostrado previamente (20). Es posible que la interacción entre las acDC presentadoras de Ag y las células T respondedoras sinergicen adicionalmente para amplificar las respuestas específicas de Ag. Las respuestas detectadas en ensayos basados en acDC son *bona fide* específicas de Ag, ya que las células T clasificadas expandidas *in vitro* conservaban la especificidad de Ag. Por otro lado, los estudios con multímero de HLA-epítipo peptídico demostraron que las frecuencias de precursores de células T no aumentaban hasta después de las primeras 48 horas de estimulación de Ag dirigida por acDC. No obstante, la cantidad de células T activadas (CD137+) ya estaba aumentada a las 48 horas. Esto sugiere que las respuestas específicas de Ag, detectadas por lecturas funcionales, están aumentadas y se revelaban por mecanismos de activación espectadores. Para entornos de investigación que requieren enumeración exacta de las frecuencias de precursores de células T, la dilución con CFSE podría acoplarse con la tinción de multímero HLA para determinar la cantidad original de células T en proliferación (21). Para aplicaciones clínicas rutinarias, las lecturas amplificadas obtenidas en 48 horas serían suficientes.

Las técnicas de acDC sirven para Ag proteicos completos como epítomos peptídicos. Los Ag proteicos eliminan la necesidad de identificación de epítomos y la selección de pacientes basada en el tipo de HLA. Además, permiten la estimulación con el repertorio completo de epítomos procesados. Dada la alta capacidad endocítica y procesadora de Ag de las DC, también podrían idearse ensayos de acDC en que se usa material celular tal como tejidos diana donantes, de tumor o autoinmunitarios como fuentes de Ag. Los estímulos usados para madurar las acDC también eran un parámetro crítico. Como se ha informado previamente (12), anti-CD40 e IFN- α junto con GM-CSF/IL-4 amplificaba de forma más eficaz las respuestas auxiliares T (Th)1 productoras de IFN- γ , combinando al mismo tiempo TNF- α e IL-1 β con PGE2 (22) conducía a un fenotipo de células T más equilibrado que permite una mejor detección de respuestas Th2 (IL-4) y reguladoras T (IL-10).

La técnica de acDC es compatible con una amplia gama de lecturas de células T, algunas de las cuales pueden complementarse con clasificación corriente abajo de células específicas de Ag para expansión y/o caracterización adicional. La versatilidad de la técnica de acDC se ejemplificó por ensayos de células individuales (ELISpot de citoquinas, proliferación de CFSE, captura de IFN- γ , regulación positiva de CD137, multímeros HLS) y en masa (citoquinas en plasma o en sobrenadantes de cultivo). La sensibilidad de estos diferentes formatos de ensayo de acDC tendría que evaluarse para cada aplicación. Los ensayos de células individuales a menudo se prefieren, ya que proporcionan información acerca de la frecuencia y fenotipo de las células T respondedoras y frecuentemente son más sensibles que los ensayos en masa. No obstante, los ensayos en masa son más fáciles de realizar en un entorno rutinario, y su sensibilidad de detección puede ser suficiente para muchas aplicaciones, como en el caso de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de IFN- γ para *M. tuberculosis* (23). Asimismo, ensayos que emplean sangre completa evitan la purificación de PBMC, manteniendo por tanto las células en un medio más fisiológico y ofreciendo conveniencia adicional. Aunque las citoquinas de los cultivos de acDC aparentemente se detectaban con mayor sensibilidad con PBMC que con sangre completa, la diferencia puede deberse en parte a las diferentes células y sus concentraciones en sangre y en PBMC. De hecho, las PBMC se re-suspendieron a la concentración óptima de 5×10^3 células/ μ l, mientras que los volúmenes de sangre completa de 250 μ l/muestra correspondían a $\sim 1 \times 10^3$ PBMC/ μ l. Por tanto, las PBMC purificadas estaban ~ 5 veces más concentradas que las células sanguíneas.

Un resultado interesante a partir de los ensayos en masa fue la secreción estimulada de G-CSF e IL-1 β , que no se obtienen de células T. Es probable que estas citoquinas se produjeran por APC adherentes, como se sugiere por los ensayos ELISpot de IL-1 β realizados sobre células adherentes y no adherentes. Un bucle de retroalimentación positivo entre las acDC presentadoras de Ag y las células T respondedoras puede activar adicionalmente las acDC, induciéndolas a secretar citoquinas distintivas de un modo específico de Ag. Las citoquinas derivadas de APC pueden constituir, por tanto, biomarcadores indirectos valiosos de respuestas de células T.

Distorsionar el fenotipo acDC *in vitro* también puede ofrecer modos de inducción de células T específicas de Ag con diferentes propiedades. Por ejemplo, las DC tratadas con IL-10 son tolerogénicas y pueden dar lugar a células T CD4⁺ y CD8⁺ con propiedades reguladoras (24, 25). La estimulación de acDC en presencia de IL-10, por tanto, ofrece la estrategia para obtener células reguladoras T específicas de Ag.

Métodos

Antígenos. Se usaron los siguientes Ag: albúmina sérica bovina (BSA; Sigma, Lyon, Francia), TTX (una amable donación del Dr. Rino Rappuoli, Novartis, Siena, Italia), PPD de *M. tuberculosis* (Tubertest, Sanofi Pasteur, Lyon, Francia), vacuna hexavalente (Infanrix hexa, GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica) y KLH (Sigma). Se confirmó la pureza de Ag por SDS-PAGE, y la concentración de endotoxina era $<0,035$ EU/ μ g por ensayo de lisado de límulo (Lonza, Saint Beuzire, Francia). Los péptidos Flu MP58-66 y Flu HA306-318 eran >95 % puros (GL Biochem,

Shanghái, China).

Inducción de acDC en PBMC. El estudio se aprobó por los comités éticos y todos los sujetos dieron consentimiento informado por escrito. Las PBMC se aislaron y se usaron frescas o congeladas como se describe (26). En el día 0, las PBMC se sembraron (10^6 células/100 μ l/pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio AIM-V suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF, 500 U/ml de IL-4 (R&D, Lille, Francia) y que contenían Ag proteicos (0,1-10 μ g/ml). Después de 24 h (día 1), se añadieron estímulos de maduración, que comprenden los siguientes reactivos en diferentes combinaciones (véase la Fig. 1c): 1000 U/ml de TNF- α , 10 ng/ml de IL-1 β , 1000 U/ml IFN- γ (todos de R&D), 1 mM de PGE2 (Calbiochem, San Diego, CA); CpG ODN2216 (5 μ g/ml; Cell Sciences, Canton, MA), polil:C (20 μ g/ml; Cayla/InvivoGen, Toulouse, Francia), LPS (100 ng/ml; de *E. coli* 055:B5, Sigma), Ab anti-CD40 (10 μ g/ml; clon G28.5, producido de forma local), IFN- α -2a (1000 U/ml; Roferon-A, Roche, Neuilly-sur-Seine, Francia). Los cócteles de maduración usados en cada experimento se detallan en las leyendas de la figura. Se añadió IL-7 (0,5 ng/ml; R&D) junto con estímulos de maduración (26). Cuando se usaron, los Ag peptídicos se añadieron en el día 1 junto con los estímulos de maduración. En el día 2 (48 h después del inicio del cultivo), se recogieron las células no adherentes, se lavaron y se analizaron.

Inducción de acDC en sangre completa. Se distribuyó sangre heparinizada no diluida fresca (250 μ l) en tubos de 1,5 ml, se añadieron citoquinas y Ag como para la estimulación de PBMC, y la sangre hemolisada y/o los sobrenadantes del plasma se analizaron después de 48 h.

Caracterización de DC. Para generar moDC, se cultivaron monocitos purificados con GM-CSF/IL-4 durante 6 días y se maduraron con TNF- α /PGE2/IL-1 β durante 24 h adicionales. Se determinaron los fenotipos de las acDC y moDC de 7 días tiñendo con Ab específicos para HLA-DR, CD14, CD80, CD86 y CD11c (BD). La actividad endocítica se evaluó por captación de fluorescencia de dextrano-FITC. Se realizaron experimentos de citometría de flujo sobre un FACSaria equipado con láseres de 488, 633 y 407 nm (BD).

Ensayos ELISpot. Después de 48 h de incubación de acDC en PBMC, se lavaron las células no adherentes, se resuspendieron en AIM-V fresco y se ensayaron durante 6 h como se describe (27). Se contaron las manchas en un Bioreader 5000 Pro-SF (BioSys, Karben, Alemania) y se determinaron las medias de 3-6 réplicas. Las lecturas de ELISpot se expresan como SFC/ 10^6 PBMC y están con el fondo sustraído (para las respuestas espontáneas en presencia de BSA o sin Ag, que eran idénticas en todos los casos) (27).

Ensayos de CFSE y clonación de células T. Se tiñeron PBMC con CFSE 0,1 mM (Invitrogen/Molecular Probes) y se usaron para cultivos de acDC como se ha descrito anteriormente. Después de 2 días, se lavaron las células no adherentes, se transfirieron a placas ELISpot durante 6 h, después se volvieron a sembrar en placas de fondo en U de 96 pocillos. Después de 5-8 días de cultivo, las células se tiñeron para CD4/CD8. Se clasificó una única célula CD4⁺ CFSEdim en cada pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos. Cada pocillo contenía IL-2 (20 U/ml; R&D), IL-4 (5 ng/ml), anti-CD3 (OKT3, 30 ng/ml) y 2×10^5 PBMC irradiadas de dos donantes no relacionados (15). Las células se alimentaron cada 7 días con citoquinas frescas. Se ensayaron los clones en crecimiento después de ~3 semanas por tinción intracelular de IFN- γ después de incubación con moDC pulsadas con Ag o no pulsadas.

Ensayos de captura de IFN- γ y regulación positiva de CD137. Se realizó captura de IFN- γ usando un kit de IFN- γ -aloficocianina de Miltenyi. CD137 se tiñó con Ab 4B4 (BD) marcado con ficoeritrina (PE).

Ensayos de multímeros de HLA. Se usaron pentámeros HLA-A0201 marcados con PE cargados con Flu MP58-66 o péptido de control (Prolimmune, Oxford, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tetrámeros HLA-DR0401 marcados con PE cargados con Flu HA306-318 o péptido de control los proporcionaron amablemente los Dr. E. James y G.T. Nepom (Benaroya Research Institute, Seattle, WA) y se usaron como se describe (28).

Estimulación de acDC de ratón. Se inmunizaron de forma subcutánea ratones Balb/c con 50 mg de KLH en adyuvante completo de Freund en la base de la cola. Después de 14 días, se recogieron las células sanguíneas, se hemolisaron y se sembraron en placas de 48 pocillos (2×10^6 células/pocillo). Se añadieron GM-CSF e IL-4 de ratón (R&D) como para acDC humanas, con o sin KLH (0,1 mg/ml); se añadió LPS (10 ng/ml) en el día 1 y los ensayos ELISpot se realizaron en el día 2 como se describe (27).

Ensayos combinados de citoquinas. Se analizaron sobrenadantes de cultivos de acDC de 48 h en una plataforma Luminex (Bio-Plex 200, Bio-Rad, Gladesville, NSW, Australia) usando un panel Milliplex (Millipore/Abacus, Brisbane, QLD, Australia) que comprendía las siguientes citoquinas y quimioquinas: G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, MIP-1 α , MIP-1 β y TNF- α .

Análisis estadísticos. Todos los gráficos se presentan como medias $\pm$ ETM de >3 experimentos independientes. Todos los análisis estadísticos fueron de dos variables y se realizaron de acuerdo con la distribución variable y el tamaño de muestra usando Graph-Pad Prism 5 (La Jolla, CA).

Referencias del ejemplo 6

1. Harrison, L.C. et al. Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest* 89, 1161-1165 (1992).
- 5 2. Lalvani, A. et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357, 2017-2021 (2001).
3. Kern, F., Lipira, G., Gratama, J.W., Manca, F., y Roederer, M. Measuring Ag-specific immune responses: understanding immunopathogenesis and improving diagnostics in infectious disease, autoimmunity and cancer. *Trends Immunol.* 26, 477-484 (2005).
- 10 4. Roep, B.O. y Peakman, M. Surrogate end points in the design of immunotherapy trials: emerging lessons from type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 145-152 (2010).
5. Ashton-Chess, J., Giral, M., Souillou, J.P., y Brouard, S. Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation? *Transpl. Int.* 22, 110-119 (2009).
- 15 6. Dasgupta, S. et al. Auditing protein therapeutics management by professional APCs: toward prevention of immune responses against therapeutic proteins. *J. Immunol.* 181, 1609-1615 (2008).
7. Keilholz, U., Martus, P., y Scheibenbogen, C. Immune monitoring of T-cell responses in cancer vaccine development. *Clin. Cancer Res.* 12, 2346s-2352s (2006).
8. Mallone, R. y Nepom, G.T. MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin. Immunol.* 110, 232-242 (2004).
- 20 9. Shortman, K. y Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151-161 (2002).
10. Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118 (1994).
- 25 11. Zhou, L.J. y Tedder, T.F. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2588-2592 (1996).
12. Luft, T. et al. IFN-alpha enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* 14, 367-380 (2002).
13. Dauer, M. et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J. Immunol.* 170, 4069-4076 (2003).
- 30 14. Mannering, S.I. et al. A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T cells. *J. Immunol. Methods* 283, 173-183 (2003).
15. Mannering, S.I. et al. An efficient method for cloning human autoantigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods* 298, 83-92 (2005).
- 35 16. Wolf, M. et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8⁺ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 110, 201-210 (2007).
17. Wehler, T.C. et al. Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *J. Immunol. Methods* 339, 23-37 (2008).
- 40 18. Dhodapkar, M.V. et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest* 104, 173-180 (1999).
19. Hackstein, H., Morelli, A.E., y Thomson, A.W. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol.* 22, 437-442 (2001).
20. Martinuzzi, E. et al. The frequency and immunodominance of islet-specific CD8⁺ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment. *Diabetes* 57, 1312-1320 (2008).
- 45 21. Novak, E.J., Liu, A.W., Nepom, G.T., y Kwok, W.W. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4⁺ T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J. Clin. Invest* 104, R63-R67 (1999).
22. Kalinski, P., Schuitemaker, J.H., Hilkens, C.M., y Kapsenberg, M.L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161, 2804-2809 (1998).
- 50 23. Mori, T. et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 170, 59-64 (2004).
24. Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., y Enk, A.H. CD4⁺ and CD8⁺ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99, 2468-2476 (2002).
- 55 25. Gregori, S., Magnani, C.F., y Roncarolo, M.G. Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 70, 966-969 (2009).
26. Martinuzzi, E. et al. Serum-free culture medium and IL-7 costimulation increase the sensitivity of ELISpot detection. *J. Immunol. Methods* 333, 61-70 (2008).
27. Mallone, R. et al. CD8⁺ T-cell responses identify beta-cell autoimmunity in human type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 613-621 (2007).
- 60 28. Mallone, R. et al. Functional avidity directs T-cell fate in autoreactive CD4⁺ T cells. *Blood* 106, 2798-2805 (2005).

Referencias

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno (Ag) en una muestra de sangre o de células mononucleares de sangre periférica no fraccionada (PBMC) aislada de un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar dicha muestra de sangre o muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de células dendríticas (DC), comprendiendo dicho medio factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e interleuquina 4 (IL-4);
- b) madurar dichas DC;

en el que se añade un Ag durante las etapas a) y/o b).

2. Un método para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T específicas de Ag que están correlacionadas con la enfermedad;

en el que se añaden uno o más Ag asociados a enfermedad durante las etapas a) y/o b), y en el que la presencia de la respuesta de células T específicas de Ag indica la presencia de la enfermedad.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1 (T1D), granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple.

4. Un método para controlar los efectos de una inmunoterapia en un sujeto que padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cancerosas y enfermedades infecciosas, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

en el que se añaden uno o más Ag asociados a enfermedad durante las etapas a) y/o b), y

en el que una intervención satisfactoria se traduce en una disminución, en el caso de enfermedades autoinmunitarias, o aumento, en el caso de cáncer y enfermedades infecciosas, de las respuestas de células T específicas de Ag relacionado con enfermedad.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1 (T1D), granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple; melanoma, cáncer de colon, cáncer renal, leucemias, linfomas y mieloma múltiple; enfermedades infecciosas causadas por agentes infecciosos elegidos de *M. tuberculosis*, VIH, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de la gripe.

6. Un método para evaluar la tolerogenicidad de una proteína terapéutica, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

en el que dicha proteína terapéutica se añade durante las etapas a) y/o b), y en el que la proteína terapéutica es un antígeno asociado a enfermedad asociado con una enfermedad autoinmunitaria y una respuesta de células T es indicativa de tolerogenicidad.

7. Un método para evaluar la inmunogenicidad de una proteína terapéutica, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

en el que dicha proteína terapéutica se añade durante las etapas a) y/o b), y

en el que la proteína terapéutica es un antígeno asociado a enfermedad asociado con un cáncer o una enfermedad infecciosa y una respuesta de células T es indicativa de inmunogenicidad.

5 8. Un método para evaluar la inmunogenicidad de una proteína terapéutica, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- b) madurar dichas DC;
- 10 c) detectar respuestas de células T;

en el que dicha proteína terapéutica se añade durante las etapas a) y/o b), y en el que la proteína terapéutica es una proteína contra la cual no es deseable montar una respuesta inmunogénica y una respuesta de células T es indicativa de una respuesta inmunogénica contraproducente.

15 9. Un método para explorar Ag o epítomos candidatos, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- 20 b) madurar dichas DC;
- c) detectar respuestas de células T;

en el que se añade un Ag o epítomo candidato durante las etapas a) y/o b), y seleccionar Ag y epítomos que provocan una respuesta de células T específicas de Ag.

25 10. Un método para producir clones de células T que presentan propiedades inmunológicas específicas a partir de un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- 30 b) madurar dichas DC;
- c) aislar al menos una célula T que presenta dichas propiedades inmunológicas específicas;

en el que se añade un Ag durante las etapas a) y/o b),

35 en el que dichas propiedades inmunológicas específicas se seleccionan en el grupo que consiste en:

- reconocimiento por la célula T aislada del Ag añadido durante la etapa a) y/o b),
- producción de IFN- γ ,
- capacidad de ejercer efectos citotóxicos sobre células que presentan el Ag reconocido,
- 40 - producción de IL-10.

11. Un método para generar células reguladoras T específicas de Ag que presentan propiedades inmunológicas específicas a partir de un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una muestra de sangre o una muestra de PBMC no fraccionada obtenida de dicho sujeto en un medio que induce la diferenciación de DC con propiedades tolerogénicas, comprendiendo dicho medio GM-CSF e IL-4;
- 45 b) madurar dichas DC;
- c) aislar al menos una célula T que presenta dichas propiedades inmunológicas específicas;

en el que se añade un Ag durante las etapas a) y/o b),

50 en el que dichas propiedades inmunológicas específicas se seleccionan en el grupo que consiste en:

- reconocimiento por la célula T aislada del Ag añadido durante la etapa a) y/o b),
- capacidad de suprimir la proliferación, secreción de citoquinas, citotoxicidad y otras funciones efectoras de células T puestas en contacto físico o en proximidad espacial con dichas células reguladoras T, o puestas en contacto con sobrenadantes de cultivos de células reguladoras T,
- 55 - capacidad de producir citoquinas reguladoras elegidas de IL-10, miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β , IL-35, en solitario o en combinación con citoquinas no reguladoras tales como IFN- γ ,
- 60 - capacidad de proliferar solamente en presencia de IL-2,
- capacidad de expresar marcadores típicos de poblaciones de células reguladoras T elegidos de CD25, CD127, GITR, foxP3, HLA-DR, CTLA-4, CD45RA e ICOS.

12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho medio que induce la diferenciación de DC comprende ligando Flt-3.

65

13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la etapa a) se realiza durante una cantidad de tiempo t(a) comprendida entre 16 horas y 7 días, preferiblemente entre 20 horas y 4 días, incluso más preferiblemente durante 24 horas.

5 14. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa b) se realiza en presencia de al menos un estímulo proinflamatorio y/o agente que imita una agresión vírica o bacteriana seleccionada del grupo que consiste en factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-1 beta (IL-1 β), prostaglandina E2 (PGE2), anticuerpo anti-CD40, interferón-alfa 2a (IFN- α 2a), lipopolisacáridos (LPS), ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C), interferón-gamma (IFN- γ), interleuquina-7 (IL-7) y mezclas de los mismos.

10 15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la etapa b) se realiza durante una cantidad de tiempo t(b) comprendida entre 12 y 72 horas, preferiblemente entre 16 y 48 horas, incluso más preferiblemente durante 24 horas.

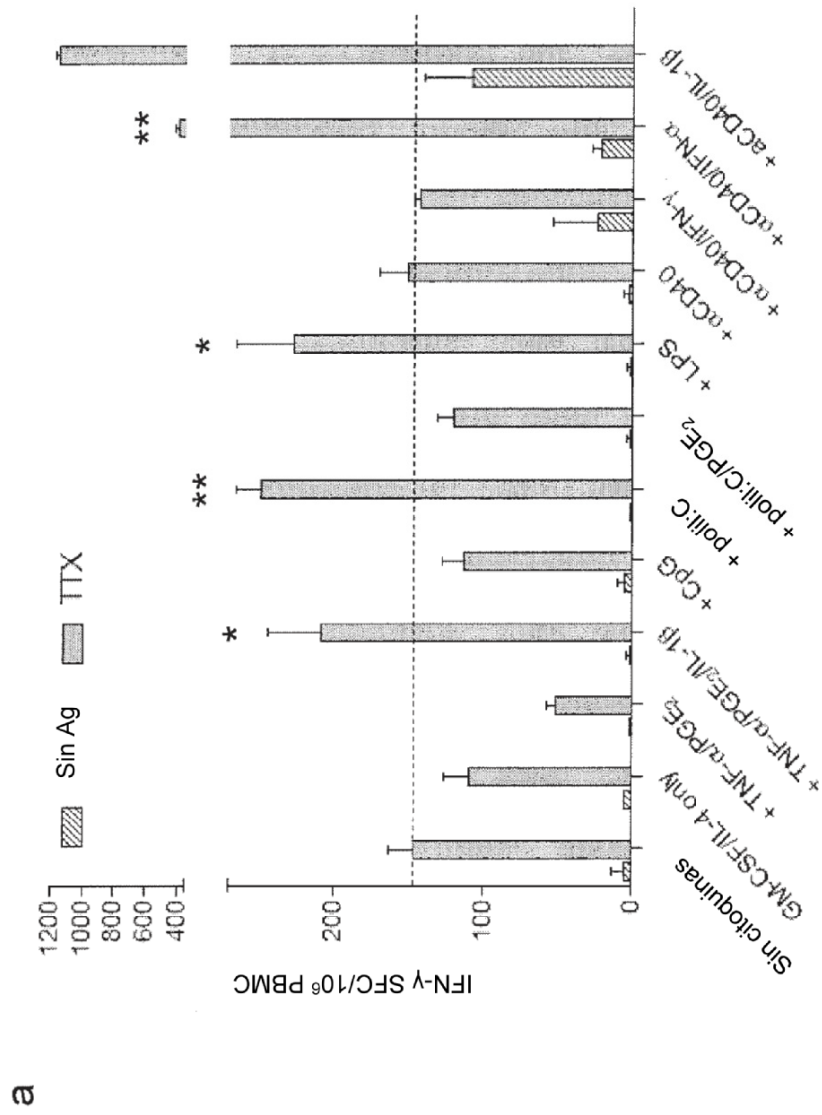


Figura 1

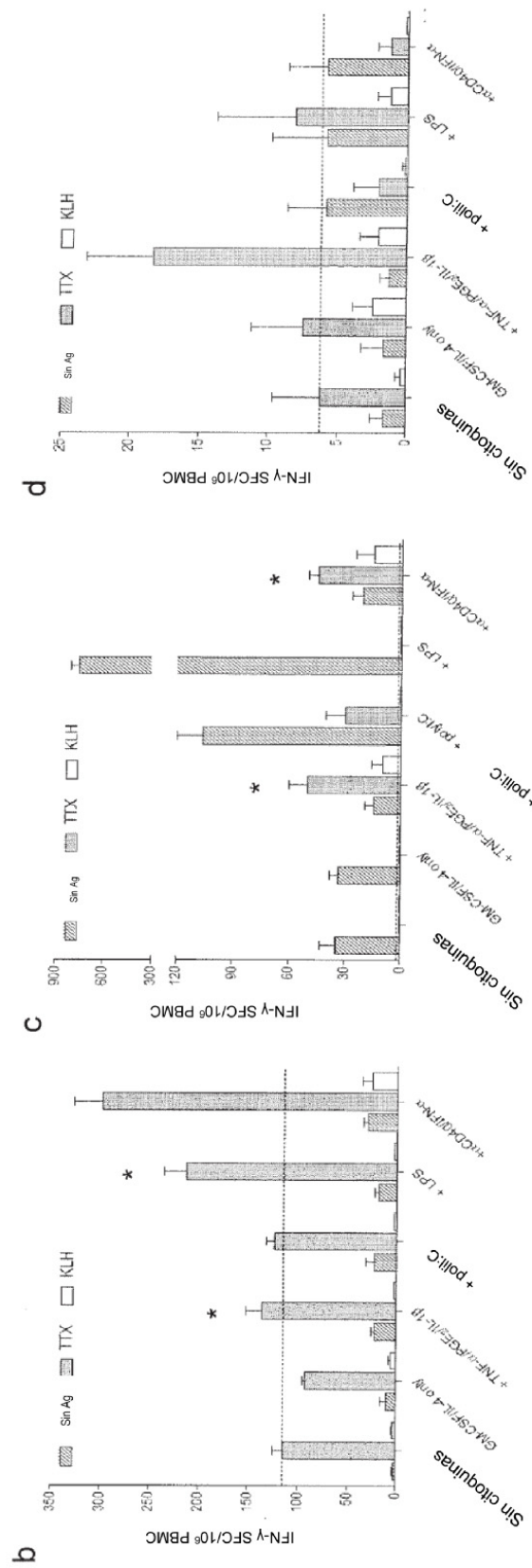


Figura 1

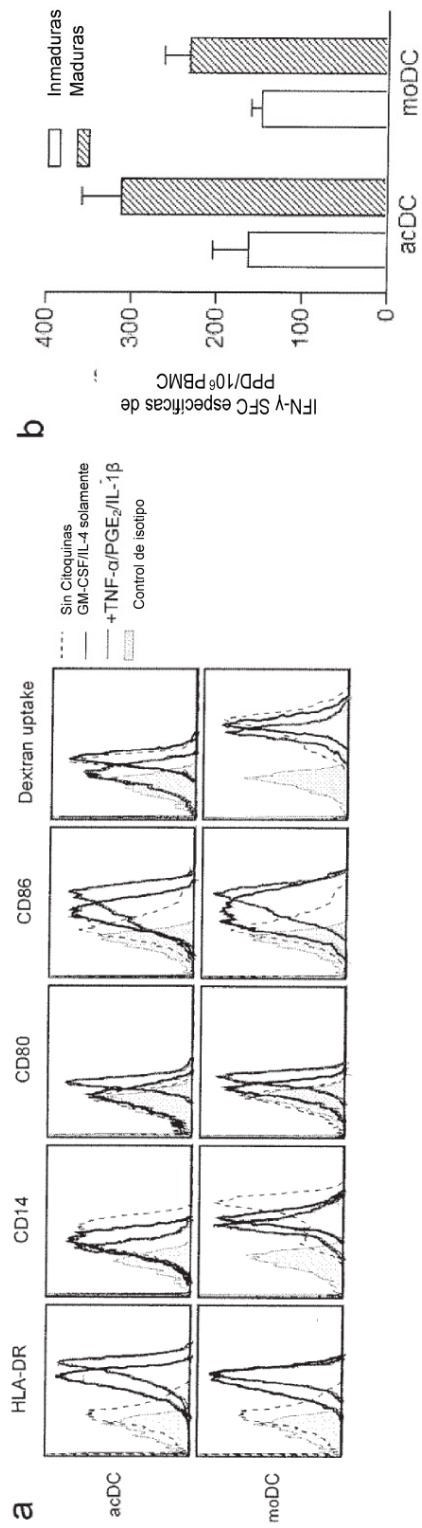


Figura 2

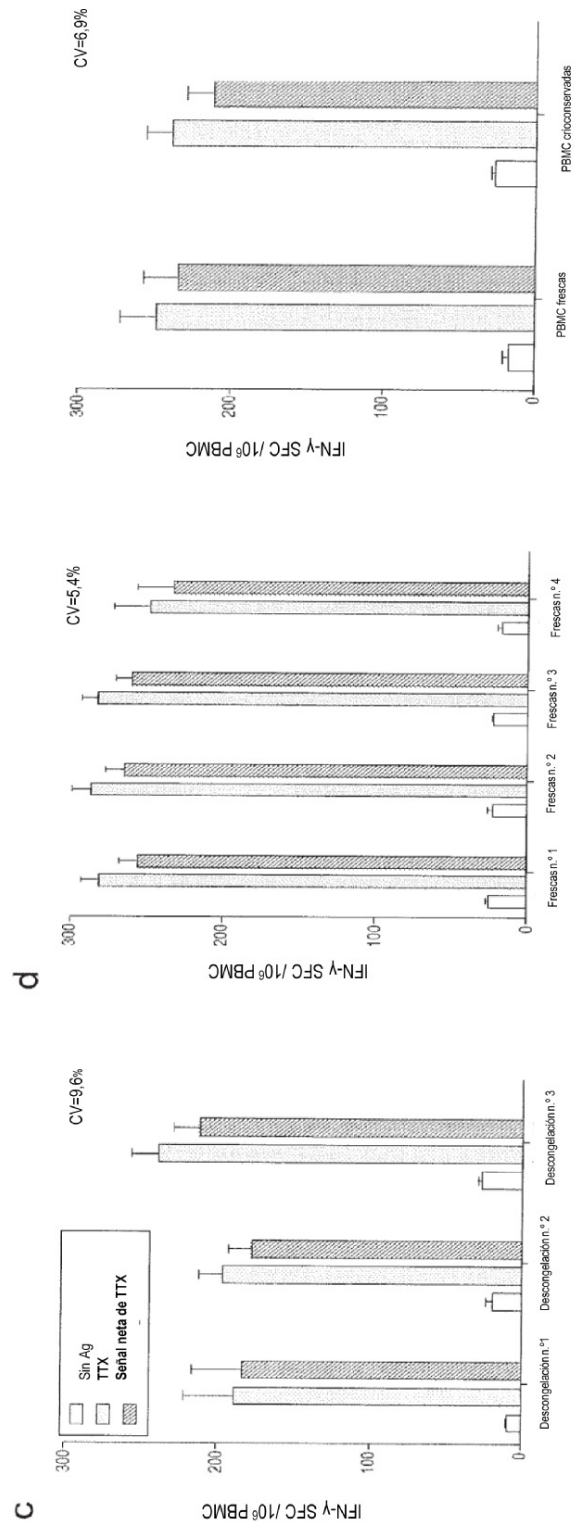


Figura 2

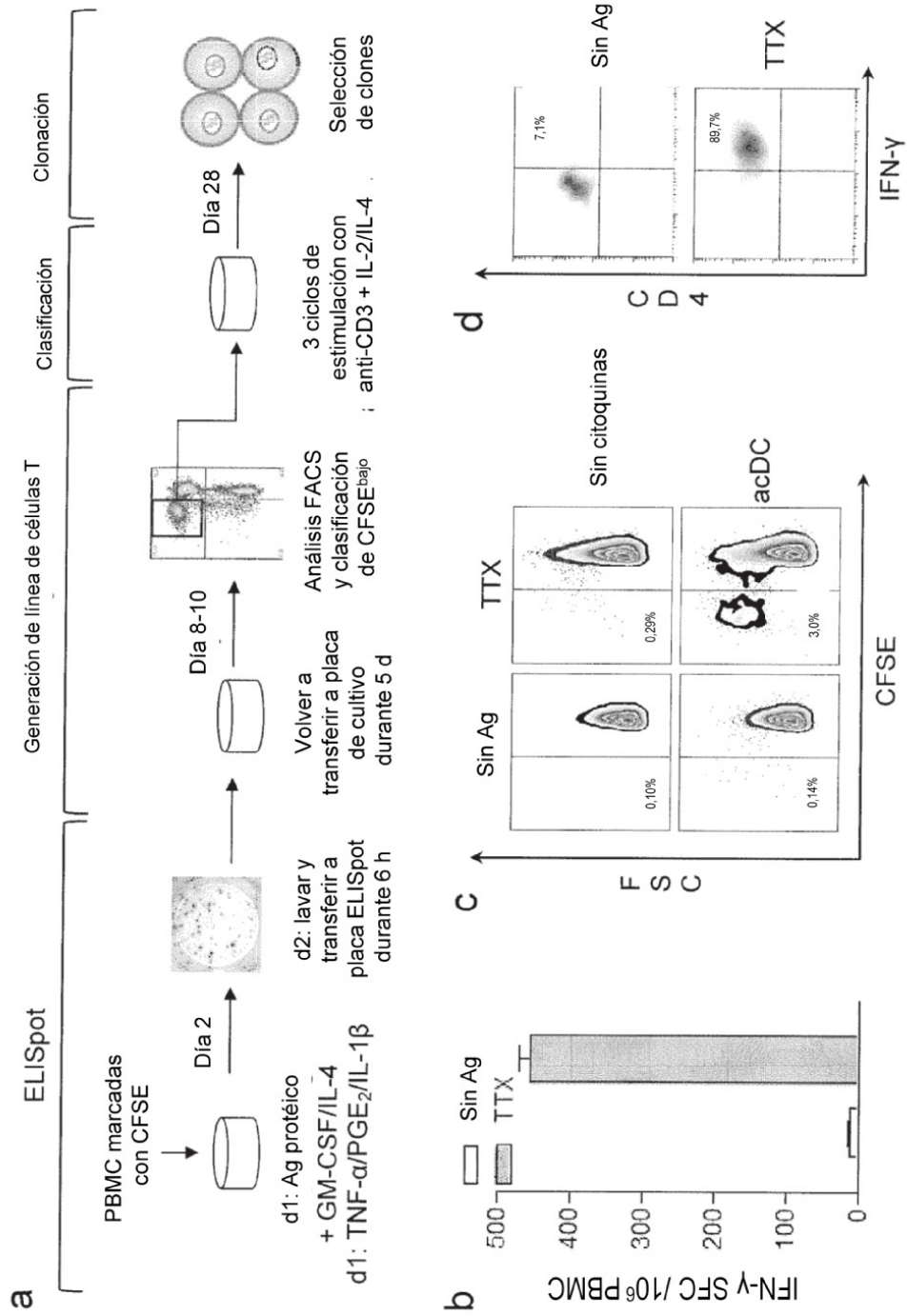


Figura 3

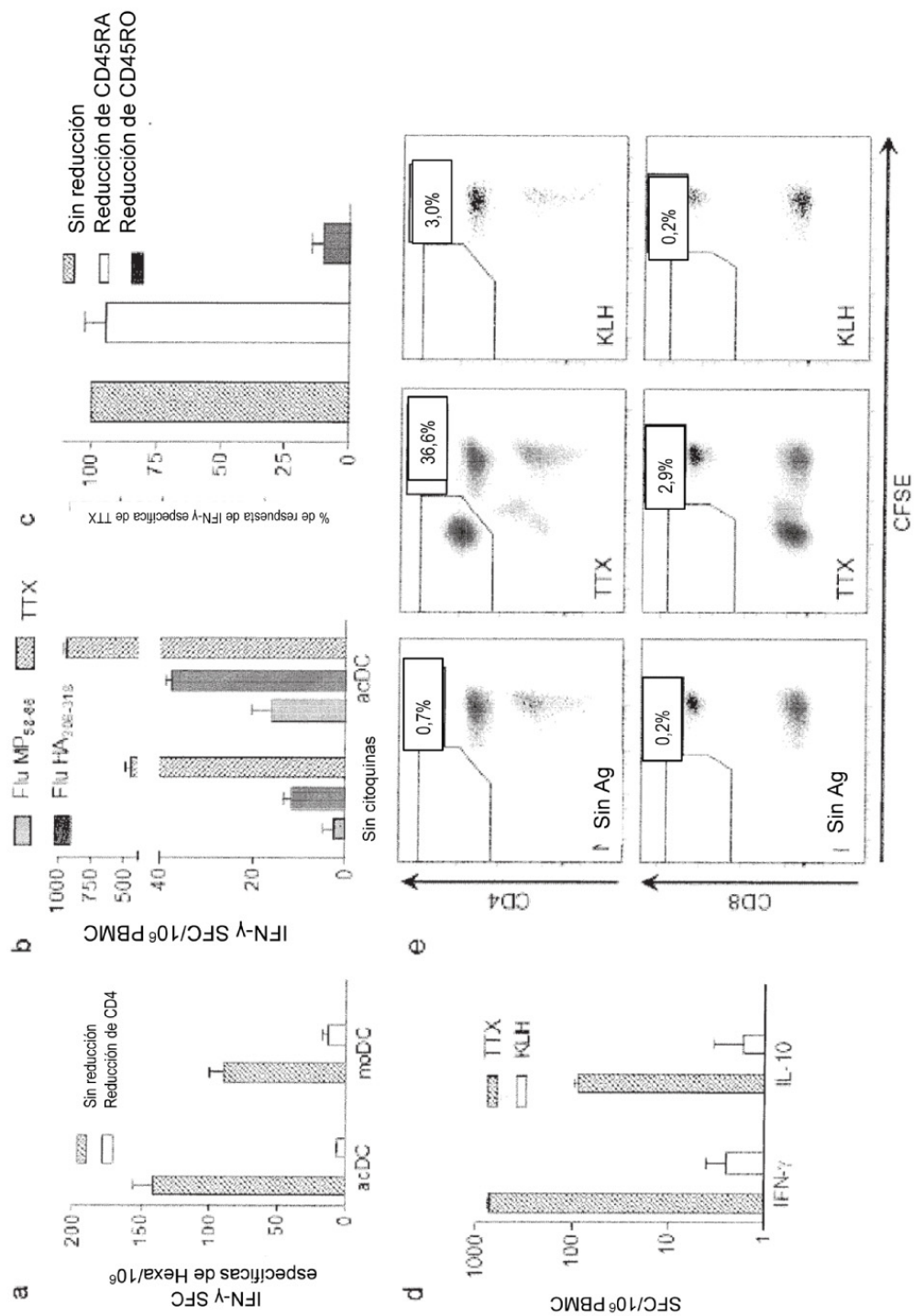


Figura 4

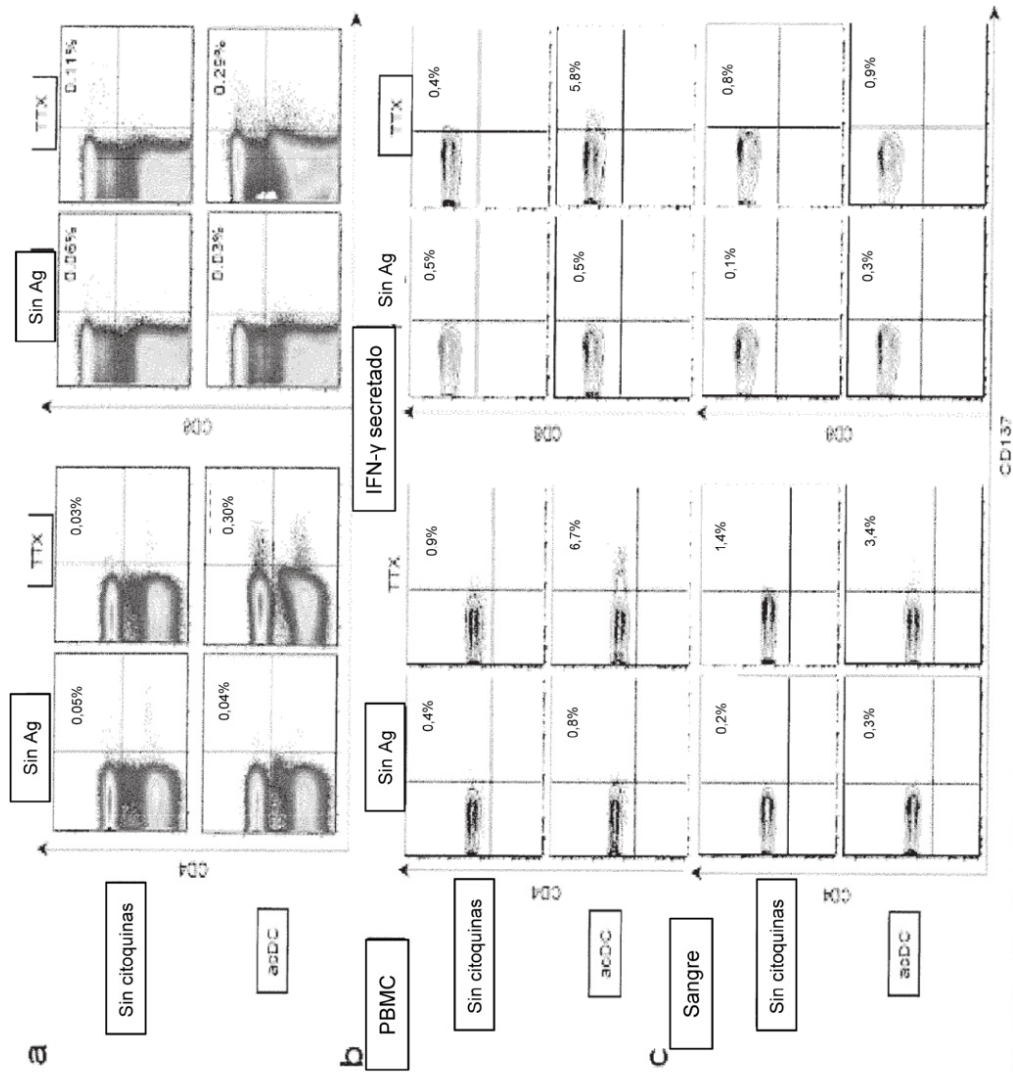


Figura 5

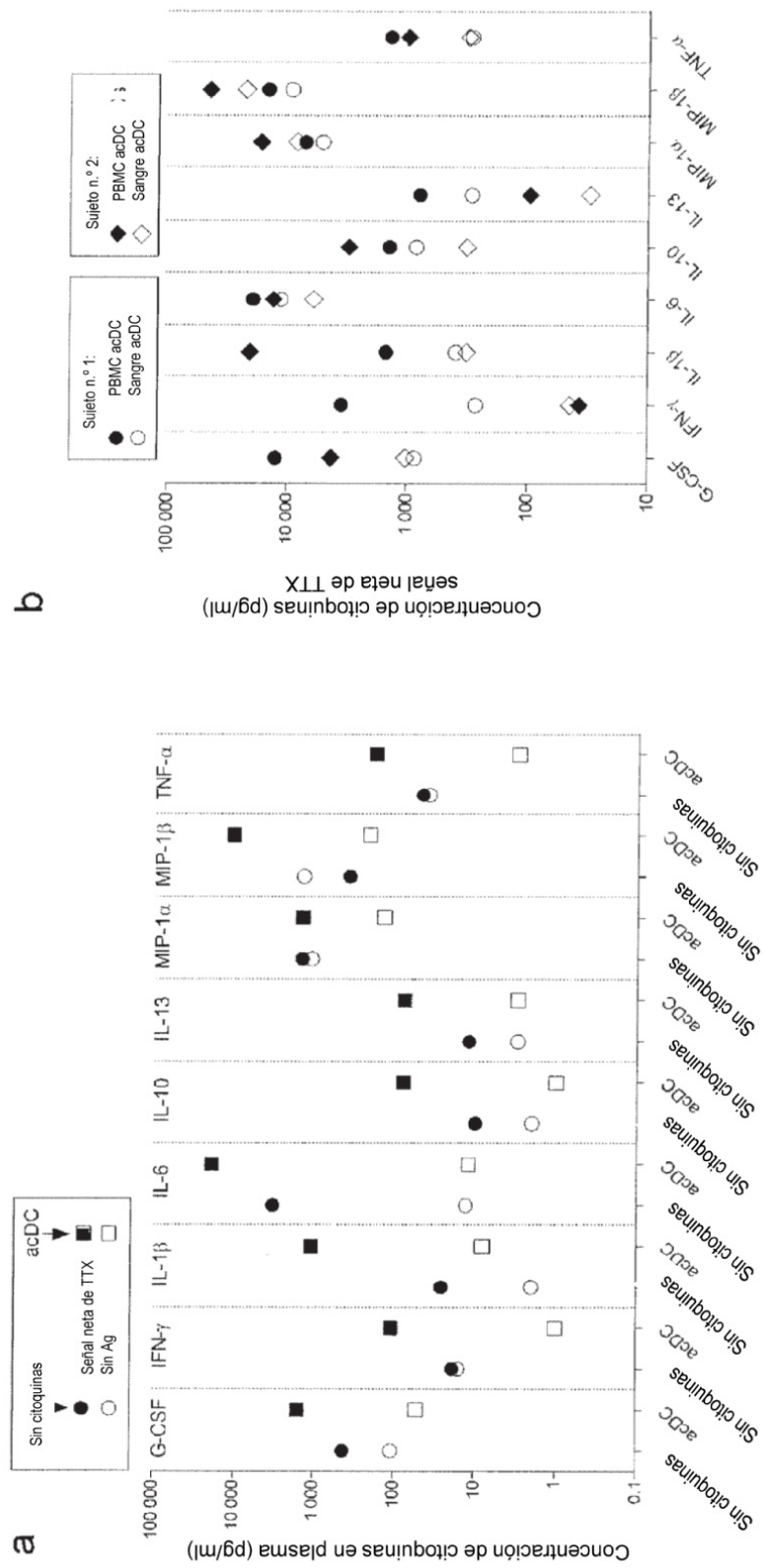


Figura 6

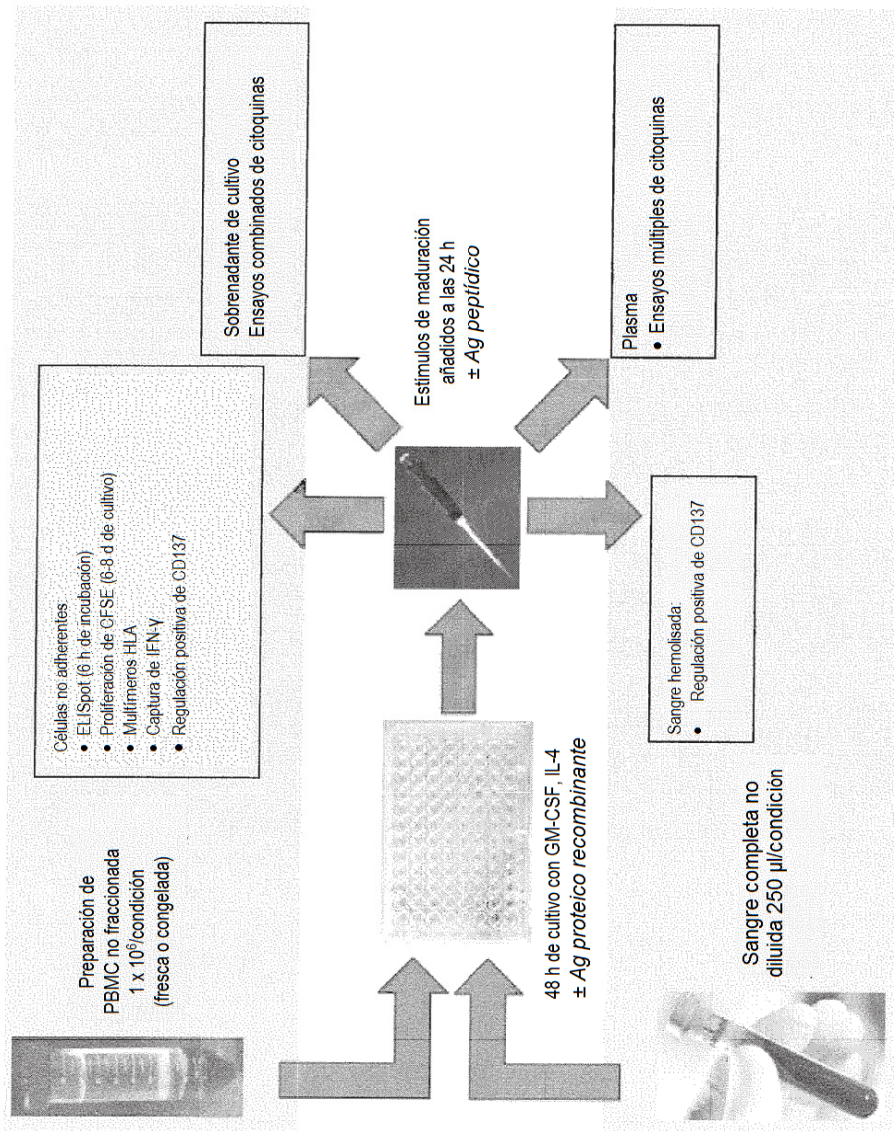


Figura 7

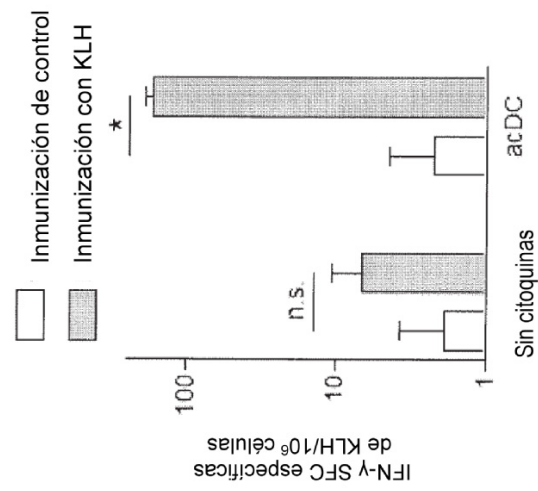


Figura 8

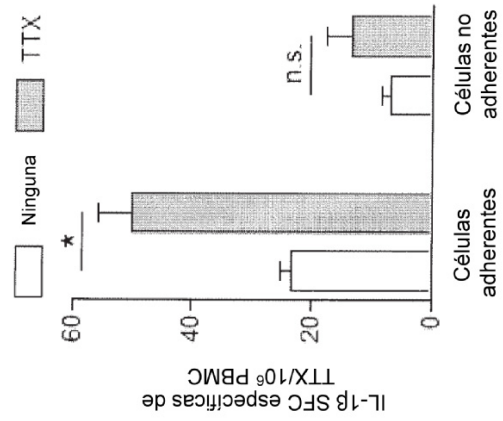


Figura 10

