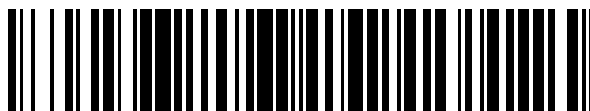


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 153**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2014 PCT/EP2014/058051**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2014 E 14718603 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2989459**

54 Título: **Métodos para estimular respuestas de células T específicas de antígenos**

30 Prioridad:

23.04.2013 EP 13305530

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

30.07.2018

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (PARIS V)
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MALLONE, ROBERTO y
AFONSO, GEORGIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 677 153 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

Métodos para estimular respuestas de células T específicas de antígenos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para estimular respuestas de células T específicas de antígeno.

5 Antecedentes de la invención

El estudio de las respuestas de células T específicas de antígeno (Ag) plantea desafíos técnicos formidables [Kern, Trends Immunol. 26:477, 2005]. Esto se debe principalmente al hecho de que las fracciones específicas de Ag se representan comúnmente a frecuencias muy bajas en la sangre periférica, una característica que hace que su detección sea problemática [Mallone, Clin. Immunol. 110:232, 2004]. Esta detección es incluso más problemática cuando se consideran células T CD4+, ya que estas fracciones están frecuentemente presentes a frecuencias incluso más bajas que sus homólogos CD8+ [Homann, Nat. Med. 7: 913, 2001; Seder, Nat. Immunol. 4:835, 2003]. Actualmente se encuentran disponibles varias estrategias de detección que permiten detectar tales células T específicas de Ag (CD4+ y CD8+) usando una variedad de lecturas estructurales o funcionales [Kern, Trends Immunol. 26:477, 2005]. Sin embargo, un inconveniente compartido por todas las técnicas es que las células T CD4+ específicas de Ag rara vez se pueden detectar directamente ex vivo. Más comúnmente, estas células necesitan expandirse preliminarmente a través de etapas de cultivo in vitro de 5-14 d para alcanzar el umbral de detección [Mallone, Clin. Immunol. 110:232, 2004]. Recientemente, se descubrió que es posible estimular las respuestas de células T específicas de Ag cocultivándolas con células dendríticas de diferenciación directamente de muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no fraccionadas o sangre periférica, usando cocteles de citoquina y condiciones de cultivo apropiadas (documento WO 2010/119033 y Martinuzzi, Blood 118: 2128, 2011). El método (denominado tecnología acDC), que proporcionó ventajas considerables, consiste en a) cultivar una muestra de sangre o PBMC en un medio que comprende GM-CSF e IL-4 en presencia de un antígeno, y luego b) madurar los DC con un cóctel de moléculas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, prostaglandina (PG)E2 e interleucina (IL)-1beta.

25 Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para estimular respuestas de células T específicas de antígeno. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han identificado en el presente que la etapa de diferenciación de la tecnología de acDC no es obligatoria y que es posible, con una interleuquina única (es decir, IL-1beta), estimular respuestas de células T específicas de Ag de una PBMC o muestra de sangre.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno (Ag) en una muestra de sangre o muestra de PBMC aislada de un sujeto que comprende la etapa que consiste en cultivar dicha muestra de sangre o PBMC en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad de IL-1beta y una cantidad de al menos un antígeno.

El término "PBMC" o "células mononucleares de sangre periférica" o "PBMC no fraccionadas", como se usa en el presente documento, se refiere a PBMC completas, es decir, a una población de glóbulos blancos que tienen un núcleo redondo, que no se ha enriquecido para un sub-población dada. Las células mononucleares de sangre del cordón umbilical se incluyen en esta definición. Típicamente, la muestra de PBMC según la presente descripción no se ha sometido a una etapa de selección para contener únicamente PBMC adherentes (que consisten esencialmente en > 90% de monocitos) o PBMC no adherentes (que contienen células T, células B, células asesinas naturales (NK), células T NK y precursores de DC). Una muestra de PBMC según la presente descripción contiene, por lo tanto, linfocitos (células B, células T, células NK, células NKT), monocitos y precursores de los mismos. Típicamente, estas células se pueden extraer de sangre completa usando Ficoll, un polisacárido hidrófilo que separa las capas de sangre, formando las PBMC un anillo celular bajo una capa de plasma. Además, las PBMC se pueden extraer de la sangre completa usando una lisis hipotónica que lisará preferentemente los glóbulos rojos. Tales procedimientos son conocidos por los expertos en la técnica.

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 ha sido aislada de un sujeto y recogida en tubos u otros recipientes que contienen un anticoagulante apropiado (por ejemplo, heparina de litio o citrato de sodio). La sangre del cordón umbilical se incluye en esta definición. La muestra de sangre es sangre entera 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 haya obtenido previamente y que se mantenga congelada hasta su uso.

El término "sujeto", como se usa en el presente 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 algunas realizaciones, dicho sujeto es un sujeto

humano. El sujeto de acuerdo con la presente descripción puede ser un sujeto saludable o un sujeto que padezca una enfermedad dada.

5 Se puede usar cualquier medio de cultivo adecuado para el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de PBMC. Típicamente, consiste en un medio base que contiene nutrientes (una fuente de carbono, aminoácidos), un tampón de pH y sales, que se puede complementar con suero de origen humano o de otro origen y/o factores de crecimiento y/o antibióticos a los que IL-1beta y el antígeno se agregan. Típicamente, el medio base puede ser medio RPMI 1640, DMEM, IMDM, X-VIVO o AIM-V, todos los cuales son medios estándar disponibles comercialmente.

10 En la realización de la presente descripción en la que se cultiva una muestra de sangre en lugar de una muestra de PBMC, es prescindible el uso de dicho medio de base, y se puede añadir IL-1beta y el antígeno directamente a la sangre, que sirve como medio de cultivo.

15 Una característica esencial de la presente descripción es que el medio de cultivo no contiene ningún agente diferenciador como se describe en el documento WO 2010/119033, es decir, el Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSF) y/o IL-4 y/o ligando de tirosina quinasa 3 (Flt-3) tipo FMS. Asimismo, dichos agentes no se agregan a la muestra de sangre.

De acuerdo con la presente descripción, la cantidad de IL-1beta se agrega directamente en la muestra una vez que se prepara (p. ej., Día 0 o Día 1, como se describe en los EJEMPLOS).

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

20 Como se usa en este documento, el término "IL-1beta" tiene su significado general en la técnica y se refiere a interleucina-1 beta. La dosis efectiva mínima de IL-1beta es de 10 ng/ml. Puede ser IL-1β purificada o recombinante. IL-1β está disponible comercialmente en diferentes compañías, por ejemplo, R & D Systems o PeproTech.

25 En algunas realizaciones, se puede añadir IL-1beta en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), prostaglandina E2 (PGE2), anticuerpos monoclonales anti-CD40 (mAb), proteínas quiméricas recombinantes del ligando CD40 (CD40L), interferón-alfa (IFN-α), interferón-gamma (IFN-γ), interleuquina-7 (IL-7), lipopolisacáridos (LPS), oligodesoxinucleótidos CpG, ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C), Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) e imiquimod. Se puede usar la combinación de tales agentes. Dicho(s) agente(s) son agentes conocidos por estimular la respuesta inmune, y la persona experta podrá seleccionar las concentraciones apropiadas.

30 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+.

35 El término "antígeno" ("Ag"), como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (p. ej., plásmidos de ADN) o preparaciones de tejidos o células capaces de provocar una respuesta de células T. En algunas realizaciones, dicho Ag es una proteína que puede obtenerse mediante tecnología de ADN recombinante o mediante purificación a partir de diferentes fuentes de tejidos o células. Dichas proteínas no están limitadas a las naturales, sino que también incluyen proteínas modificadas o construcciones quiméricas, obtenidas, por ejemplo, cambiando las secuencias de aminoácidos seleccionadas o fusionando porciones de proteínas diferentes. En otra realización de la presente descripción, dicho Ag es un péptido sintético, obtenido mediante procedimientos bioquímicos Fmoc, síntesis de péptidos multipin a gran escala, tecnología de ADN recombinante u otros procedimientos adecuados. En otra realización de la presente descripción, dicho Ag es una proteína o péptido codificado por un ADN u otra secuencia de ácido nucleico adecuada que se ha introducido en las células mediante transfección, transducción lentiviral o retroviral, transferencia de minigenes u otros procedimientos adecuados. En otra realización de la presente descripción, el Ag es una preparación de células o tejidos brutos (por ejemplo, células vivas o células/cuerpos apoptóticos) o una preparación de células o tejidos parcialmente purificada obtenida por diferentes procedimientos bioquímicos (por ejemplo, fijación, lisis, fraccionamiento subcelular, separación de gradiente de densidad) conocidos por los expertos en la técnica.

40 En algunas realizaciones, dicho Ag es una proteína que puede obtenerse mediante tecnología de ADN recombinante o mediante purificación a partir de diferentes fuentes de tejidos o células. Típicamente, dicha proteína tiene una longitud superior a 10 aminoácidos, preferiblemente superior a 15 aminoácidos, incluso más preferiblemente superior a 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 las secuencias de aminoácidos seleccionadas o fusionando porciones de proteínas diferentes.

55 En otra realización de la presente descripción, dicho Ag es un péptido sintético. Típicamente, dicho péptido sintético tiene una longitud de 3-40 aminoácidos, preferiblemente de 5-30 aminoácidos de longitud, incluso más preferiblemente de 8-20 aminoácidos de longitud. Los péptidos sintéticos pueden obtenerse mediante procedimientos bioquímicos Fmoc, síntesis de péptidos multipin a gran escala, tecnología de ADN recombinante u

otros procedimientos adecuados. Dichos péptidos no se limitan a los naturales, sino que también incluyen péptidos modificados, péptidos modificados postraduccionalmente o péptidos quiméricos, obtenidos, por ejemplo, cambiando o modificando las secuencias de aminoácidos seleccionadas o fusionando porciones de proteínas diferentes.

5 En otra realización de la presente descripción, dicho Ag es una proteína o péptido codificado por un ADN u otra secuencia de ácido nucleico adecuada que se ha introducido en las células mediante transfección, transducción lentiviral o retroviral, transferencia de minigenes u otros procedimientos adecuados. Las células receptoras pueden ser células de terceros (por ejemplo, líneas celulares obtenidas del mismo donante de PBMC/sangre o de donantes no relacionados) o las mismas células presentes en las PBMC no fraccionadas o muestras de sangre usadas para estimular respuestas de células T.

10 En otra realización de la presente descripción, el Ag es una preparación de tejido o célula (por ejemplo, células vivas o células/cuerpos apoptóticos) o una preparación de tejido o célula bruta o parcialmente purificada obtenida por diferentes procedimientos bioquímicos (por ejemplo, fijación, lisis, fraccionamiento subcelular, separación por gradiente de densidades) conocidos por los expertos en la técnica.

El experto en la técnica podrá seleccionar el Ag apropiado, dependiendo de la estimulación de células T deseada.

15 En algunas realizaciones, el método de la presente descripción comprende además una etapa que consiste en detectar células T estimuladas.

Los métodos para la detección de células T estimuladas son conocidos por las personas expertas. Los procedimientos que se describen a continuación proporcionan algunos ejemplos de métodos adecuados. Sin embargo, la persona experta en la técnica puede interpretar fácilmente que se puede usar cualquier método
20 adecuado para evaluar la estimulación de las células T en respuesta a un Ag.

En algunas realizaciones, dicho método puede consistir en un ensayo de inmunospot ligado a enzimas (ELISpot). Las células no adherentes de los pocillos de pre-cultivo se transfieren a una placa que ha sido recubierta con los anticuerpos de captura anti-citoquina deseados (Abs; por ejemplo, anti-IFN- γ , -IL-10, -IL-2, -IL-4). La revelación se
25 lleva a cabo con anticuerpos biotinilados secundarios y métodos de detección colorimétricos o fluorimétricos estándar tales como estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT-BCIP y las manchas son contadas. Las lecturas ELISpot se expresan entonces como células formadoras de manchas (SFC)/10⁶ PBMC.

En algunas realizaciones, dicho método puede consistir en un ensayo de citocina sobrenadante. Las citocinas liberadas en el sobrenadante del cultivo se miden mediante diferentes técnicas, tales como ensayos
30 inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), matriz de perlas citométricas BD, ensayos de multiplex de citoquinas de Biorad o Millipore y otros.

En algunas realizaciones, el método puede usar multímeros HLA Clase I o Clase II. Con este procedimiento, se detectan células T reactivas con Ag que reconocen epítopos específicos de péptidos, usando reactivos disponibles
35 en el mercado (por ejemplo, Pentámeros Prolimmune MHC Clase I, Clase II Ultimers o Immudex MHC Dextramers) o generados internamente, por ejemplo, desde el NIH Tetramer Facility en Emory University, EE. UU.; del Dr. S. Buus, Universidad de Copenhague, Dinamarca [Leisner et al, PLoSOne 3: e1678, 2008], del Dr. G.T. Nepom, Benaroya Research Institute, Seattle, EE. UU. [Novak et al, J. Clin. Invest. 104:R63, 1999].

En algunas realizaciones, el método se basa en la detección de la regulación por incremento de los marcadores de activación (por ejemplo, CD69, CD25, CD137). Con este procedimiento, las respuestas de células T específicas de
40 Ag se detectan por su expresión diferencial de marcadores de activación expuestos en la membrana después del reconocimiento de Ag.

En algunas realizaciones, el método puede consistir en un ensayo de captura de citocina. Este sistema desarrollado por Miltenyi Biotech es una alternativa válida al ELISpot para visualizar células T específicas de Ag según su respuesta a las citocinas. Además, permite la clasificación directa y la clonación de las células T de interés (ver a continuación).

45 En algunas realizaciones, el método puede consistir en un ensayo CD154. Este procedimiento ha sido descrito en detalle [Chattopadhyay et al, Nat. Medicina. 11:1113, 2005; Frensch et al., Nat. Med. 11: 1118, 2005]. Está limitado a la detección de células T CD4+ específicas de Ag.

En algunas realizaciones, el método puede consistir en un ensayo CD107. Este procedimiento [Betts et al., J. Immunol. Methods 281: 65, 2003] permite la visualización de células T CD8+ específicas de Ag con potencial
50 citotóxico.

En algunas realizaciones, el método puede consistir en un ensayo de dilución 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].

El método de la invención puede encontrar diversas aplicaciones.

Por ejemplo, el método de la presente descripción para estimular respuestas de células T específicas de Ag puede ser útil tanto para diagnosticar una enfermedad como para monitorizar los efectos inmunológicos de una terapia inmune en varios entornos.

5 Típicamente, en esas realizaciones, se usan al menos antígenos asociados a la enfermedad en el método de la presente descripción.

En algunas realizaciones, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes. Este grupo incluye, pero no se limita a, diabetes tipo 1 (T1D), granulomatosis con poliangeitis (previamente granulomatosis de Wegener), enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple. En otra realización de la presente descripción, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad del cáncer. Este grupo comprende, pero no se limita a, 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, pero no se limita a, enfermedades causadas por agentes infecciosos tales como M. tuberculosis, VIH, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de la gripe.

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

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

La expresión "monitorizar la terapia inmune", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la medición de cambios en las respuestas de células T inducidas en un sujeto dado después de la administración in vivo de agentes inmunomoduladores. Para las aplicaciones de monitoreo, se encuentran diferentes tipos de situaciones, de acuerdo con el tipo de enfermedad. En las enfermedades autoinmunes, pueden usarse terapias inmunomoduladoras para mitigar las respuestas inmunes patológicas. Una estrategia para lograr este resultado se basa en intervenciones no específicas de Ag basadas en una serie de agentes inmunomoduladores. Por ejemplo, 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, interleucina-2, anticuerpos monoclonales anti-CD3 (Herald 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), autotrasplante de células madre hematopoyéticas de no mieloablación (Voltarelli et al., *JAMA* 297: 1568, 2007), la infusión autóloga de células sanguíneas del cordón umbilical (Haller et al, *Diabetes Care* 32: 2041, 2009), las terapias adaptativas de células T reguladoras de la vitamina D, han sido, están o probablemente serán probadas para la prevención y/o intervención de T1D. Un segundo enfoque se basa en estrategias específicas de Ag, es decir, la administración de un Ag relacionado con la enfermedad en una forma tolerogénica. Por ejemplo, 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; Fournalos et al, *Diabetes* 60: 1237, 2011), péptidos derivados de (pro)insulina (Orban et al, *J. Autoimmun.* 34:408, 2010; Thrower et al., *Clin. Exp. Immunol.* 155: 156, 2009), GAD (Ludvigsson et al, *N. Engl. J. Med.* 359: 1909, 2008; Wherrett et al., *Lancet* 378: 319, 2011; Axelsson et al., *PLoS One* 6: e29008, 2011; Ludvigsson et al, *N. Engl. J. Med.* 366:433, 2012), NBI-6024 (Alleva et al., *Scand J. Immunol.* 63:59, 2006), DiaPep277 (Raz et al., *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23: 292, 2007) y combinaciones de los mismos, anti-CD3 en combinación con Ags de células β (Bresson et al, *J. Clin. Invest.* 116: 1371, 2006), carga de DC Ag in vitro o in vivo (Mukhopadhyaya et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 6374, 2008), multímeros de 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), L. lactis modificado transgénicamente para producir el Ag de interés (Takiishi et al, *J. Clin. Invest.* 122: 1717, 2012) han sido, están o probablemente serán evaluados para la prevención y/o intervención de T1D.

En el cáncer y las enfermedades infecciosas, la patogénesis no está impulsada por respuestas inmunes patológicas, sino más bien por células de los tejidos o agentes infecciosos que escapan al control del sistema inmune. Las respuestas inmunes contra el cáncer o las 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, solo 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, la administración (denominada vacunación) de Ag(s) relacionados con la enfermedad en una forma inmunogénica. Estos últimos enfoques pueden llevarse a cabo administrando Ag(s) solos o en combinación con diferentes agentes adyuvantes (por ejemplo, la administración de Ag asociada a tumores en el melanoma; Di Pucchio et al., *Cancer Res.* 66:4943, 2006; Peterson et al., *J. Clin. Oncol.* 21: 2342, 2003; Bystryon et al., *Clin. Cancer Res.* 7: 1882, 2001); administrando DC pulsado con el Ag (por ejemplo, infusión de DC pulsada por Ag asociada al tumor en melanoma; Palucka et al., *J. Immunother.* 26:432, 2003; Banchereau et al., *Cancer Res.* 61: 6451, 2001; Thurner et al., *J. Exp. Med.* 190: 1669, 1999) o mediante transferencia adoptiva de células T específicas de Ag asociadas a la enfermedad

(por ejemplo, infusión de células T específicas de Ag asociadas a tumor en melanoma; Vignard et al., J. Immunol. 175:4797, 2005).

Por lo tanto, es de interés terapéutico seguir los cambios inmunes inducidos por tal intervención. Las intervenciones exitosas deberían traducirse en una disminución (en el caso de las enfermedades autoinmunes) o un aumento (en el caso del cáncer y las enfermedades infecciosas) de las respuestas de las células T específicas de Ag relacionadas con la enfermedad. Tales cambios en las respuestas de células T específicas de Ag relacionadas con la enfermedad podrían ser cuantitativas (por ejemplo, cambio en la frecuencia de células T específicas de Ag) o cualitativas (por ejemplo, cambio en el fenotipo y/o función de tales células T). La disponibilidad de estos marcadores sustitutos inmunes de eficacia clínica puede ser de gran utilidad para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo: mejor selección de pacientes para tratar y agentes terapéuticos para usar basados en la respuesta inmune del paciente (por ejemplo, la 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 las dosis/frecuencia de administración si no se registra un cambio inmune), mejorando así la relación riesgo-beneficio; la estratificación pronóstica de los pacientes tratados según su probabilidad de responder al tratamiento; la decisión de si tratar nuevamente a los pacientes basándose en el mantenimiento o no de los cambios inmunes inducidos.

El método para estimular las respuestas de células T específicas de Ag de la presente descripción puede, por lo tanto, ser muy útil para monitorizar la inducción de estos cambios inmunes.

La expresión "antígenos asociados a la enfermedad (Ags)", como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas o péptidos que constituyen los objetivos moleculares de una respuesta inmune. Dichos objetivos moleculares se expresan por el(los) tejido(s) o célula(s) dirigidos por la respuesta inmune. La expresión de Ags asociada a la enfermedad puede limitarse al tejido diana o extenderse a compartimentos corporales adicionales. Los Ags asociados a la enfermedad pueden identificarse inicialmente como objetivos de respuestas inmunes de autoanticuerpos o células T, o en base a su expresión selectiva por el tejido diana. Algunos ejemplos de antígenos proteicos asociados a enfermedades son preproinsulina (PPI), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), proteína 2 asociada a insulinooma (IA-2), proteína relacionada con subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islote (IGRP), transportador de zinc 8 (ZnT8) y cromogranina A para T1D; mieloperoxidasa y proteinasa 3 para granulomatosis con poliangitis; glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y proteína básica de mielina (MBP) en la esclerosis múltiple; gliadinas en la enfermedad celíaca; tirosinasa, melan-A, MART-1, gp100 y NY-ESO-1 en cáncer de melanoma; ESAT-6 para infección por M. tuberculosis; mordaza para la infección del VIH; y proteína hexon para la infección por adenovirus.

Los ejemplos de Ags peptídicos asociados a enfermedad se derivan de la proteína Ags antes mencionada después del procesamiento por células presentadoras de Ag, incluyendo DC, y la presentación en el contexto de diferentes moléculas HLA de Clase I o Clase II. Por lo tanto, dichos péptidos Ags son diferentes dependiendo no solo de su fuente Ag, sino también de las moléculas HLA mediante las cuales se presentan. Por ejemplo, se puede encontrar una lista de Ags de péptidos asociado a T1D tanto para ratón como para humano en DiLorenzo et al., Clin. Exp. Immunol. 148:1, 2007. Los antígenos peptídicos asociados a enfermedad también incluyen secuencias de aminoácidos modificadas postraduccionalmente y secuencias derivadas de isoformas de corte y empalme alternativas.

La expresión "antígenos asociados a enfermedad" también se refiere a tejidos o células que constituyen los objetivos de una respuesta inmune. Los tejidos/células asociados a enfermedades pueden identificarse como objetivos de la enfermedad basándose en la fisiopatología y la presentación clínica de dicha enfermedad. Algunos ejemplos de tejidos/células asociados a enfermedad son células beta pancreáticas productoras de insulina para T1D; oligodendrocitos en la esclerosis múltiple; epitelio intestinal en la enfermedad celíaca; melanocitos malignos en el cáncer de melanoma; M. tuberculosis para la infección por tuberculosis; y VIH para la infección por el VIH.

La respuesta inmune montada contra los Ags asociados a la enfermedad puede ser patológica (es decir, en el caso de enfermedades autoinmunes) o fisiológica, potencialmente beneficiosa, dirigida a limitar las consecuencias de otro proceso patológico en curso (es decir, en el caso del cáncer o enfermedades infecciosas). En virtud de las respuestas inmunológicas patológicas o fisiológicas subyacentes a dichas enfermedades, la detección de tales respuestas se puede usar para diagnosticar estas enfermedades, o para seguir su evolución natural o terapéuticamente modificada. Al medir las respuestas de las células T específicas de Ag asociadas a la enfermedad, el método descrito en la presente memoria puede aplicarse, por lo tanto, tanto al diagnóstico inmune como a la monitorización (por ejemplo, estadificación inmune, seguimiento terapéutico) de dichas enfermedades.

La persona experta en la técnica sabrá cómo seleccionar Ags asociados a enfermedad apropiados. Tal selección se basa en una amplia gama de estrategias. Ejemplos de tales estrategias para Ags asociados a T1D se pueden encontrar 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; Scotto et al, Diabetes 2012; Scotto, Afonso et al., Diabetologia 2012. Las revisiones de tales estrategias para epítopos peptídicos asociados a T1D se pueden encontrar 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 presente descripción se refiere a su uso para el estudio in vitro de la inmunogenicidad (o tolerabilidad) de proteínas terapéuticas.

La expresión "proteínas terapéuticas", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos de proteínas o péptidos de cualquier longitud de aminoácidos que se administran o se planifica que se administren in vivo a sujetos humanos para lograr un efecto terapéutico. Los ejemplos de tales proteínas terapéuticas son, pero no se limitan a, Ags asociados a enfermedad (como se define anteriormente), anticuerpos de diferentes especies (en su forma nativa o parcialmente/totalmente humanizados), citocinas, hormonas o análogos de hormonas, factores de coagulación, enzimas, proteínas bacterianas o virales. Dichas proteínas no están limitadas a las naturales, sino que también incluyen proteínas modificadas o construcciones quiméricas, obtenidas, por ejemplo, cambiando las secuencias de aminoácidos seleccionadas o fusionando porciones de proteínas diferentes.

Sin pretender imponer ninguna teoría, existen dos entornos terapéuticos diferentes en los que la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas es relevante.

Una primera configuración terapéutica se refiere al uso de Ags asociado a enfermedad (como se define anteriormente) para la administración in vivo, con el objetivo de inducir un efecto tolerogénico (por ejemplo, en el caso de enfermedades autoinmunes) o un efecto inmunogénico (por ejemplo, en el caso del cáncer o enfermedades infecciosas). Es importante evaluar primero in vitro el potencial para lograr dicho efecto terapéutico deseado.

En otros entornos terapéuticos, el objetivo no es inducir respuestas inmunogénicas de ningún tipo a la proteína administrada, sino evitar tales respuestas para permitir que dicha proteína alcance el efecto terapéutico para el que está diseñada. Ejemplo de tales configuraciones incluyen, sin limitación, inmunoterapias basadas en citocinas, terapias de reemplazo hormonal y terapias de reemplazo 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 el montaje de respuestas inmunogénicas contra la proteína administrada, ya que esto sería contraproducente para lograr el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, efectos secundarios tales como síndromes de liberación de citocina o neutralización/degradación de la proteína terapéutica).

Otra aplicación del método de la presente descripción se refiere a su uso para el estudio in vitro de adyuvantes de vacunas de posible relevancia en entornos terapéuticos humanos.

El término "adyuvantes", como se usa en el presente documento, se refiere a agentes farmacológicos o inmunológicos que mejoran la inmunogenicidad de una vacuna mejorando la cantidad (es decir, frecuencia de células inmunes que responden) o la calidad de la respuesta inmune (por ejemplo, polifuncionalidad de las células T que responden) definida como la capacidad de dichas células T para producir múltiples citocinas y/o ejercer múltiples funciones efectoras, citotoxicidad contra células diana que presentan los Ag afines, y/o avidéz funcional, definida como la fuerza de reconocimiento de los Ag afines por células T y la magnitud de las funciones efectoras resultantes de tal reconocimiento). La tecnología descrita se puede usar para definir in vitro la cantidad y/o calidad de respuestas de células T provocadas por la estimulación con Ag en presencia de dichos adyuvantes.

Sin pretender imponer ninguna teoría, los ejemplos de adyuvantes de vacunas incluyen ligandos del receptor tipo toll, citocinas, compuestos bacterianos, toxinas o toxoides (es decir, toxinas desprovistas de efectos tóxicos).

Las tecnologías descritas pueden usarse de manera similar para definir el potencial in vitro para un efecto tolerogénico in vivo de agentes que pueden atenuar la respuesta a Ag(s) dados. Dichos agentes pueden ser relevantes para aplicaciones in vivo, donde el(los) Ag(s) se administran para atenuar en lugar de para estimular respuestas inmunes contra dichos Ag(s), p.ej. en enfermedades autoinmunes o de injerto contra huésped.

Sin pretender imponer ninguna teoría, los ejemplos de agentes tolerogénicos incluyen citocinas inmunomoduladoras tales como IL-10 o el factor de crecimiento transformante (TGF) -beta o proteínas quiméricas que interactúan con receptores coestimuladores negativos tales como Ag Citotóxico T-Linfocito (CTLA)- 4-Ig o antagonista del receptor de IL-1.

Otra aplicación del método de la presente descripción es su uso para el descubrimiento de Ag o epítomos (también conocido como "mapeo"), es decir, para seleccionar Ags y epítomos con el fin de seleccionar aquellos que provocan una respuesta de células T específicas de Ag.

El término "epítomo", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de una proteína Ag reconocida por una célula T. Los epítomos son péptidos de diferente longitud de aminoácidos que se pueden unir a las moléculas de clase I o clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El complejo péptido-MHC así formado puede ser reconocido por el receptor de células T (TCR) expresado en las células T, lo que conduce a la activación de las células T y al montaje de respuestas de células T específicas de Ag del epítomo.

Como Ags y epítomos son los objetivos moleculares definidos de las células T, a menudo es relevante identificar con precisión tales objetivos para diseñar proteínas o péptidos apropiados para aplicaciones in vitro (p. ej., detección de respuestas de células T específicas de Ag para diagnóstico, pronóstico o con fines terapéuticos) o para la administración in vivo (por ejemplo, terapias tolerogénicas basadas en Ag o en epítomos en enfermedades

autoinmunes, o vacunas basadas en Ag o epítomos en cáncer y enfermedades infecciosas). Además, la definición de reglas comunes que rigen la unión de epítomos a una molécula de MHC dada (p. ej., HLA-A2, A*02:01; o HLA-DR4, DR*04:01) y/o el desencadenamiento de la señalización de TCR y la activación de células T a menudo se persigue con el objetivo de desarrollar algoritmos computarizados capaces de predecir el comportamiento de un epítomo dado. El desarrollo de tales algoritmos frecuentemente requiere la disponibilidad de grandes conjuntos de datos experimentales.

Dicho candidato Ag también pueden ser tejido(s) o célula(s) dirigidos por una respuesta inmune o cualquier tipo de célula revestida, cargada u obligada a expresar Ags o epítomos candidatos mediante técnicas bioquímicas o de biología molecular conocidas por los expertos en la materia.

Todavía otra aplicación del método de la presente descripción se refiere a su uso para producir células T policlonales y líneas de células T o clones que reconocen un Ag dado o una combinación de Ags. Por consiguiente, la presente descripción se refiere a un método para producir células T que muestran propiedades inmunológicas específicas de un sujeto que comprende las etapas que consisten en realizar el método de la presente descripción y aislar al menos una célula T que presenta al menos una propiedad inmunológica específica. Dichas propiedades inmunológicas específicas incluyen, pero no se limitan a, el reconocimiento por las células T aisladas del Ag agregado durante la etapa a) y/o b). A modo de ejemplo, dichas propiedades inmunológicas específicas también pueden incluir la producción de IFN- γ o la capacidad de ejercer efectos citotóxicos sobre las células que presentan el Ag reconocido. Las células T que producen IFN- γ o que exhiben citotoxicidad pueden ser útiles, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer y enfermedades infecciosas. A modo de ejemplo, otra posible propiedad inmunológica específica puede ser la producción de IL-10. Las células T que producen IL-10 se pueden usar como células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

El experto en la técnica está familiarizado con los métodos para expandir dichas células T específicas de Ag una vez aisladas de una muestra de sangre o una muestra de PBMC, según sea necesario. Se pueden encontrar ejemplos de tales métodos 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.

El experto en la técnica también está familiarizado con métodos adecuados para aislar dichas células T específicas de Ag en un estado viable basado en diferentes propiedades inmunológicas. Por ejemplo, la selección de células T productoras de IFN- γ o IL-10 se puede obtener mediante ensayos de captura de citocina 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]. Como otro ejemplo más, dichas células T pueden aislarse por medio de multímeros MHC de Clase I o Clase II [Mallone et al., *Diabetes* 53: 971, 2004; Mallone et al., *Blood* 106: 2798, 2005; Skowera et al., *J. Clin. Invest.* 118:3390, 2008; Ladell et al., *Immunity* 38: 425, 2013].

La presente descripción se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1. IL-1 β es el ingrediente mínimo crítico para amplificar respuestas de células T de IFN- γ específicas de proteína. (A) PBMC frescas no fraccionadas (10^6 /pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos) se cultivaron en presencia (barras negras) o ausencia (barras blancas) de TTX y de diferentes combinaciones de citocinas añadidas en el día 0 (GM-CSF/IL-4, IL-4, GM-CSF, sin citoquinas o Flt3L, como se indica), luego el día 1, es decir, después de las primeras 24 h (TNF- α , PGE $_2$, 10 ng/ml de IL-1 β y combinaciones de los mismos, como se indica, donde "Todos" significa TNF- α /PGE $_2$ /IL-1 β).

Todas las condiciones también recibieron IL-7 (0,5 ng/ml) el día 1. Al final de estas 48 h, se realizó un ELISpot de IFN- γ de 6 h según se detalla en Métodos. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados en tres donantes diferentes, con resultados expresados como IFN- γ SFC/ 10^6 PBMC. Se muestran las medias \pm SE del pocillo por triplicado. La línea de puntos indica respuestas de IFN- γ específicas de TTX obtenidas en ausencia de citocinas. (B) Resumen de los resultados obtenidos en 3 donantes diferentes y expresados como números de respuestas de IFN- γ específicas de TTX en comparación con la condición "sin citocinas". Cada barra representa la media \pm número de respuestas de SE de los 3 experimentos, donde los valores de cada experimento individual se basaron en la sustracción basal (es decir, las respuestas TTX netas después de la resta de las respuestas en ausencia de Ag). *p <0,05; **p <0,01. (C) La estimulación con PBMC se realizó como antes en ausencia de citoquinas, con o sin la adición de un anticuerpo bloqueante anti-IL1 β en el día 0. La representación de los datos es la misma que para el panel A y los resultados se refieren a un experimento representativo realizado en tres ocasiones distintas.

Figura 2. Una dosis de IL-1 β de 10 ng/ml añadida en el día 0 o en el día 1 es suficiente para amplificar las respuestas de células T de IFN- γ específicas de la proteína Ag. (A) Se estimularon PBMC recientes no fraccionadas como en la Figura 1A en presencia (barras negras) o ausencia (barras blancas) de TTX, sin una adición adicional de ninguna citocina, GM-CSF/IL-4 (día 0) seguido de TNF- α /PGE $_2$ /IL-1 β /IL-7 (día 1) añadido o IL-1 β solo (10 ng/ml) en el

día 0 o en el día 1. Al final de estas 48 h, se realizó un ELISpot de IFN- γ de 6 h según se detalla en Métodos. Se muestra un experimento representativo de 9 realizados en 9 donantes diferentes, con medias \pm SE de pocillos por triplicado. (B) Resumen de los resultados obtenidos en 9 donantes diferentes y expresados como número de respuestas de IFN- γ específicas de TTX en comparación con la condición "sin citocinas". La representación de los datos es como para la Figura 1B. *p < 0,05. (C) Resumen de los resultados obtenidos en 5 donantes diferentes que comparaban diferentes concentraciones de IL-1 β añadidas en el día 0 o en el día 1. La representación de datos es como para la Figura 2B. *p = 0,06 comparado con GM-CSF/IL-4 + Todos.

Figura 3. Una dosis de IL-1 β de 10 ng/ml añadida en el día 0 es suficiente para expandir las células T CD8+ específicas de Ag del epítipo. Se estimularon PBMC frescas no fraccionadas (10^6 /pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos) de un donante sano HLA-A2+ (HLA - A* 02:01) en presencia o ausencia de péptido Flu MP58-66 de restricción de HLA-A2, con la adición adicional de los cócteles de citocina indicados (donde "Todos" significa TNF- α /PGE₂/IL-1 β /IL-7), como se detalla en Métodos. Estos cultivos se tiñeron el día 10 con HLA-A2 TMr cargado con péptido Flu MP58-66. Se muestran los eventos seleccionados en células CD8+ negativas a CD14/CD19/CD4 viables y se dan los porcentajes de células TMr+ fuera de la población total de CD8+. Los resultados se refieren a un experimento representativo realizado tres veces.

Figura 4. La estimulación con IL-1 β expande de manera eficiente tanto la memoria como las células T CD8+ específicas del epítipo naive. (A) PBMC frescas no fraccionadas (10^6 /pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano) de un donante sano HLA-A2+ (HLA-A * 02:01) se estimularon en presencia de Flu MP₅₈₋₆₆ con restricción de HLA-A2 o péptido Melan-A₂₆₋₃₅ELA, con la adición adicional de los cócteles de citoquina indicados (donde "Todos" significa TNF- α /PGE₂/IL-1 β /IL-7), como se detalla en Métodos. Estos cultivos se tiñeron el día 10 con HLA-A2 TMr cargados con péptido Flu MP₅₈₋₆₆ o Melan-A₂₆₋₃₅ELA, como se indicó. Cada condición se tiñó con Flu y Melan-A TMr para controlar la especificidad de Ag de la expansión. Las PBMC teñidas con estos TMr directamente ex vivo se representan para comparar en la última fila. Se muestran los eventos seleccionados en células CD8+ CD14/CD19/CD4-negativas viables y se dan porcentajes de células TMr+ fuera de la población total de CD8+ para cada gráfica. La mediana de la intensidad de fluorescencia de la puerta TMr+ está indicada adicionalmente para algunas gráficas. Los resultados se refieren a un experimento representativo realizado tres veces. (B) Las células TMr+ de cultivos estimulados con IL-1 β se clasificaron por células individuales y se expandieron como se detalla en Métodos. Se muestran clones CD8+ representativos obtenidos al final de esta expansión. Para la expansión específica de Melan-A, 11,7% (14/120) de los pocillos sembrados produjeron crecimiento visible, con 100% (14/14) de ellos analizando Ag-específico por tinción de Melan-A₂₆₋₃₅ELA TMr. La tinción con un TMr HLA-A2 cargado con un péptido irrelevante se muestra para un mayor control.

Figura 5. IL-1 β no induce ninguna diferenciación significativa de DC. Se estimularon PBMC frescas no fraccionadas (10^6 /pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano) durante 48 h en presencia de los cócteles de citoquina indicados: GM-CSF/IL-4, Flt3L o IL-1 β (10 ng/mL) en el día 0, seguido de TNF- α /PGE₂/IL-1 β /IL-7 ("Todos") en el día 1 en el caso de GM-CSF/IL-4 y Flt3L.

Al final de este cultivo de 48 h, se recuperaron las células adherentes y se tiñeron para los marcadores indicados. Los perfiles de expresión para cada cóctel de citocinas se muestran (perfiles continuos) en comparación con los obtenidos en ausencia de citocinas (los mismos anticuerpos usados, perfiles de puntos) y después de la tinción con anticuerpos de control de isotipo (perfiles discontinuos). Los histogramas están bloqueados en células CD19/CD3 negativas viables. Los resultados se refieren a un experimento representativo de tres independientes.

Ejemplo 1:

Métodos:

Antígenos

El toxoide tetánico (TTX; Statens Serum Institut) fue > 99% puro y tenía una concentración de endotoxina < 0,035 EU/ μ g por ensayo de lisado Limulus (Lonza). Los péptidos de la proteína de la matriz de la gripe (MP)₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL), el antígeno del melanoma (Melan-A)₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), Melan-A₂₆₋₃₅ELA (ELAGIGILTV) tenían una pureza > 85% (ChinaPeptides).

Estimulación acelerada de células dendríticas co-cultivadas (acDC)

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se usaron frescas como se describe previamente^{1,2}. El día 0, las PBMC se pusieron en placas a 10^6 /100 μ l/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos con medio AIM-V (Invitrogen) y las siguientes citoquinas se añadieron o no en diferentes combinaciones como se detalla en las leyendas de la figura: granulocitos/factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF; 1000U/ml; R & D Systems), interleucina (IL)-4 (500 U/ml; R&D), ligando de tirosina quinasa-3 tipo Fms (Flt3L; 50 ng/ml; R&D). Se añadieron antígenos proteicos (4-40 ng/ μ L) al mismo tiempo en concentraciones ajustadas de acuerdo con las respuestas de cada donante. En experimentos seleccionados, se añadió un anticuerpo bloqueante anti-IL1 β (clon AS10; R & D) a 10 μ g/ml desde el inicio del cultivo, como se detalla en las leyendas de la figura. Después de 24 horas (es decir, el día 1), se agregaron los siguientes reactivos en diferentes combinaciones, como se detalla en las leyendas de la figura: factor de necrosis tumoral (TNF)- α (1000 U/ml; R&D), IL-1 β (10-50-100 ng/ml; R&D), IL-7 (0,5

ng/ml; R&D), IL-2 (0,5 U/ml; Proleukin), prostaglandina E2 (PGE₂; 1 µM; Merck Calbiochem). Cuando se usaron, se añadieron antígenos peptídicos cortos (es decir, cortados a la longitud óptima para la unión directa a la molécula de HLA-A2 de restricción) en el día 1, a concentraciones (0,06-10 µM) individualmente valoradas para cada donante. El día 2 (es decir, 48 horas después del inicio del cultivo), las células no adherentes se recogieron, lavaron y analizaron. En algunos experimentos, las células adherentes se recuperaron para el análisis por citometría de flujo de la diferenciación de DC (véase a continuación).

Inmunospot ligado a enzimas (ELISpot)

Los ensayos de interferón (IFN)-γ ELISpot se realizaron como se describió previamente³. Brevemente, se recubrieron placas de PVDF de 96 pocillos (Millipore) durante la noche con un anticuerpo anti-IFN-γ (U-Cytech). Las placas se lavaron y se bloquearon con RPMI (Invitrogen) suplementado con suero humano inactivado por calor al 10% (PAA). Al final de las 48 horas de estimulación con acDC, las células no adherentes se lavaron, se resuspendieron en medio AIM-V recién preparado y se sembraron en placas de ELISpot recubiertas a 10⁵ células/pocillo en pocillos por triplicado. Después de una incubación de 6 horas a 37°C y CO₂ al 5%, las placas se lavaron y el IFN-γ detectado se reveló con un anticuerpo anti-IFN-γ conjugado con biotina (U-Cytech), extravidina conjugada con fosfatasa alcalina y tabletas de SigmaFast 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolio (BCIP/NBT) (ambos de Sigma). Los puntos se contaron en un lector Bioreader 5000 Pro-SF (BioSys) y se calcularon los pocillos por triplicado. Las lecturas ELISpot se expresan como células formadoras de manchas (SFC)/10⁶ PBMC. El valor de corte para una respuesta positiva se estableció en 3SD por encima de la actividad basal promedio (es decir, en ausencia de antígeno). Estas respuestas de fondo espontáneas se muestran en cada gráfico o se restan de las respuestas específicas del antígeno (Ag).

Expansión de células T CD8+ y análisis de tetrámero de clase I Ag (HLA) en leucocitos humanos

Después de 48 horas de estimulación con acDC, se añadió suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS, por sus siglas en inglés, PAA) a cada pocillo. Cada 2-3 días, la mitad del medio se reemplazó con RPMI fresco suplementado con 10% de SFB. El día 10 después del inicio de la estimulación de acDC, las células no adherentes se recuperaron y se tiñeron con tetrámeros de HLA-A2 marcados con ficoeritrina (PE) (TMRs) cargados con Flu MP₅₈₋₆₆, Melan-A₂₇₋₃₅ o Melan-A₂₆₋₃₅ELA. Para este fin, las células se incubaron a ~ 0,5-1x10⁶ células/200 µL en una solución de dasatinib 50 nM durante 30 min a 37°C, se lavaron y se hicieron reaccionar con TMRs durante 20 min a temperatura ambiente (RT). Se añadió una premezcla de anticuerpos contra CD14/CD19 (PerCP-Cy5.5), CD4 (Alexa-700 o APC) y CD8 (APC o Alexa-700) durante 15 minutos a 4°C, después de lo cual las células se incubaron con LiveDead Aqua (Invitrogen/Molecular Probes) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 3,2% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa. Para el análisis de tinción TMR, las células fueron la primera puerta en las células vivas, luego en los eventos negativos CD14/CD19 y en los CD4 negativos/CD8+.

Clonación de células T

Para los experimentos de clonación de células T, las células se tiñeron con TMR el día 10-12 como se indicó anteriormente y las células CD8+ TMR+ individuales se clasificaron en cada pocillo de una placa con fondo en U de 96 pocillos utilizando un BD FACSAria II equipado con láseres de 488, 633 y 405 nm. Cada pocillo contenía una mezcla de 2x10⁵ células de alimentación de PBMC irradiadas a 5.000 rad de 3 donantes diferentes en medio RPMI de 100 µL suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 2 µg/ml de Fungizona, 5 % de Cellkine (Zeptomatrix), 200 U/ml de IL-2, 25 ng/ml de IL-15 (R & D) y 1 µg/ml de PHA-L. Se verificó visualmente el crecimiento de las placas después de 1-2 semanas y se transfirieron a placas de 48 pocillos para probar la especificidad de Ag por tinción de TMR y para una expansión adicional.

Fenotipado DC y agotamiento

Después de 48 horas de estimulación con acDC, las células adherentes se recuperaron y se tiñeron con anticuerpos anti-CD19, -CD80, -CD86, -HLA-DR, -CD14, -CD11c y con el marcador de viabilidad LiveDead. Para los análisis de DC, la puerta está en las células negativas CD19/CD3 vivas.

Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron con los softwares GraphPad Prism 5 y Flow Jo. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student emparejada o la prueba de rango con signo de Wilcoxon según la distribución.

Resultados:

En conjunto, los datos proporcionados muestran que IL-1beta es el ingrediente crítico mínimo necesario para la amplificación eficiente de respuestas de células T específicas de Ag utilizando los cultivos de acDC previamente descritos, en los que las DC se diferencian in situ de las PBMC en dos pasos: a) GM-CSF/IL-4 o Flt3L agregados en el día 0; y b) cócteles de TNF-alfa, PGE₂, IL-1beta e IL-7 u otras citoquinas añadidas en el día 1. Los análisis combinatorios de cócteles en los que se omiten diferentes ingredientes indican que se obtienen resultados similares o mejores cuando se usa IL-1beta solo (Fig. 1). En otras palabras, la IL-1 beta sola es suficiente para amplificar

respuestas de células T específicas de Ag en comparación con cultivos de PBMC llevados a cabo en ausencia de citoquinas (Figura 1A-B). Esta amplificación mediada por IL-1 beta tiene lugar también en condiciones no manipuladas, porque el bloqueo de IL-1 beta en PBMC cultivadas con Ag y en ausencia de citoquinas disminuye las respuestas de células T específicas de Ag (Figura 1C). La dosis eficaz mínima es de 10 ng/ml y la adición en el día 0 o en el día 1 es equivalente para amplificar las respuestas de las células T IFN- γ específicas de la proteína Ag (Fig. 2). Sin embargo, la adición de IL-1beta en el día 0 es más eficiente para expandir las células T CD8+ específicas de Ag de epítipo y no es equivalente a una coestimulación de citoquinas más convencional en presencia de IL-2 o IL-7 (Figura 3). La expansión se obtiene tanto para la células T CD8+ específicas de Ag para el epítipo nativo como de memoria (Figura 4A) y conduce a la generación efectiva de clones de células T (Figura 4B). Finalmente, esta amplificación mediada por IL-1 beta de respuestas de células T específicas de Ag no induce ninguna diferenciación de DC detectable en comparación con los protocolos de acDC descritos previamente (Figura 5). Por lo tanto, este método conlleva todas las ventajas descritas para los protocolos acDC previos haciendo uso de un solo ingrediente de citocina. Sin querer ser exhaustivo, las principales ventajas son: rapidez y sencillez de uso; sensibilidad de detección; requisitos mínimos de sangre; posibilidad de detectar células T que reconocen múltiples Ags o epítipes a la vez trabajando con fuentes de Ag celulares, proteicas u otras crudas, haciendo que el epítipo preliminar y la identificación HLA sean prescindibles; posibilidad de detectar células T CD4+ y CD8+; y la posibilidad de expandir células T específicas de Ag, tanto CD4+ como CD8+. Si bien todas estas ventajas se comparten con los métodos acDC anteriores, los cultivos de acDC con IL-1 beta se caracterizan por una mejor facilidad de uso y un menor costo (al usar una única citocina) y por una mayor amplificación de las respuestas de las células T, lo que resulta a partir de niveles de activación de células T más altas específicas de Ag y/o de fondo más bajo.

Referencias:

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

1. Afonso G, Scotto M, Renand A, et al. Critical parameters in blood processing for T-cell assays: validation on ELISpot and tetramer platforms. *J Immunol Methods*. 2010;359(1-2):28-36.
- 25 2. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol*. 2011;163(1):33-49.
3. Fourlanos S, Perry C, Gellert SA, et al. Evidence that nasal insulin induces immune tolerance to insulin in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2011;60(4): 1237-45.
- 30 4. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault MC, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood*. 2011;118(8):2128-2137.
5. Axelsson S, Chéramy M, Hjorth M, et al. Long-lasting immune responses 4 years after GAD-alum treatment in children with type 1 diabetes. *PLoS One*. 2011;6(12):e29008.
- 35 6. de Jongste AH, de Graaf MT, Martinuzzi E, et al. Three sensitive assays do not provide evidence for circulating HuD-specific T cells in the blood of patients with paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies. *Neuro Oncol*. 2012;14(7):841-8.
7. Iglesias MC, Briceno O, Gostick E, et al. Immuno dominance of HLA-B27- restricted HIV KK10-specific CD8(+) T-cells is not related to naive precursor frequency. *Immunol Lett*. 2013; 149(1-2): 119-22.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para estimular respuestas de células T específicas de antígeno (Ag) en una muestra de sangre o muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un sujeto que comprende la etapa que consiste en cultivar dicha muestra de sangre o PBMC en un medio de cultivo apropiado que comprende una cantidad de IL-1beta y una cantidad de al menos un antígeno, siempre que el medio de cultivo no contenga ningún agente diferenciador seleccionado del grupo que consiste en Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSF), IL-4 y ligando de tirosina quinasa 3 tipo FMS (Flt-3) y en el que la dosis efectiva mínima de IL-1beta es de 10 ng/ml.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o preparaciones de tejidos o células.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el antígeno es un antígeno asociado a enfermedad.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el antígeno es una proteína terapéutica.
- 15 5. El uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para diagnosticar una enfermedad o para controlar el tratamiento de una enfermedad, tal como la terapia inmune.
6. El uso de la reivindicación 5, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, enfermedades del cáncer y enfermedades infecciosas.
7. El uso del método según la reivindicación 4 para estudiar la inmunogenicidad de la proteína terapéutica.
- 20 8. El uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para estudiar un adyuvante de vacuna.
9. El uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para estudiar el efecto tolerogénico de un agente.
10. El uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para el mapeo de epítopes.
- 25 11. El uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para producir células T policlonales y líneas de células T o clones que reconocen un Ag dado o una combinación de Ags.

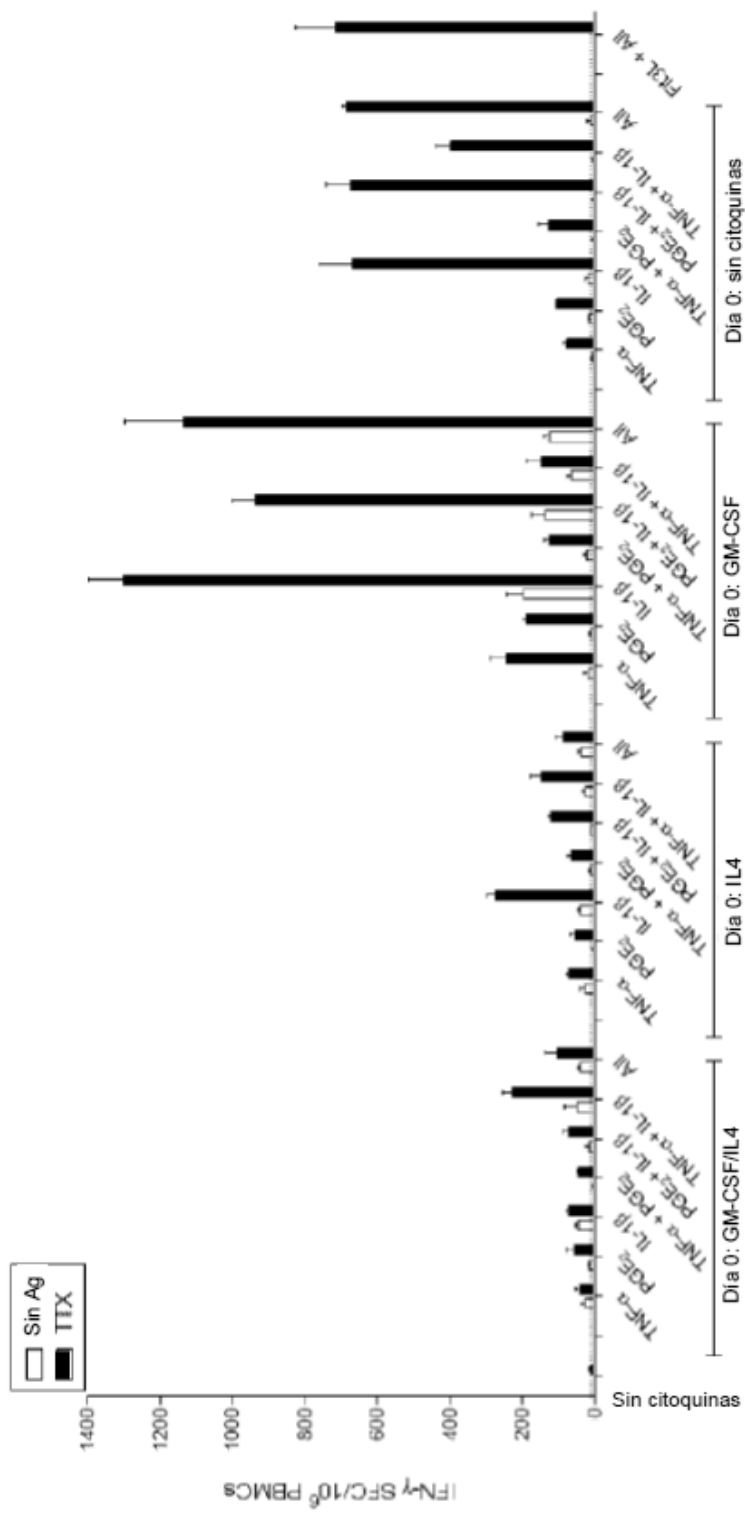


Figura 1A

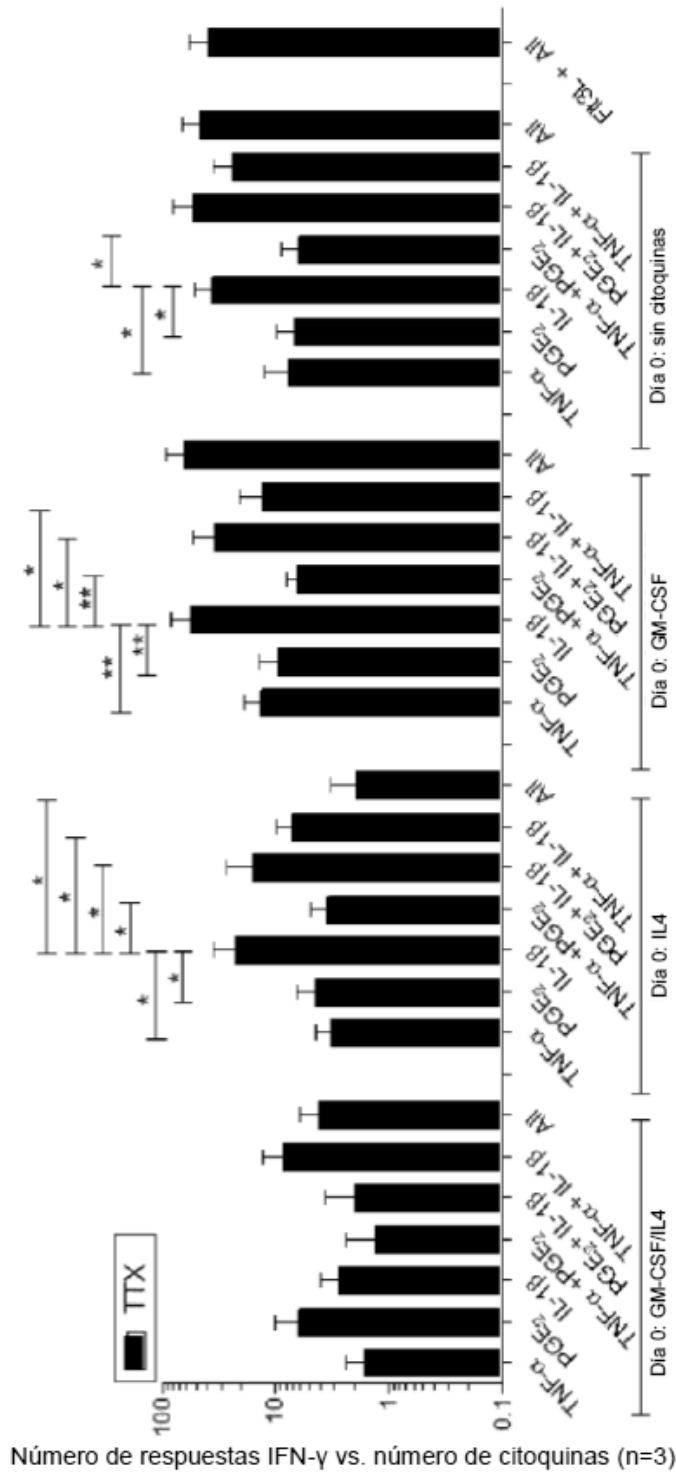


Figura 1B

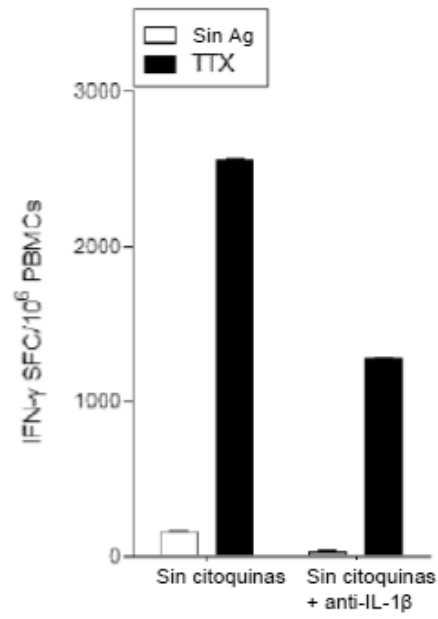


Figura 1C

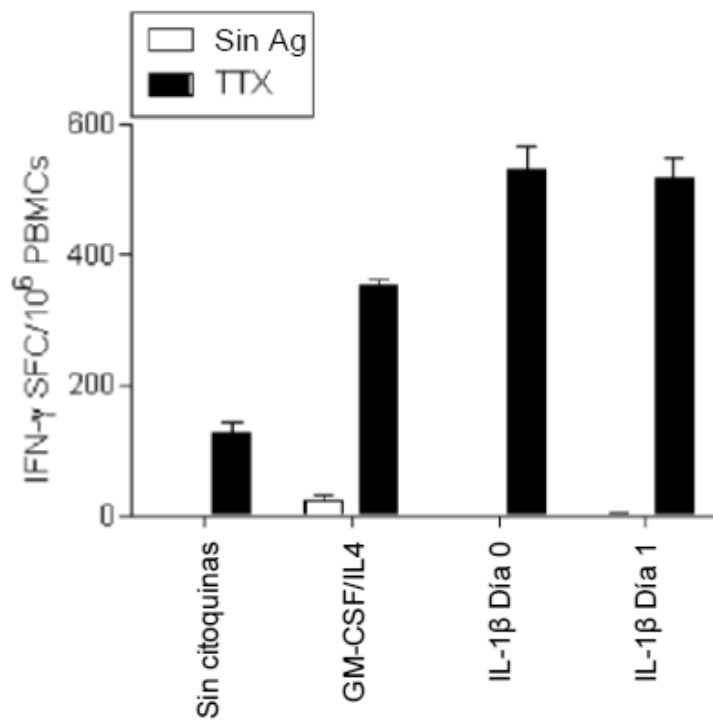
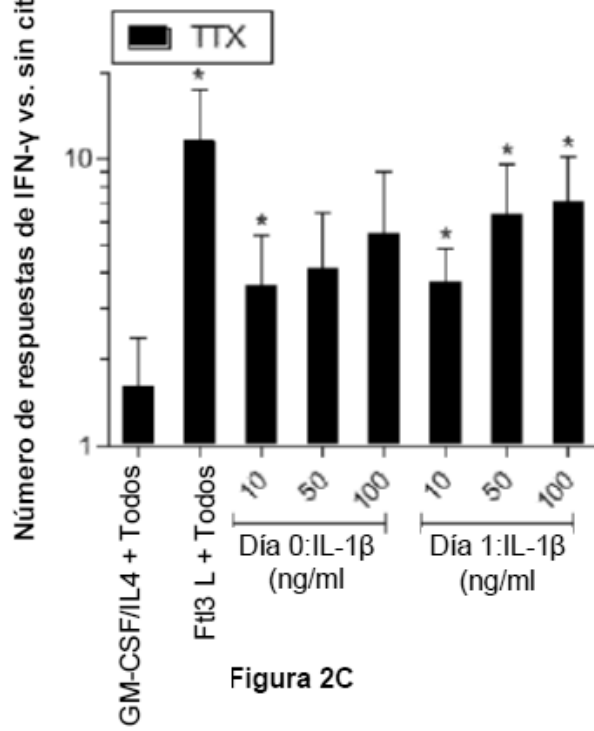
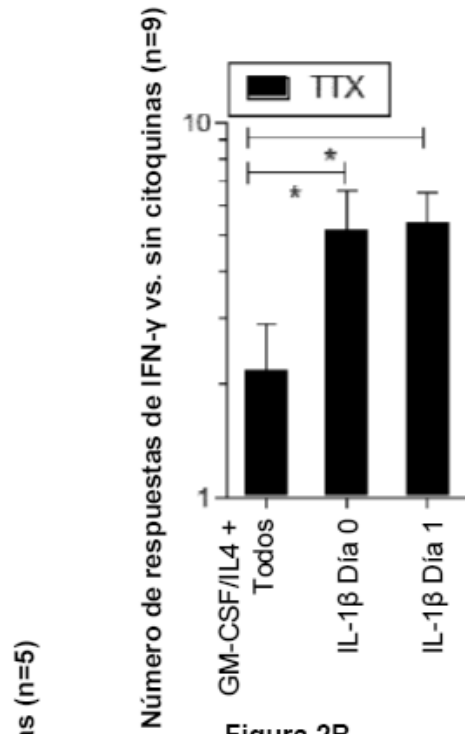


Figura 2A



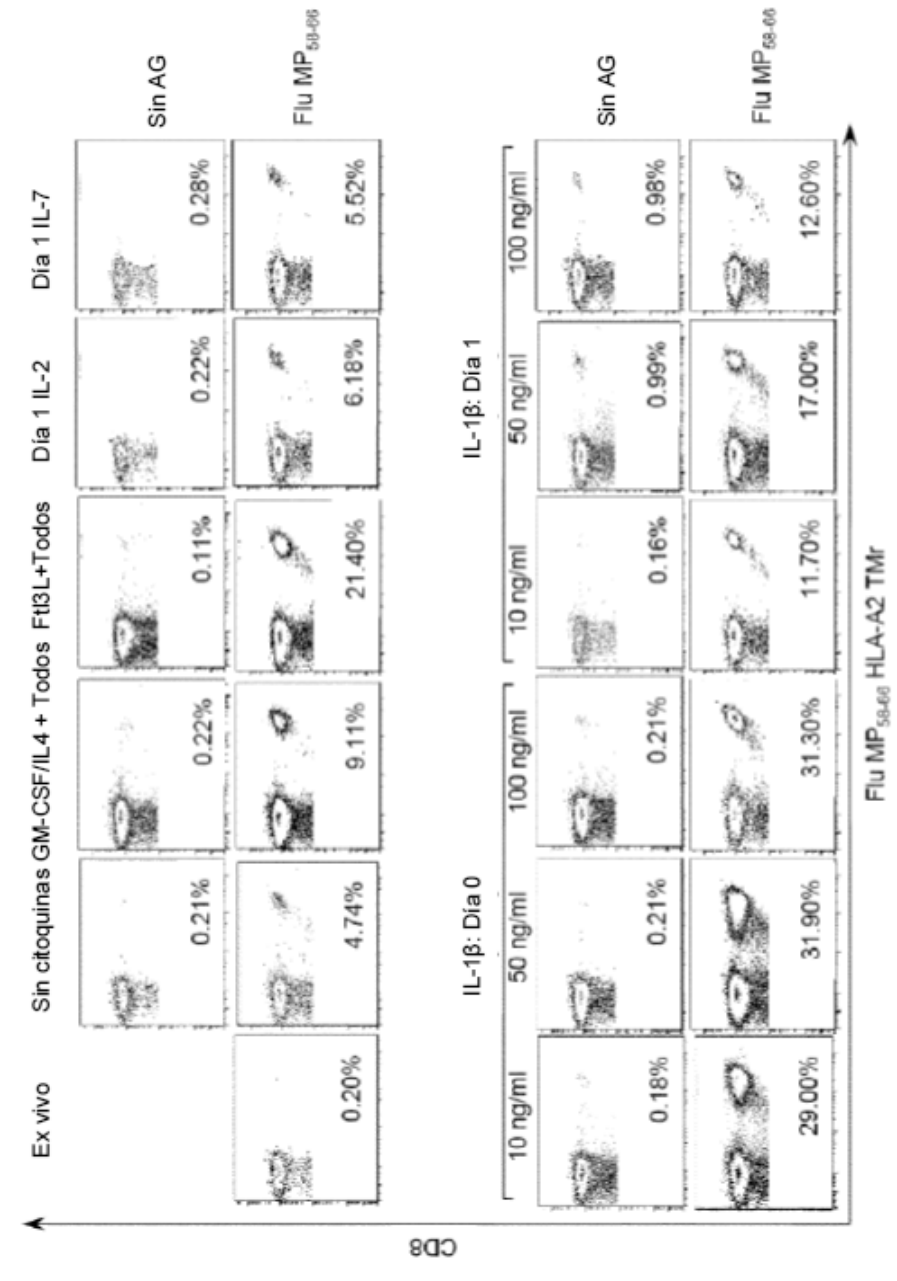


Figura 3

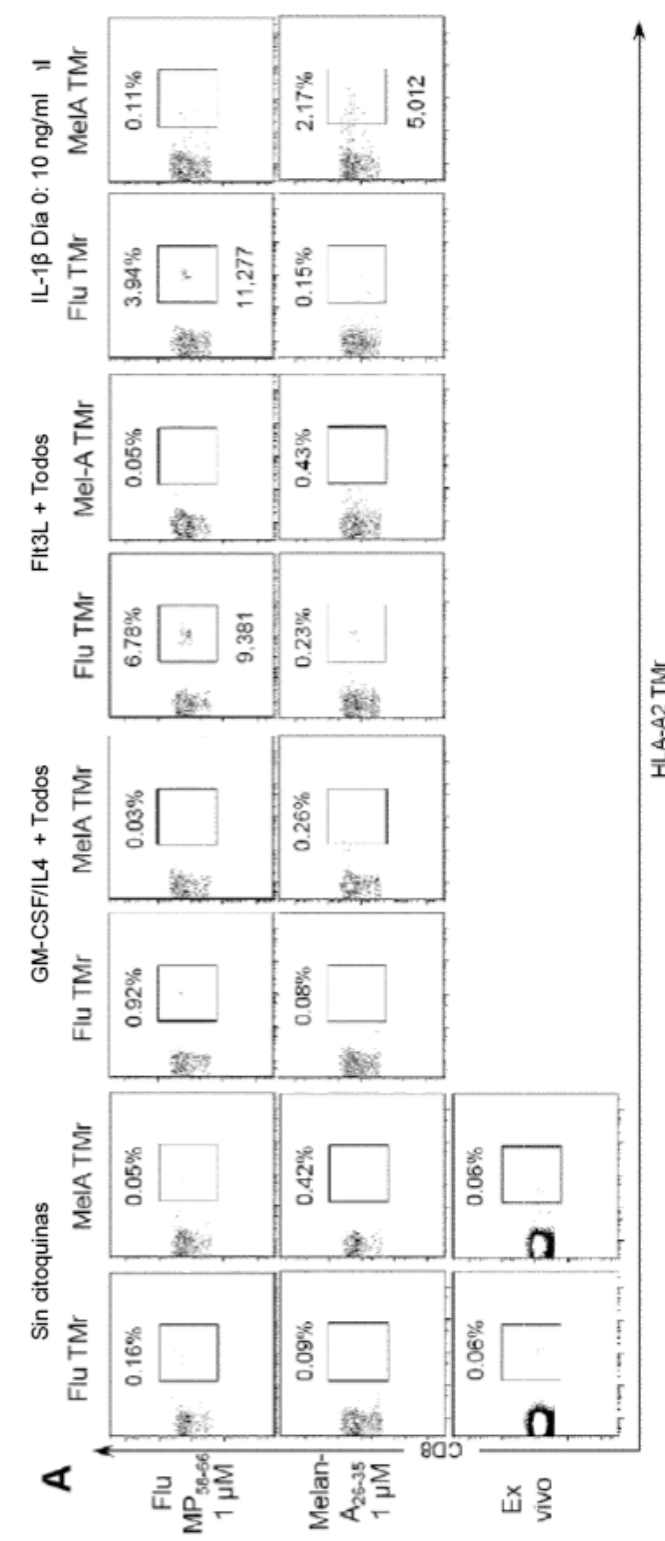


Figura 4A

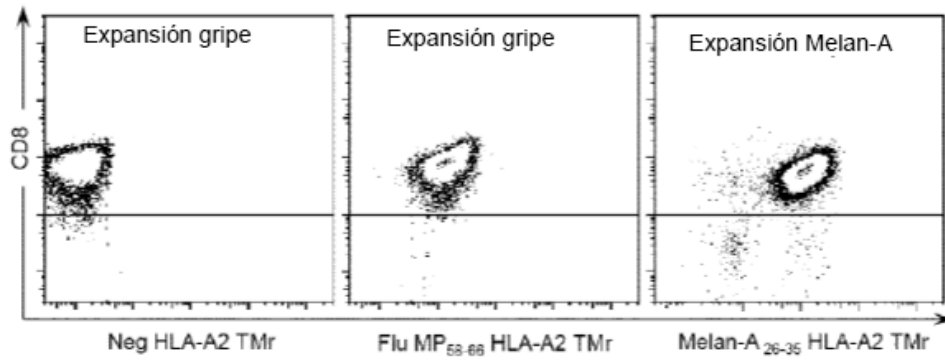


Figura 4B

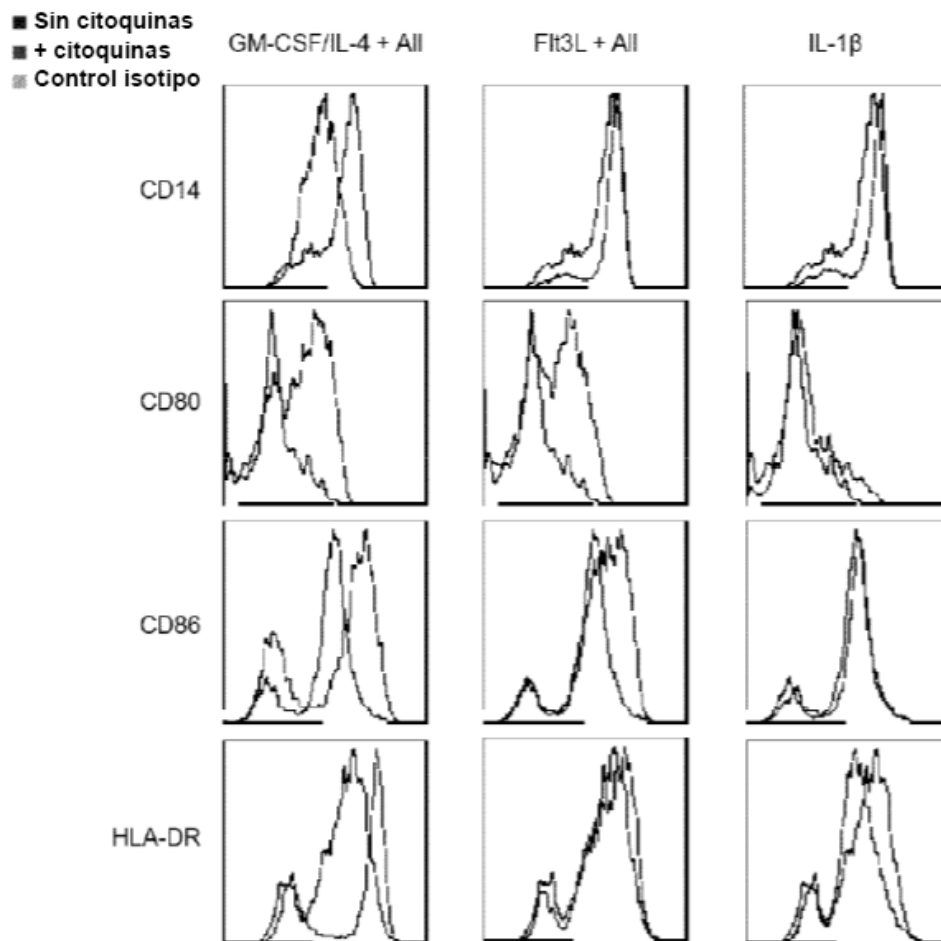


Figura 5