



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 723**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05804838 .0**

96 Fecha de presentación : **24.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1774332**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Procedimiento de evaluación de la respuesta inmune.**

30 Prioridad: **24.05.2004 US 573912 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.06.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.06.2010**

73 Titular/es: **Baylor Research Institute  
Suite 125, 3434 Live Oak Street  
Dallas, Texas 75204, US**

72 Inventor/es: **Banchereau, Jacques;  
Connolly, John, E. ;  
Palucka, Anna, Karolina y  
Ueno, Hideki**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 341 723 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

Procedimiento de evaluación de la respuesta inmune.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente solicitud se refiere a procedimientos para la identificación de péptidos inmunomoduladores y, más particularmente, a un nuevo procedimiento para la identificación de péptidos antigénicos mediante análisis múltiple de la respuesta inmune.

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmune proporciona protección frente a agresiones microbianas. En su misma esencia es un sistema complejo ya que debe ser capaz de reconocer y adaptarse a amenazas siempre cambiantes limitando al mismo tiempo los daños colaterales en los tejidos propios. Es una consecuencia de esta complejidad que la disfunción inmune, tanto hiper- como hipo- actividad, esté en la raíz de muchas enfermedades humanas. El sistema inmune adaptativo (compuesto por células B y células T) reconoce antígenos en forma de patrones moleculares tales como péptidos, glicopéptidos, fosfopéptidos y lípidos, unidos a y presentados en el contexto de clases especializadas de moléculas presentadoras de antígeno. Los fragmentos derivados de antígenos, por ejemplo, péptidos que son reconocidos por las células T, se denominan epítopes. Está ampliamente aceptado que el reconocimiento por una célula T de su epítope específico es el acontecimiento central en la función inmune adaptativa.

Estas moléculas presentadoras de antígenos especializadas incluyen: i) las proteínas clásicas de antígeno leucocitario humano (HLA) que son altamente polimórficas y pueden separarse en dos clases principales, la Clase I y la Clase II; ii) el grupo no clásico que está codificado por los subloci de HLA E, F y G (Braud VM, Curr Opin Immunol. 1999 Feb; 11(1): 100-8), y iii) la familia CD1 de moléculas presentadoras de antígeno (Bendelac A, Science. 1995 Jul 14; 269(5221): 185-6). Las moléculas de HLA de Clase I están codificadas por los loci de HLA A, B y C y presentan péptidos de 8-10 aminoácidos (AA) a células T citotóxicas CD8+ (Adams EJ, Immunol Rev. 2001 Oct; 183: 41-64). Las moléculas de HLA de Clase II presentan péptidos de 12-16 AA a células T auxiliares CD4+ y están codificadas por los loci de HLA DR, DP y DQ (Korman AJ, Immunol Rev. 1985 Jul; 85: 45-86). Las células T reconocen antígenos sólo en el contexto de moléculas presentadoras de antígeno, y sólo después de un procesamiento y presentación apropiadas de los antígenos. Para la presentación de antígenos dependiente de HLA, el procesamiento de antígenos consiste habitualmente en la fragmentación proteolítica de la proteína, dando como resultado polipéptidos que caben en la hendidura de la molécula de HLA y este complejo de péptido/HLA se presenta posteriormente en la superficie celular de la célula presentadora de antígeno a la célula T (Rock, K, Adv Immunol. 2002; 80: 1-70, Cresswell P, Curr Biol. 1994 Jun 1; 4(6): 541-3). El grupo no clásico está codificado por los subloci de HLA E, F y G y está caracterizado por un bajo grado de polimorfismo y una capacidad para unirse y presentar un conjunto limitado de péptidos a células efectoras inmunes. El reconocimiento de péptidos presentados por moléculas de HLA no clásicas se ha demostrado que es importante en la inducción de la inmunotolerancia en áreas tales como la interfaz materno-fetal y/o la inmunidad tumoral. El otro grupo importante entre estas moléculas especializadas es la familia CD1, que está implicada en la presentación de lípidos tales como glicolípidos bacterianos a células efectoras especializadas en el sistema inmune.

Tres tipos principales de inmunidad de células T puede seguir al reconocimiento de antígenos: Tipo 1 (Th1), Tipo 2 (Th2) y Reguladora (T-Reguladora). La inmunidad de Tipo 1 es importante para la eliminación de patógenos intracelulares y la inmunidad antitumoral y se caracteriza principalmente por la expresión de IFN gamma (IFN- $\gamma$ ). La inmunidad de Tipo 2 es crítica para la eliminación de patógenos extracelulares y se caracteriza principalmente por la expresión de citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. El tipo de inmunidad T-Reguladora, mediada por citocinas tales como IL-10 o TGF-beta, es esencial para la generación y mantenimiento de la autotolerancia. Estos tres tipos de respuesta no se limitan a las células T CD8+ TCR+ alfa/beta clásicas y también pueden estar mediadas por células T CD8+ TCR+ gamma/delta así como por células asesinas naturales (NK) y células T NK. Por lo tanto, el reconocimiento de epítopes antigénicos específicos por cualquiera de estos tipos celulares conduce a su activación y respuesta distintiva especializada. La calidad de una respuesta inmune puede describirse por lo tanto por observación de la expresión coordinada de patrones de citocinas (Tipo 1, Tipo 2 y T-Reguladora).

La activación de una respuesta de células T apropiada durante el transcurso de una reacción inmune implica a menudo la dominancia de una respuesta especializada sobre las otras. Esta activación selectiva de una respuesta de células T especializada apropiada es un determinante crítico para el resultado de la enfermedad. Un ejemplo sorprendente de esto se demuestra en la respuesta de pacientes a la lepra, en la que una respuesta de Tipo 1 a la infección se caracteriza por una inmunidad protectora y una respuesta de Tipo 2 conduce a menudo a una enfermedad mortal. En otro ejemplo drástico respecto a la inmunidad tumoral, se ha demostrado que epítopes tolerogénicos que conducen a un cambio inapropiado hacia una respuesta T-Reguladora dan como resultado una progresión tumoral posterior en seres humanos, mientras que la activación de respuestas de Tipo 1 por epítopes antigénicos tumorales se asocia con la inhibición del crecimiento tumoral. Además, un cambio inapropiado lejos de una respuesta T-Reguladora puede conducir al desarrollo de una enfermedad autoinmune si se presenta un autoantígeno. El cuadro clínico específico de una enfermedad autoinmune dependerá de la respuesta dominante: de Tipo 1 como en el caso de la diabetes de Tipo 1 o de Tipo 2 como el caso de la alergia.

## ES 2 341 723 T3

Como la activación de estas respuestas de células T especializadas depende de la presentación de epítopes específicos a las mismas, por lo tanto sería ventajoso identificar estos epítopes peptídicos. Por medio de la identificación de estos epítopes de células T especializadas en las primeras fases de la patología, surge la oportunidad de potenciar respuestas de células T apropiadas o eliminar respuesta de células T inapropiadas y, por lo tanto, de cambiar el equilibrio de la respuesta inmune para mejorar el desenlace de la enfermedad. Una metodología para la identificación cuantitativa y la caracterización cualitativa de estos epítopes antigénicos de células T es una base importante para el diseño de vacunas así como para estrategias de diagnóstico y terapéuticas para enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas.

El documento WO 2004/005925 A2 describe un procedimiento de diagnóstico en un individuo de una exposición reciente a un antígeno, que es, por ejemplo, un patógeno o una vacuna. El procedimiento comprende determinar *in vitro* si las células T del individuo reconocen una proteína de dicho agente.

El documento WO 99/36568 se refiere al análisis de citocinas en una célula T para determinar una respuesta de células T contra un péptido en las 6 horas siguientes a la exposición de la célula T al péptido.

Haselden y col., *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (3), 2001: 349-356 desvela reacciones alérgicas mediadas por células mononucleares de sangre periférica.

Holen y col., *Clinical and Experimental Allergy*, 31(6), 2001: 952-964 desvela epítopes del ovomucoide de pollo que inducen respuestas de células T.

Early y col., *Cytometry* 50(5), 2002: 239-242 se refiere a inmunoensayos múltiples para citocinas humanas.

Karlsson y col., *Journal of Immunology Methods* 283(1-2), 2003: 141-153 se refiere a un ELISPOT y citometría de flujo de citocinas para determinar células T específicas de antígeno.

### Sumario de la invención

La presente invención incluye procedimientos para identificar uno o más péptidos inmunomoduladores por cultivo de células inmunes aisladas de un sujeto con un grupo de varios péptidos solapantes de una biblioteca de péptidos solapantes; analizar simultáneamente un sobrenadante de un medio de cultivo para determinar múltiples parámetros de reactividad inmune que comprenden la especificidad y la respuesta de citocinas y quimiocinas, lo cual permite la identificación de fenotipos de células de Tipo 1, de Tipo 2 y T-Reguladoras contra el grupo de varios péptidos solapantes; cultivar células inmunes aisladas del sujeto con péptidos individuales del grupo de péptidos solapantes y analizar simultáneamente el sobrenadante del medio cultivo para determinar dichas citocinas y quimiocinas; y determinar el tipo de respuesta inmune basándose en la expresión coordinada de citocinas en respuesta a los péptidos individuales en el medio de cultivo. Por ejemplo, los epítopes reactivos pueden seleccionarse de los péptidos inmunomoduladores en una combinación de péptidos. El procedimiento también puede incluir proporcionar células efectoras específicas de péptido de ese individuo específico.

Se desvela un procedimiento para identificar uno o más fragmentos inmunomoduladores por: aislamiento de células inmunes del sujeto; cultivo de las células inmunes en presencia de uno o más fragmentos de la biblioteca de péptidos procesados; y análisis simultáneo del cultivo para determinar múltiples parámetros de especificidad inmune y de la respuesta de citocinas a los fragmentos, en el que un fragmento inmunomodulador se identifica por la presencia de reactividad inmune hacia el fragmento. Usando este procedimiento, pueden aislarse múltiples células efectoras específicas de fragmento peptídico e incluso purificarse, por ejemplo, en una población mixta o clonal. También se desvela un procedimiento para identificar el tipo de reactividad inmune expresada por un sujeto hacia un material antigénico por aislamiento y cultivo de una o más células inmunes de un sujeto en presencia de uno o más fragmentos antigénicos; identificar las citocinas producidas por las células inmunes; y determinar el tipo de reactividad inmune basándose en la expresión coordinada de citocinas en respuesta al material antigénico. El material antigénico puede incluir un antígeno, un péptido, un microbio, una célula y mezclas de combinaciones de los mismos. La proteína anti-génica puede incluir péptidos con secuencias de aminoácidos conocidas o desconocidas, de proteínas y/o fragmentos proteicos conocidos o desconocidos, o incluso una biblioteca de péptidos solapantes tomada a partir de una proteína conocida o péptidos fraccionados por tamaño antes del uso en el procedimiento y posterior caracterización. En alguna realización, el material antigénico puede incluir múltiples materiales antigénicos y/o péptidos que se proporcionan en proporciones diferentes para dirigir el tipo de respuesta inmune, por ejemplo, Th1 frente a Th2 o Tc1 frente a Tc2, o mezclas y combinaciones de las mismas.

La presente invención también incluye un procedimiento para evaluar el estado inmune de un sujeto por medio de la identificación de una serie de péptidos inmunomoduladores como se ha mencionado anteriormente, en el que el tipo de reactividad inmune es indicativo del estado inmune del sujeto. Por ejemplo, el procedimiento puede evaluar el grado de inmunosupresión del sujeto, el grado de hiperactivación del sistema inmune del sujeto, el repertorio de células T para el sujeto e incluso el tipo de reactividad inmune, que puede ser indicativo del riesgo del sujeto a enfermedades relacionadas con el sistema inmune. Los ejemplos no limitantes de enfermedades relacionadas con el sistema inmune que pueden monitorizarse usando la presente invención incluyen: enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, enfermedades autoinflamatorias, cáncer, inflamación crónica y alergias.

Otro uso para la presente invención es un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto a terapia por medio de la determinación del estado inmune específico de epítotope del sujeto como un indicador del resultado del tratamiento. La terapia puede ser una inmunoterapia tal como vacunación, inmunoterapia pasiva y transferencia de células adoptivas. Otro ejemplo es un procedimiento para predecir el transcurso y el desenlace clínico de la enfermedad de un sujeto por medio del cultivo de una o más células inmunes del sujeto en presencia de una serie de péptidos de una biblioteca de péptidos solapantes tomada a partir de una proteína antigénica de interés y análisis del cultivo para determinar la proliferación celular y el perfil de producción de citocinas para determinar el tipo de reactividad inmune contra la molécula inmunomoduladora, en el que el perfil de producción de citocinas es un marcador de la gravedad de la enfermedad y del estado de progresión o regresión de la enfermedad.

También se desvela un procedimiento de adaptación de una intervención terapéutica para un sujeto por medio de la identificación de una o más moléculas inmunomoduladoras para el sujeto basándose en un análisis de múltiples parámetros de reactividad inmune entre los que se incluye una identificación de las citocinas producidas; y la preparación de una vacuna inmune específica de epítotope que comprende dichas una o más moléculas inmunomoduladoras. La vacuna puede incluir, por ejemplo, uno o más antígenos que: aumentan o reducen un tipo específico de respuesta inmune en el sujeto; uno o más antígenos que aumentan o reducen la producción de citocinas específicas de epítotope en el sujeto; uno o más antígenos que aumentan o reducen la producción de citocinas específicas de epítotope en el sujeto; y/o uno o más antígenos que aumentan o reducen la producción de anticuerpos o aumentan la inmunidad mediada por células en el sujeto.

Otro procedimiento desvelado más para la inmunomonitorización de un sujeto incluye inmunizar al sujeto con uno o más péptidos inmunomoduladores identificados a partir de la biblioteca; determinar el estado inmune específico de epítotope del sujeto por aislamiento de células inmunes del sujeto después de la exposición a dichos uno o más péptidos inmunomoduladores; y comparar el tipo de respuesta inmune antes de y después de la inmunización para determinar cambios en el estado inmune específico de epítotope del sujeto.

En funcionamiento, el procedimiento desvelado para el tratamiento de un sujeto que necesita inmunoterapia incluye: exponer células inmunes del sujeto a uno o más péptidos inmunomoduladores para determinar el tipo de respuesta inmune generada por dichos uno o más péptidos inmunomoduladores; tratar al sujeto con péptidos inmunomoduladores que afecten al tipo de respuesta inmune; y evaluar el tipo de respuesta inmune después de tratar al sujeto con uno o más péptidos inmunomoduladores y, si es necesario, modificar dichos uno o más péptidos inmunomoduladores para cambiar el tipo de respuesta inmune. La evaluación de la eficacia terapéutica puede usarse para controlar la terapia con vacunas, la terapia anti-cancerosa, la terapia antitumoral, el trasplante de órganos, la alergia, la terapia de enfermedades autoinmunes y la terapia de una enfermedad infecciosa. Otro procedimiento de la presente invención incluye identificar y caracterizar nuevos agentes terapéuticos para inmunoterapia por medio del cultivo de células inmunes aisladas en presencia y ausencia de un inmunomodulador y uno o más péptidos de una biblioteca de péptidos solapantes tomada a partir de una proteína antigénica de interés; analizar simultáneamente los cultivos para determinar múltiples parámetros de reactividad inmune tales como la especificidad y la respuesta de citocinas a epítotopes en los péptidos; y comparar la reactividad inmune cuando está presente el inmunomodulador con la reactividad inmune cuando está ausente el inmunomodulador, siendo la inhibición de la reactividad inmune indicativa de un agente terapéutico inmunosupresor y siendo la potenciación de la reactividad inmune indicativa de un adyuvante, y pudiéndose incluso dirigir el tipo de respuesta inmune hacia una Th1, Th2, Tc1, Tc2, y combinaciones de las mismas.

Uno o más agentes terapéuticos pueden identificarse por medio de la identificación de una serie de péptidos inmunomoduladores como se ha descrito anteriormente, en la que las células inmunes se cultivan en presencia y ausencia de un inmunomodulador y uno o más péptidos de la biblioteca de péptidos solapantes, siendo la inhibición de la reactividad inmune indicativa de un agente terapéutico inmunosupresor y siendo la potenciación de la reactividad inmune indicativa de un adyuvante. La biblioteca de péptidos puede ser de un agente antigénico que puede ser una enfermedad infecciosa, un cáncer, un tumor, una enfermedad autoinmune, una enfermedad autoinflamatoria, una artritis, una diabetes, una alergia, un trasplante de órganos y un trasplante de médula ósea. También pueden identificarse epítotopes vacunales como agentes terapéuticos por medio del cultivo de células inmunes aisladas en presencia de uno o más péptidos de una biblioteca de péptidos solapantes tomada a partir de una proteína antigénica de interés; y análisis del cultivo para determinar múltiples parámetros de reactividad inmune y producción de citocinas para determinar el tipo de reactividad inmune contra los péptidos en la identificación de las citocinas producidas como se ha descrito anteriormente. Puede prepararse una vacuna con uno o más péptidos que tienen la misma secuencia identificada. El procedimiento es lo bastante flexible para que la secuencia de dichos uno o más péptidos pueda determinarse incluso después del aislamiento. También pueden identificarse epítotopes vacunales por cultivo de células inmunes aisladas en presencia de una serie de péptidos de una biblioteca de péptidos solapantes tomada a partir de un agente antigénico y análisis del cultivo para determinar múltiples parámetros de reactividad inmune y producción de citocinas en el cultivo para determinar el tipo de reactividad inmune contra el uno o más péptidos, donde los epítotopes vacunales se caracterizan por la reactividad inmune que generan contra el agente antigénico. Los ejemplos de agente antigénico incluyen un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo, un parásito o un helminto. El agente antigénico puede ser un autoantígeno. El cultivo celular también puede analizarse y puede determinarse el perfil de una o más células T, células B, células dendríticas, monocitos, neutrófilos, mastocitos y eritrocitos.

Las composiciones desveladas en el presente documento incluyen uno o más péptidos que se seleccionan para modificar el tipo de respuesta inmune aislada a partir de una biblioteca de péptidos identificados como inmunorreactivos para un individuo específico en el que se han identificado péptidos reactivos para células tanto Th1 como Th2. Otros

ejemplos más de composiciones incluyen uno o más péptidos que se seleccionan para modificar el tipo de respuesta inmune aislados a partir una biblioteca de péptidos identificados como inmunorreactivos para un individuo específico en el que se han identificado péptidos reactivos para células T tanto Tc1 como Tc2. Estas composiciones pueden formularse como vacunas en forma seca o líquida y similares.

5

### Breve descripción de los dibujos

Para un entendimiento más completo de las características y ventajas de la presente invención, se hace ahora referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en las que:

10

La Figura 1 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un donante normal evaluada de acuerdo con la presente invención, en la que se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de sangre recién extraída de un voluntario sano HLA-A0201+, sembradas a  $2 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo, e incubadas con  $1 \mu\text{l}$  de péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) o MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV) o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex;

15

la Figura 2 es una gráfica que representa otro ejemplo de respuesta inmune contra péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) en un donante normal de acuerdo con la presente invención. Se aislaron CMSP a partir de sangre recién extraída de otro voluntario sano HLA-A0201+, se sembraron a  $4 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con  $10 \mu\text{g/ml}$  de péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) o MART-1<sub>27-35</sub> (AAGIGILTV) o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O); y se recogieron los sobrenadantes de cultivo 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex;

20

las Figuras 3A-3D son gráficas que representan la respuesta inmune de 2 pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

30

las Figuras 4A-4C son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 5 es una gráfica que representa la cinética de la respuesta inmune de un donante normal evaluada de acuerdo con la presente invención;

35

la Figura 6 representa el esquema de focalización de epítipo de acuerdo con la presente invención en el que se dividieron bibliotecas de péptidos solapantes en grupos de péptidos (5-10 péptidos/grupo), y se realizó un análisis de grupos seguido de focalización de epítopes;

40

la Figura 7 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 8 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

45

la Figura 9 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 10 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

50

la Figura 11 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

55

las Figuras 12A y 12B son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención en las que se estimularon CMSP obtenidas antes de la vacunación con CD y después de la vacunación con 8 CD de un paciente con melanoma (el mismo de la Figura 10) con péptido MART-1 individual de 15 aminoácidos o diluyente;

60

la Figura 13 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 14 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

65

la Figura 15 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

## ES 2 341 723 T3

las Figuras 16A-D son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

5 la Figura 17 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 18 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

10 la Figura 19 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

15 la Figura 20 es una gráfica que representa la producción de IL-2 a partir de células T CD4+ tras la estimulación con el péptido de 15 aminoácidos identificado que se muestra en la Figura 19;

las Figuras 21 A-B son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención con CMSP obtenidas del mismo paciente con melanoma que se muestra en la Figura 19;

20 las Figuras 22 A-C son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

25 la Figura 23 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 24 es una gráfica que representa la producción de IL-5 a partir de células T CD4+ tras la estimulación con el péptido de 15 aminoácidos identificado que se muestra en la Figura 23;

30 la Figura 25 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 26 es una gráfica que representa la respuesta inmune de tres pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

35 la Figura 27 representa un resumen de nuevos epítopes para células T CD4+ y CD8+ dentro de 4 antígenos de melanoma; es decir, gp100, MART-1, NY-ESO1 y TRP-1, que se identifican con la metodología EPIMAX;

40 la Figura 28 representa la respuesta inmune de tres pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

las Figuras 29A-D son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

45 la Figura 30 incluye gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 31 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

50 la Figura 32 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

55 la Figura 33 incluye gráficas que representan la respuesta inmune de tres voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 34 incluye gráficas que representan la respuesta inmune de tres voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

60 la Figura 35 incluye gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

la Figura 36 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención a partir de CMSP congeladas y descongeladas;

65 la Figura 37 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención a partir de CMSP congeladas y descongeladas;

## ES 2 341 723 T3

las Figuras 38A y 38B son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

5 las Figuras 39A y 39B son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX y demuestran que EPIMAX permite la identificación de epítope para células T CD4+ específicas de Flu-MP funcionales;

10 la Figura 40 son gráficas que representan la respuesta inmune de un voluntario sano normal según se evaluó de acuerdo con la presente invención y muestra la identificación de nuevos epítopes para células T CD4+ específicas;

las Figuras 41 A y B son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX;

15 la Figura 42 son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención y los epítopes antigénicos para el paciente, ya que ambos péptidos contienen emparejamientos erróneos de aminoácidos y muestran la capacidad de identificar células T específicas de antígeno alogénico en un entorno de trasplante de órganos;

20 la Figura 43 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente diabético de tipo 1 según se evaluó de acuerdo con la presente invención;

las Figuras 44A-44B representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes;

25 la Figura 45 es una gráfica que representa la respuesta inmune de cinco voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T;

30 la Figura 46 incluye dos gráficas que representan la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T;

35 la Figura 47 es una gráfica que representa la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T;

40 la Figura 48 incluye cuatro gráficas que representan la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T; y

45 la Figura 49 incluye dos gráficas que representan la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención y demuestra la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T;

### **Descripción detallada de la invención**

50 Aunque la preparación y uso de diversas realizaciones de la presente invención se analizan en detalle a continuación, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden incluirse en una amplia diversidad de contextos específicos. Las realizaciones específicas analizadas en el presente documento son simplemente ilustrativas de modos específicos para preparar y usar la invención y no delimitan el ámbito de la invención.

55 Para facilitar el entendimiento de la presente invención, a continuación se definen varios términos. Los términos definidos en el presente documento tienen los significados que comúnmente entiende un experto normal en la materia en las áreas pertinentes a la presente invención. Términos tales como “un”, “uno/una” y “el/la” no pretenden referirse solamente a una entidad en singular, sino que incluyen la clase general de la que puede usarse un ejemplo específico con fines ilustrativos. La terminología en el presente documento se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se indica en las reivindicaciones.

60 La presente invención incluye procedimientos que son capaces de evaluar las respuestas inmunes específicas de antígeno independientemente del tipo de respuesta inducida. Como se usa en el presente documento, la expresión “tipo de respuesta inmune inducida” o “tipo de respuesta inmune” se usa para describir la activación o regulación de una respuesta de células inmunes por medio de Th1, Th2, Tc1, Tc2 y combinaciones de las mismas u otra inmunidad adaptativa basada en células T independientemente del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) que presente el péptido o antígeno, con lo que la célula T reconoce y responde al péptido o antígeno específico en el contexto del CMH y su efecto en la misma célula, células adyacentes o células que interactúan con esa célula T particular o su efecto sobre la célula que presenta el péptido o antígeno. El inmunólogo experto reconocerá que la terminología puede

## ES 2 341 723 T3

coincidir, es decir, es común referirse a una proteína que se ha procesado y cargado por una célula presentadora de antígeno en un péptido, antígeno o epítope, que se presenta en el contexto de una glicoproteína del CMH particular, es decir, de Clase I o de Clase II.

5 Será evidente como se usa en el contexto del presente documento que los términos “péptido”, “antígeno” o “epítope” se usan en relación con la presentación de inmunomodulación por células T después de la presentación por una célula presentadora de antígeno. Como se usa en el presente documento, el término “péptido” se usa para describir una hebra de aminoácidos.

10 Como se usa en el presente documento, los términos “antígeno”, “inmunógeno”, “epítope” y “determinante antigénico” se usan indistintamente para describir los péptidos que modulan una respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, el término “modular” se usa para describir la activación, regulación, anergización o incluso supresión de una respuesta inmune según se mide, por ejemplo, por la proliferación de células, la secreción de citocinas o inmunocinas, interacciones entre células, apoptosis y similares. Por ejemplo, puede “modularse” una respuesta de células T en la que se liberan determinadas citocinas o inmunocinas por la célula T que son capaces de activar un tipo determinado de respuesta, por ejemplo, la producción de anticuerpos; y simultáneamente reducir otro tipo de respuesta, por ejemplo, la activación de células T citotóxicas o células NK.

20 Como se usa en el presente documento, el término “inmunomodulador” se usa para describir el efecto que tiene un antígeno, inmunógeno, epítope o determinante antigénico particular sobre células efectoras, es decir, células que se activan *in situ* o incluso aguas abajo en una cascada efectora.

25 Los presentes inventores reconocieron que anteriormente se han desarrollado muchas herramientas para la predicción y caracterización de epítopes antigénicos. Por ejemplo, el modelado por ordenador de interacciones de péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), basado en gran medida en los datos de estructuras de cristalografía de rayos X de complejos de CMH-péptidos, se usa a menudo para predecir el potencial de epítopes dentro de proteínas. Aunque esta metodología se ha beneficiado enormemente de la introducción de nuevos algoritmos de predicción, depende no obstante del tamaño de la base de datos de estructuras y por lo tanto puede ser menos eficaz en la predicción de complejos de CMH no representados en ese conjunto de datos. Este procedimiento proporciona un medio de identificación de epítopes antigénicos pero no puede usarse para caracterizar la respuesta específica generada por esos epítopes (Flower DR, Novartis Found Symp. 2003; 254: 102-20; análisis 120-5, 216-22, 250-2).

35 La elución de péptidos de CMH seguida de secuenciación por espectrometría de masas se ha usado con éxito para identificar epítopes antigénicos (Hunt DF, Science. 1992 Mar 6; 255 (5049):1261-3). Aunque es una metodología potente para la identificación, la elución de péptidos es cara, lenta y requiere un gran tamaño de muestras, lo cual hace que sea poco práctica para su uso en un entorno clínico. Este procedimiento también proporciona un medio de identificación de epítopes antigénicos pero no puede usarse para caracterizar la respuesta específica generada por esos epítopes.

40 Se han usado bibliotecas de péptidos solapantes para identificar epítopes antigénicos en proteínas asociadas a patógenos (Martin R, Methods. 2003 Mar; 29(3): 236-47). La exploración de bibliotecas de péptidos usa ensayos biológicos como lecturas de la reactividad y, por lo tanto, puede usarse para evaluar la magnitud de la respuesta contra el epítope. Mediante el uso de bibliotecas solapantes, pueden identificarse todos los epítopes potenciales de Clase I y Clase II. Hasta la fecha, los ensayos biológicos usados para evaluar epítopes antigénicos potenciales usando bibliotecas de péptidos incluyen las siguientes metodologías: citocinas intracitoplasmáticas, ELISA y proliferación celular (Martin R, Methods. 2003 Mar; 29(3): 236-47). La reactividad contra un péptido dado dentro de la biblioteca en cualquiera de estos ensayos es un indicio de que está presente un epítope antigénico; sin embargo, ninguno de estos procedimientos proporciona una indicación clara en lo que se refiere a la calidad de la respuesta contra ese epítope, por ejemplo, respuesta antigénica, alérgica, tolerogénica o cualquier otra respuesta específica.

50 También se ha informado de combinaciones de tecnologías conocidas útiles para la predicción y caracterización de epítopes antigénicos. A continuación se proporcionan ejemplos de ensayos de combinación.

55 Bibliotecas de péptidos y ELISPOT. La técnica de ELISPOT usa un anticuerpo de captura unido a superficie para unir citocinas secretadas de células cultivadas en la placa. Se usa un segundo anticuerpo marcado para cuantificar el número de células secretoras de citocinas. Por medio de la incubación de las células con bibliotecas de péptidos solapantes y evaluación de la producción de citocinas por ELISPOT, se han aislado epítopes antigénicos (Geginat G, J Immunol, 2001 Feb 1; 166(3): 1877-84). Esta metodología es limitada, sin embargo, en el sentido de que para cualquier muestra dada, puede medirse la producción de sólo unas pocas citocinas. Esta incapacidad para medir la variedad total de citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al reconocimiento de epítopes hace que cualquier caracterización de la respuesta inmune (es decir, Tipo 1, Tipo 2 o T-Reguladora) sea extremadamente difícil.

65 Bibliotecas de péptidos y ELISA. La técnica de ELISA usa un anticuerpo de captura unido a una superficie para unir citocinas solubles secretadas a partir de células. Se usa un segundo anticuerpo marcado para cuantificar la concentración de citocinas secretadas cuando se compara con una curva patrón. Por incubación de las células con bibliotecas de péptidos solapantes y evaluación de la producción de citocinas por ELISA, se han aislado epítopes antigénicos. Esta metodología es limitada, sin embargo, en el sentido de que para cualquier muestra dada puede medirse la producción de sólo unas pocas citocinas. Esta incapacidad para medir la variedad total de citocinas y quimiocinas producidas en

## ES 2 341 723 T3

respuesta al reconocimiento de epítopes hace que cualquier caracterización de la respuesta inmune (es decir, Tipo 1, Tipo 2 o T-Reguladora) sea extremadamente difícil. Además, la evaluación de una sola citocina por ELISA requiere un volumen significativo de al menos 100 microlitros de fluido biológico y/o sobrenadante de cultivo.

5 Biblioteca de péptidos y ensayos de proliferación celular. Los ensayos de proliferación celular usan la incorporación de radionucleótidos o la dilución de colorantes fluorescentes para monitorizar la división celular en respuesta a un estímulo. Por incubación de células con bibliotecas de péptidos solapantes y evaluación de la división celular mediante ensayos de proliferación celular, se han aislado epítopes antigénicos (Mutch D, J Acquir Immune Defic Syndr. 1994 Sep; 7(9): 879-90). Esta metodología es limitada, sin embargo, en el sentido de que aunque la división celular  
10 puede ser un indicio de la magnitud de la respuesta antigénica, este ensayo no proporciona y información en lo que se refiere a la calidad de la respuesta (es decir, Tipo 1, Tipo 2 o T-Reguladora). También debería señalarse que algunas respuestas específicas de antígeno no se asocian con una proliferación celular rápida, tales como las respuestas T-Reguladoras.

15 Bibliotecas de péptidos y ensayos de linfocitos citotóxicos (CTL). El ensayo de linfocitos citotóxicos monitoriza la liberación de radionucleótido o colorante fluorescente de células diana cargadas con antígeno (incluyendo, pero sin limitación, ADNc, bibliotecas de expresión en virus y fagos, proteína completa, fragmentos proteicos, péptidos, péptidos modificados y lípidos) como una medida de reconocimiento de epítape y función de células citotóxicas. Por incubación de las células con bibliotecas de péptidos solapantes y evaluación de la citotoxicidad celular mediante  
20 un ensayo de linfocitos citotóxicos, se han aislado epítopes antigénicos. Aunque la citotoxicidad celular puede ser un indicio de la magnitud de una respuesta antigénica de Tipo 1, esta metodología es de utilidad limitada cuando se evalúan respuestas distintas de las de Tipo 1 (es decir, de Tipo 2 o T-Reguladoras). La caracterización de citotoxicidad específica de antígeno usando ensayos de CTL está a menudo plagada de baja sensibilidad debido a liberación de indicadores desde las células diana. También debería señalarse que esta metodología requiere una amplia manipulación  
25 de cultivo celular y, por lo tanto, no puede considerarse de alto rendimiento.

Bibliotecas de péptidos y tinción de citocinas intracitoplasmáticas. La técnica de tinción de citocinas intracitoplasmáticas usa procedimientos de tinción fluorescente convencionales y anticuerpos anti-citocinas para medir el nivel de citocinas intracelulares producidas en respuesta a un estímulo antigénico. Después pueden realizarse mediciones de  
30 la producción de citocinas y la cuantificación de células productoras de citocinas por técnicas citométricas, microscópicas o espectrofotométricas convencionales. Por incubación de las células con bibliotecas de péptidos solapantes y evaluación de la producción de citocinas mediante tinción intracitoplasmática, se han aislado epítopes antigénicos (Karlsson AC, J Immunol Methods. 2003 Dec; 283(1-2): 141-53). Esta metodología está limitada, sin embargo, en el sentido de que para cualquier muestra dada, puede medirse la producción de sólo unas pocas citocinas. Esta incapacidad para medir la variedad total de citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al reconocimiento de epítape  
35 hace que cualquier caracterización de la respuesta (es decir, Tipo 1, Tipo 2, T-Reguladora) sea extremadamente difícil. Esta metodología está limitada además en el sentido de que requiere una gran cantidad de células para el análisis y es destructiva para las células analizadas.

40 Elución de péptido y secuenciación por espectrometría de masas. La elución de péptidos del CMH seguida de secuenciación por espectrometría de masas se ha usado con éxito para identificar epítopes antigénicos (Hunt DF, Science. 1992 Mar 6; 255 (5049): 1261-3). Aunque es una metodología potente para la identificación, la elución de péptidos es cara, lenta y requiere un gran tamaño de muestra, haciendo poco práctico su uso en un entorno clínico. Este procedimiento proporciona un medio de identificación de epítopes antigénicos pero no puede usarse para caracterizar  
45 la respuesta específica (es decir, Tipo 1, Tipo 2, T-Reguladora) generada por esos epítopes.

Modelado por ordenador de interacciones de péptido-CMH. El modelado por ordenador de interacciones de péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), basado en gran medida en los datos de estructuras de cristalografía de rayos X de complejos de péptido-CMH, se usa a menudo para predecir epítopes potenciales dentro de proteínas.  
50 Aunque esta metodología se ha beneficiado enormemente de la introducción de nuevos algoritmos de predicción, depende sin embargo del tamaño de la base de datos de estructuras y, por lo tanto, puede ser menos eficaz en la predicción de complejos CMH no representados en ese conjunto de datos (Kuhara S. Pac Symp Biocomput. 1999; 182-9). Este procedimiento proporciona un medio para identificar epítopes antigénicos pero no puede usarse para caracterizar la respuesta específica generada por esos epítopes.

55 Identificación serológica de antígenos por clonación y expresión recombinante (SEREX). La tecnología de SEREX implica la identificación de epítopes reconocidos por anticuerpos séricos por exploración de una biblioteca de expresión combinatoria. Aunque la tecnología de SEREX puede proporcionar indicios en lo que se refiere a la especificidad de la respuesta inmune humoral, no proporciona indicios en lo que se refiere a la magnitud o naturaleza de la respuesta  
60 inmune celular (Tureci O, Mol Med Today. 1997 Aug; 3(8): 342-9). Esta tecnología requiere mucho tiempo y mucha mano de obra y, por lo tanto, es poco práctica en un entorno clínico.

PCR a tiempo real para análisis múltiple de citocinas. Puede usarse PCR a tiempo real para medir de una forma cuantitativa la expresión de ARN que codifica múltiples citocinas (Giulietti A., Methods. 2001 Dec; 25(4): 386-401).  
65 Sin embargo, esta tecnología requiere tanto mucho tiempo como mucha mano de obra, requiere grandes cantidades de células para aislar cantidades suficientes de ARN para análisis y es destructiva para las células. Por último, la expresión de ARN no indica la secreción de una citocina biológicamente activa.

## ES 2 341 723 T3

Como se ha indicado anteriormente, se han descrito tecnologías capaces de predecir y caracterizar epítopes antigénicos y en algunos casos se han combinado diversas tecnologías para maximizar la cantidad de información útil, tal como ensayos de proliferación basados en fluorescencia y ensayos de citocinas intracelulares. Estas estrategias de ensayos combinados experimentan a menudo las limitaciones de sus ensayos componentes individuales, tales como las limitaciones asociadas con la tinción de citocinas intracelulares descrita anteriormente.

Existe una necesidad urgente y, por lo tanto lejos de satisfacerse, de una tecnología multiparamétrica de alto rendimiento susceptible de automatización, no destructiva y que requiera un pequeño tamaño de muestra que la haga aplicable a un entorno de diagnóstico clínico, que permita la evaluación de respuestas inmunes en seres humanos. Esta necesidad es particularmente importante en vista de los patógenos emergentes y re-emergentes así como agentes de biorriesgo en los que son necesarios ensayos rápidos que proporcionen la imagen de la respuesta inmune y/o identifiquen la naturaleza de los patógenos. Ninguna de las metodologías descritas anteriormente proporciona una caracterización clara de la respuesta inmune cualitativa y cuantitativa contra un epítope antigénico. Con la excepción del modelado por ordenador, estos procedimientos no proporcionan el alto rendimiento, limitando su utilidad desde un punto de vista diagnóstico o de monitorización de la inmunidad.

La materia objeto de la presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona la identificación de péptidos inmunomoduladores y sus derivados, permitiendo por lo tanto la evaluación del tipo de respuesta inmune inducida en individuos sanos y enfermos con implicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas. Esta metodología también proporciona una medida tanto de la calidad como de la magnitud de la respuesta, identificando simultáneamente el epítope contra el que se genera esa respuesta.

En un aspecto, la presente invención es un procedimiento para evaluar respuestas inmunes específicas de antígeno, independientemente del tipo de respuesta inducida, permitiendo por lo tanto la evaluación del tipo de respuesta inmune inducida en individuos tanto sanos como enfermos. Esta metodología proporciona tanto una medida cualitativa como cuantitativa de la respuesta inmune, identificando simultáneamente el epítope contra el que se genera esa respuesta.

Los procedimientos de la presente invención son una combinación de tres tecnologías: cultivo celular de células inmunes de seres humanos o animales, presentación de material antigénico que no está limitado por el CMH, y análisis para determinar la presencia de citocinas y/o quimiocinas que proporcionen la capacidad de observar todas las variedades de respuestas inmunes. En una realización, las tres tecnologías implican el cultivo celular de células inmunes de seres humanos o animales, bibliotecas de péptidos solapantes, que no estén limitadas por el CMH y análisis múltiple para determinar la presencia de citocinas y/o quimiocinas. Preferentemente, la presente invención es un procedimiento multifásico para evaluar respuestas inmunes específicas de antígeno, en el que la primera fase es una exploración de alto rendimiento (Fase I) y la segunda fase proporciona la identificación de epítopes antigénicos específicos (Fase II):

Los procedimientos de la presente invención usan el análisis de cultivos celulares con múltiples tipos celulares presentes que son capaces del procesamiento, presentación y reconocimiento de diversos antígenos para epítopes tanto peptídicos como no peptídicos (por ejemplo, glicolípidos). Las células adecuadas para los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, células T, células B, células de dendríticas, monocitos, neutrófilos, mastocitos y eritrocitos. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas, incluyendo células T, células B, células NK y células T-NK proporcionan una fuente fácilmente obtenible de múltiples tipos celulares para su uso en la presente invención. Además, cualquier procedimiento normalizado conocido en la técnica para cultivar células humanas o animales que también contribuya a la producción de citocinas es adecuado para su uso en la presente invención.

En los procedimientos de la presente invención, puede usarse cualquier material antigénico para generar una respuesta inmune. Las fuentes de material antigénico adecuado para la presente invención incluyen antígenos, péptidos, proteínas, microbios, células, tejidos, tumores o cualquier combinación de los mismos. Los materiales antigénicos adecuados incluyen, pero sin limitación, composiciones que incluyen péptidos, glicopéptidos, fosfopéptidos, lípidos, glicolípidos y fosfolípidos.

En una realización, se usan bibliotecas de péptidos solapantes en la presente invención para identificar epítopes antigénicos en una proteína de interés y para estimular respuestas inmunes. Esta técnica proporciona la identificación de todos los epítopes posibles de Clase I y Clase II para cualquier antígeno dado y es adecuada para respuestas de células T tanto CD4 como CD8. Y la identificación de los epítopes no está limitada por el haplotipo de HLA.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de interés se divide en pequeños péptidos solapantes, por ejemplo, una serie de péptidos solapantes de 8 a 15 aminoácidos con, por ejemplo, desfases de 3 a 4 aminoácidos. De acuerdo con la presente invención, una biblioteca de péptidos solapantes puede prepararse o adquirirse de fuentes disponibles en el mercado. Por ejemplo, a partir de la proteína de la matriz flu que contiene 296 aminoácidos, puede prepararse una biblioteca de péptidos solapantes de 60 péptidos de 15 aminoácidos solapantes (con desfases de 4 aminoácidos).

A partir de la biblioteca de péptidos solapantes, se prepara un recipiente de cultivo celular con uno o más péptidos adheridos al recipiente de cultivo. En un procedimiento multifásico, se usan placas de cultivo de Fase I multipocillo con fines de exploración, conteniendo cada pocillo un grupo de varios péptidos solapantes. El número de péptidos solapantes por grupo y el número de grupos necesario para la exploración depende del tamaño de la propia proteína. Preferentemente, cada grupo contiene aproximadamente 5-10 péptidos solapantes; para una proteína de menor tamaño,

## ES 2 341 723 T3

aproximadamente 3-7 péptidos solapantes. En un procedimiento multifase, la biblioteca de péptidos solapantes para una proteína de interés se distribuye por grupos en placas de cultivo de Fase I de 96 pocillos preacondicionadas y codificadas con 5-10 péptidos por grupo por pocillo. Para la Fase II, los péptidos solapantes en un grupo reactivo se distribuyen como un solo péptido por pocillo. Las placas de cultivo de Fase I pueden prepararse por adelantado para maximizar el rendimiento y minimizar la variabilidad entre ensayos. Las placas preparadas por adelantado y almacenadas a -80°C tienen una vida útil de un año como mínimo. Y en la medida en que se descubra que grupos de Fase I específicos son antigénicos de forma repetida, también pueden prepararse placas de cultivo de Fase II por adelantado.

Para comenzar el ensayo de respuesta inmune de la presente invención, se añaden células inmunes de interés al recipiente de cultivo descrito anteriormente y se incuban durante un tiempo y en condiciones que faciliten la producción de citocinas en respuesta al péptido o péptidos antigénicos adheridos al recipiente de cultivo. Las células inmunes que pueden evaluarse usando esta metodología incluyen, pero sin limitación, CMSP, linfocitos, células T, células T CD4+, células T CD8+, células NK, células TNK, células TCR T, células B, monocitos, células dendríticas y granulocitos. En un procedimiento, se usan células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En el procedimiento multifase, por ejemplo, se siembran CMSP a  $2 \times 10^5$  por pocillo en una o más placas de cultivo de Fase I de 96 pocillos previamente acondicionadas y codificadas descritas anteriormente que contienen una biblioteca de péptidos solapantes del antígeno de interés con 5-10 péptidos por grupo por pocillo. Las células inmunes se incuban después en condiciones que faciliten la producción de citocinas, seleccionándose el medio de cultivo y las condiciones de temperatura e incubación para el tipo celular específico. Por ejemplo, las CMSP se incuban preferentemente durante 18-48 horas a 37°C en un medio completo como se describe en el Ejemplo 1. Después de la incubación, las células se sedimentan y los sobrenadantes se aíslan de cada pocillo y se analizan para determinar la presencia de una amplia diversidad de citocinas y quimiocinas. Con respecto a la presente invención como se describe en el presente documento, el término "citocinas" se usa para representar tanto citocinas como quimiocinas.

De acuerdo con la presente invención, puede usarse en la presente invención cualquier procedimiento conocido en la técnica que sea capaz de analizar simultáneamente los sobrenadantes para determinar la presencia de varias citocinas, preferentemente 20 o más citocinas, en la misma muestra. Dichos procedimientos incluyen espectroscopía de masas, matrices basadas en anticuerpos y tecnología de perlas de análisis múltiple. El análisis múltiple de citocinas se usa porque: i) permite la medición simultánea de múltiples parámetros inmunes, ii) requiere muestras de pequeño volumen, iii) proporciona un ensayo sensible que no destruye la muestra; iv) contribuye a la expresión coordinada de citocinas específicas características de respuestas inmunes especializadas, y v) proporciona una medida directa de los efectores inmunes. Un analizador múltiple de citocinas disponible en el mercado adecuado es la estación de trabajo Luminex 100 Cytokine Multiplex (Luminex Corp., Austin, Texas), que es capaz de medir simultáneamente hasta 100 analitos, requiere una muestra de pequeño volumen y detecta rápidamente la presencia de citocinas dentro de un intervalo dinámico de 1-32.000 picogramos por mililitro. La tecnología de matrices de múltiples citocinas (Luminex) permite la cuantificación simultánea de múltiples citocinas y quimiocinas en un volumen pequeño (Earley MC, Cytometry. 2002 Oct 15; 50(5): 239-42). El ensayo es de alto rendimiento por naturaleza y puede aplicarse al análisis de una amplia diversidad de muestras biológicas. Por análisis de la expresión coordinada de citocinas en respuesta a un estímulo o agresión patógena, pueden describirse biodistintos específicos de estado correspondientes a respuestas inmunes específicas.

En un procedimiento, se transfieren 50 microlitros de los sobrenadantes en formato de 96 pocillos a una estación de trabajo Luminex 100 Cytokine Multiplex (Luminex Corp., Austin, Texas) y se analizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes se exploran rápidamente por duplicado para determinar la presencia de una amplia diversidad de citocinas usando una mezcla madre de perlas múltiples y reactivos previamente preparada y validada.

En el procedimiento multifase, los grupos de antígenos que demuestran ser positivos para reactividad por análisis de citocinas de Fase I se descomponen en sus componentes peptídicos constituyentes para la identificación de péptidos antigénicos en una placa de cultivo de Fase II de focalización de epítipo como se ha descrito anteriormente. En un procedimiento, las placas de cultivo de Fase II están constituidas por tiras de pocillos previamente acondicionados y codificados que contienen los péptidos componentes individuales para cada grupo por duplicado. Se añaden las células inmunes de interés a las tiras de pocillos y se incuban durante un tiempo y en condiciones que faciliten la producción de citocinas en respuesta al péptido o péptidos antigénicos adheridos a la tira de pocillos. Por ejemplo, se añaden CMSP descongeladas a  $2 \times 10^5$  células por pocillo en las tiras de pocillos y se cultivan durante 18-24 horas a 37°C. Después de la incubación, las células se sedimentan, los sobrenadantes se aíslan y se analizan para determinar la producción de citocinas. En un procedimiento se transfieren 50 microlitros de los sobrenadantes a la estación de trabajo Luminex para su análisis. La exploración múltiple en Fase II para una tira de péptidos dada está constituida por la citocina o citocinas producidas en respuesta a su grupo precursor durante el análisis de Fase I. Los péptidos identificados en una exploración de Fase II representan epítopes antigénicos reconocidos por el individuo. El patrón característico de citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al péptido identificado es un indicio del tipo de respuesta especializada generada por ese epítipo.

Los procedimientos de la presente invención son un procedimiento de alto rendimiento para la identificación y caracterización rápidas de epítopes de células T específicos de péptido. Como se muestra en el presente documento, el desarrollo y la validación del ensayo han conducido a la identificación de un grupo selecto de citocinas y quimiocinas que permite la identificación de fenotipos de células de Tipo 1, Tipo 2 y T-Reguladoras.

Estos procedimientos de la presente invención tienen varias ventajas sobre la técnica existente incluyendo: a) alta sensibilidad: detección al nivel de picogramos por mililitro para todas las citocinas ensayadas; b) alto rendimiento: el ensayo puede completarse en 48 horas; c) análisis de múltiples analitos en un volumen pequeño de fluido biológico, por ejemplo, evaluación de al menos 30 citocinas y quimiocinas en un volumen de 50 microlitros; d) no son destructivos: permiten la adición de ensayos basados en células para el análisis de múltiples parámetros; y e) identificación de epítopes antigénicos de una forma independiente del haplotipo de HLA. Los procedimientos de la presente invención usan formación de múltiples citocinas para controlar los múltiples parámetros inmunes y por lo tanto son capaces de caracterizar la calidad de la respuesta inmune incluyendo, pero sin limitación, respuestas antigénicas, alérgicas y tolerogénicas. Controlando la respuesta coordinada de múltiples citocinas, la identificación y caracterización de epítopes antigénicos también es más sensible que las tecnologías del estado de la técnica actual. Ninguna de las tecnologías de la técnica actual en solitario o en combinación es capaz de proporcionar la evaluación multiparamétrica de citocinas y la identificación y caracterización de epítopes antigénicos que pueden proporcionar los procedimientos de la presente invención. Además, los procedimientos de la presente invención incluyen las ventajas de una tecnología de alto rendimiento. También debe señalarse que a diferencia de las tecnologías del estado de la técnica actual, los procedimientos de la presente invención no son destructivos para las células que se están analizando; por lo tanto, puede combinarse con varios inmunoensayos convencionales o habituales incluyendo, pero sin limitación, proliferación, tinción de citocinas intracelulares y de receptores superficiales, actividad de CTL y ELISPOT. Por último, los procedimientos de la presente invención requieren volúmenes mucho más pequeños de fluidos biológicos y/o sobrenadantes del cultivo y cantidades muchos menores de células para su análisis que cualquier otra tecnología actualmente disponible. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención son una tecnología no destructiva de pequeño volumen y alto rendimiento susceptible de automatización y, por lo tanto, práctica para uso clínico de diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

En un aspecto, la presente invención es un procedimiento que permite la identificación de péptidos inmunomoduladores y sus derivados, con aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas. (a) Diagnóstico: esta tecnología puede usarse para evaluar el estado inmune preexistente de pacientes. Mediante la identificación y caracterización de epítopes en una amplia diversidad de antígenos, puede determinarse una imagen clara del repertorio completo de células T para ese individuo. Esta tecnología es de alto rendimiento, susceptible de automatización, no destructiva y requiere un tamaño de muestra pequeño, haciendo que sea aplicable a un entorno de diagnóstico clínico. Puede usarse, por lo tanto, como herramienta en el diagnóstico de varias enfermedades autorreactivas y respuestas hiperinmunes incluyendo, pero sin limitación, alergia, diabetes, artritis, lupus y esclerosis múltiple. (b) Pronóstico: el estado inmune específico de epítope de un individuo antes del tratamiento según se evalúa mediante esta tecnología puede servir como indicador de pronóstico del resultado del tratamiento. Por lo tanto, el transcurso de la intervención terapéutica puede adaptarse para potenciar o eliminar este estado inmune. Esta tecnología puede usarse para evaluación de pronóstico de tratamientos de inmunoterapia antitumoral, trasplante de órganos, enfermedades alérgicas y autoinmunes. (c) Terapéutica: los procedimientos de la presente invención pueden usarse durante el transcurso del tratamiento como una herramienta de inmunomonitorización. Una imagen clara de la especificidad, magnitud y calidad de la respuesta inmune específica de epítope durante la terapia puede servir para evaluar la eficacia del tratamiento en curso. Basándose en datos de esta estrategia, los tratamientos pueden adaptarse para potenciar, modular o inhibir respuestas inmunes específicas. Por lo tanto, esta tecnología puede usarse para dirigir el tratamiento terapéutico en curso en las áreas de desarrollo de vacunas, inmunoterapia antitumoral, trasplante de órganos, enfermedades alérgicas y autoinmunes.

En otro aspecto, la presente invención puede ser útil en el diseño de nuevos fármacos incluyendo, pero sin limitación, vacunas, péptidos bioactivos y reactivos de direccionamiento. (a) Vacunas: los procedimientos de la presente invención puede facilitar enormemente el desarrollo de vacunas eficaces. Los epítopes antigénicos identificados usando esta tecnología pueden servir por sí mismos como vacunas eficaces para potenciar la respuesta inmune contra enfermedades infecciosas o cáncer, o para que se tolere la respuesta inmune contra proteínas para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, alergia o trasplante de órganos. (b) Péptidos bioactivos: se han descrito péptidos bioactivos generados por proteólisis de proteínas de mayor tamaño con funciones neuromoduladoras e inmunomoduladoras profundas. Con esta tecnología, pueden identificarse rápidamente péptidos con estas propiedades. (c) Reactivos de direccionamiento: pueden usarse péptidos bioactivos identificados usando esta tecnología que interactúan con receptores específicos en células como un reactivo de direccionamiento para suministrar fármacos a poblaciones celulares específicas.

Los procedimientos de la presente invención son adecuados para su uso en varias aplicaciones médicas incluyendo, pero sin limitación, infecciones crónicas, alergias, enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunes, enfermedad de Alzheimer, enfermedades infecciosas agudas, trasplante de órganos y aterosclerosis. Debe entenderse que estas aplicaciones pretenden ser representativas y que otras aplicaciones como se conocen en la técnica se contemplan como parte de la presente invención.

Infección crónica. Un número y diversidad asombrosa de enfermedades humanas se producen por una infección patogénica crónica. Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede diferir, todas ellas pueden caracterizarse por una incapacidad para generar una respuesta eficaz, de Tipo 1 o de Tipo 2, contra el patógeno. Una vez se genera una respuesta, el mimetismo de epítopes propios en proteínas asociadas a patógenos también puede inducir respuestas autoinmunes que persisten mucho después de que se elimine la infección, tales como artritis de Lyme y enfermedad desmielinizante asociada con Herpes. La aparición de reacciones autoinmunes después del reconocimiento inmune de patógenos hace que la selección de epítopes específicos sea crítica para una terapia segura y eficaz. Los estudios han implicado una activación inapropiada de la respuesta reguladora en algunas infecciones crónicas. Los procedimientos de la presente invención son adecuados para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas respecto

a infecciones crónicas. (a) Diagnóstico: ensayos de diagnóstico no invasivos para algunos agentes crónicamente infecciosos, tales como ensayos basados en PCR para VHB, demuestran una variabilidad extrema en el entorno clínico. Los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse al diagnóstico de una infección crónica a través de la rápida detección y caracterización de respuestas específicas contra péptidos asociados a patógenos. El diagnóstico de complicaciones autoinmunes asociadas con patógenos también puede facilitarse por medio del uso de esta tecnología. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención pueden usarse para detectar y caracterizar reactividad, de Tipo 1, de Tipo 2 o T-Reguladora, contra epítopes asociados a patógenos específicos que, a su vez, pueden servir como un indicador de pronóstico del desenlace de la enfermedad, guiando de este modo la terapia de antibióticos. Los procedimientos de la presente invención son adecuados para detectar y caracterizar la reactividad contra epítopes asociados a patógenos específicos que también puede servir como indicador de pronóstico en lo que se refiere a la aparición de una enfermedad autoinmune asociada con infección. (c) Terapéutico: la identificación y caracterización de epítopes antigénicos contra proteínas asociadas a patógenos por medio de la presente invención puede facilitar el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas seguras y eficaces. Esto incluiría la aplicación de vacunas que eviten mimetismo con epítopes propios. Las vacunas también incluirían la identificación de epítopes pan-variantes que se dirigen a epítopes invariantes dentro del proteoma del patógeno, proporcionando de este modo detección contra múltiples cepas del mismo patógeno así como variantes mutantes comunes de cada patógeno como en el caso de VIH y malaria. La identificación y eliminación de epítopes T-Reguladores y células de respuesta por medio de la aplicación de esta tecnología pueden desempeñar un papel en el inicio de una respuesta anti-patógeno protectora.

Alergia. Una alergia es una respuesta hiperinmune contra sustancias que generalmente no son perjudiciales. Se ha descrito que un cambio inapropiado a una respuesta de Tipo 2 desempeña un papel crítico en la generación de una respuesta inmune alérgica. Se han identificado muchos alérgenos incluyendo alérgenos de inhalación tales como ácaros del polvo, polen y mohos; alérgenos alimentarios tales como huevo, trigo, soja y frutos secos; o algunos fármacos tales como penicilina. El resultado puede ser una reacción grave, a menudo potencialmente mortal, denominada anafilaxis. Por lo tanto, sería ventajosa la activación de una respuesta T-Reguladora en el contexto de la alergia. (a) Diagnóstico: comúnmente se usa un ensayo cutáneo y ensayo sanguíneo tal como un nivel de IgE específica de alérgeno para identificar alérgenos. Sin embargo, un ensayo cutáneo puede ser peligroso para algunos pacientes que pueden experimentar anafilaxis. Los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse como una herramienta de diagnóstico segura para identificar epítopes alérgicos específicos de paciente. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de epítopes de alérgenos para un paciente de alergia individual. Esto es útil para controlar la respuesta inmune durante el tratamiento o el seguimiento. También pueden identificarse epítopes estimuladores T-Reguladores tolerogénicos después del tratamiento y pueden servir como indicador de pronóstico de la terapia con éxito. (c) Terapéutico: la identificación de un epítope antigénico puede conducir a una nueva vacuna basada en péptidos que puede usarse para cambiar una respuesta inmune a T-Reguladora o para eliminar o suprimir selectivamente células de Tipo 2 inapropiadas.

Enfermedades neoplásicas. La enfermedad neoplásica se define como un crecimiento descontrolado de células anormales que han mutado a partir de tejidos normales. Éstas incluyen cáncer, tumores sólidos y tumores malignos del sistema linfo/hematopoyético, denominándose todas en general tumores. Se ha notificado que el entorno del tumor induce una tolerancia inmune contra antígenos tumorales a través de varios mecanismos diferentes. Aunque el desarrollo de células T de Tipo 1 contra células tumorales está relacionado con la regresión o supresión del crecimiento tumoral, la respuesta inmune cambiada a tolerancia inhibe el desarrollo de células T de Tipo 1 específicas de cáncer. Sin embargo, en algunos cánceres, las respuestas T de Tipo 1 específicas de antígeno tumoral inducen una enfermedad autoinmune por mimetismo antigénico. Por ejemplo, se ha descrito que células T citotóxicas específicas contra CDR2, un antígeno tumoral de mama y ovario, inducen degeneración cerebelar paraneoplásica (PCD) en algunos pacientes.

La aparición de reacciones autoinmunes en el transcurso de la inmunidad antitumoral hace que la selección de epítopes específicos sea crítica para una terapia segura y eficaz. (a) Diagnóstico: el diagnóstico de complicaciones autoinmunes asociadas con tumores puede facilitarse mediante el uso de los procedimientos de la presente invención. (b) Pronóstico: la detección y caracterización de reactividad, de Tipo 1, de Tipo 2 o T-Reguladora, contra epítopes asociados a tumores específicos usando esta tecnología puede servir como un indicador de pronóstico de desenlace de la enfermedad. Los procedimientos de la presente invención permiten la evaluación de cualquier clase de tratamiento vacunal por comparación de la calidad y magnitud de respuestas inmunes específicas de tumor entre el estado previo a la vacuna y posterior a la vacuna. La detección y caracterización de reactividad contra epítopes asociados a tumores específicos usando esta tecnología puede servir como indicador de pronóstico en lo que se refiere a la aparición de una enfermedad autoinmune asociada a tumor. (c) Terapéutico: la identificación y caracterización de epítopes antigénicos contra proteínas asociadas a tumores por medio de la presente invención pueden facilitar el desarrollo de vacunas terapéuticas seguras y eficaces. Esto incluiría la aplicación de vacunas que eviten el mimetismo de epítopes propios.

Enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes pueden definirse como trastornos causados por una respuesta inmune contra los propios tejidos del cuerpo. Se cree que un cambio inapropiado lejos de una función T-Reguladora en el contexto de la presentación de autoantígenos es un factor crítico en la aparición y progresión de la enfermedad autoinmune. La naturaleza específica de la enfermedad resultante depende de la respuesta dominante. Por ejemplo, en el caso de la diabetes de Tipo 1, se han aislado en pacientes células de Tipo 1 que reconocen islotes pancreáticos. (Arif S, J Clin Invest. 2004 113: 451). Además, en pacientes de esclerosis múltiple, existen pruebas que indican que células T polarizadas de Tipo 1 reactivas con la proteína básica de mielina (PBM) experimentan activación *in vivo* y expansión clonal, que se ha descrito y desempeña un papel principal en la patogénesis. La restauración de

una función T-Reguladora sería crítica para la reconstitución de la homeostasis inmune normal. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de epítopes propios dominantes responsables de la expansión de un tipo dado de células inmunes autorreactivas. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de epítopes antigénicos propios para un paciente autoinmune individual. Esto es útil para monitorizar la respuesta inmune durante el tratamiento o seguimiento. También pueden identificarse epítopes estimuladores T-Reguladores Tolerogénicos después del tratamiento y pueden servir como indicador de pronóstico de una terapia con éxito. (c) Terapéutico: la identificación de un epítope antigénico puede conducir a una nueva vacuna basada en péptidos que puede cambiar la respuesta inmune a T-Reguladora o eliminar o suprimir selectivamente células de Tipo 1 o de Tipo 2 inapropiadas.

Enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (AD) es una forma lentamente progresiva de demencia, que es una disfunción progresiva adquirida de las funciones intelectuales. La AD se caracteriza por la deposición progresiva de la proteína beta amiloide de 42 restos (Abeta) en regiones cerebrales. Los informes indican que una proporción significativamente mayor de sujetos ancianos sanos y pacientes con AD tenía respuestas de células T reactivas con Abeta fuertes de carácter tanto de Tipo 1 como de Tipo 2 cuando se comparaba con adultos de la misma edad. (a) Diagnóstico: en muchos casos, el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Alzheimer y la demencia senil puede determinarse sólo de forma concluyente *post mortem*. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para identificar respuestas de células T reactivas con A beta que, por lo tanto, pueden servir como un indicador de diagnóstico de AD. (b) Pronóstico: la identificación de respuestas inmunes específicas por medio de la presente invención puede permitir la predicción del curso clínico de la enfermedad.

Infección aguda. La inducción de una respuesta de Tipo 1 contra patógenos es crítica para la recuperación de la infección de microbios intracelulares tales como bacterias y virus. Por el contrario, patógenos extracelulares tales como helmintos inducen al desarrollo de células de Tipo 2, cuyas citocinas dirigen la destrucción mediada por IgE y eosinófilos de patógenos. Algunos virus, tales como el virus Ébola o el virus del Dengue, causan enfermedades graves con alta tasa de mortalidad, para las que no se ha establecido una vacuna autorizada. En un modelo de ratón, se han autorizado vacunas con partículas similares a virus (PSV) derivadas de la glicoproteína (GP) del virus del Ébola y de la proteína de la matriz (VP40) para activar tanto células T como células B, y protegen de la exposición al virus. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para la identificación de nuevos epítopes que diagnostican la presencia de patógenos emergentes y reemergentes y agentes de biorriesgo. (b) Terapéutico: los procedimientos de la presente invención pueden identificar epítopes de células T para antígenos virales por exploración de pacientes recuperados de estas enfermedades. Por lo tanto, puede generarse nuevas vacunas basadas en péptidos contra infecciones víricas mortales agudas.

Trasplante de órganos. El rechazo de un trasplante de órganos es una respuesta hiperinmune generalmente dirigida por una respuesta de Tipo 1 dominante contra el órgano injertado o, como en el caso de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), contra el receptor. La función reguladora puede desempeñar un papel crítico en el desarrollo de la tolerancia y de la aceptación de injerto a largo plazo. Por lo tanto, sería ventajosa la activación de respuestas T-Reguladoras o la eliminación selectiva de respuestas de Tipo 1 dominantes en el contexto de trasplantes de órganos. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para determinar un patrón de reactividad inmune que puede ser predictivo del desarrollo de EICH aguda y más particularmente de EICH crónica. (b) Pronóstico: antes del trasplante o de la aparición después, la existencia de epítopes de Tipo 1 dominantes en muestras de donante o de receptor puede ser un indicador de pronóstico del rechazo de injertos y la presente invención es adecuada para determinar la presencia de epítopes de Tipo 1 dominantes. También pueden identificarse epítopes estimuladores T-Reguladores tolerogénicos por medio de la presente invención después del tratamiento y pueden servir como indicador de pronóstico de la tolerancia del injerto. (c) Terapéutico: la identificación de epítopes antigénicos por medio de la presente invención puede conducir a una nueva vacuna basada en péptidos que puede cambiar la respuesta inmune a T-Reguladora, o eliminar o suprimir selectivamente células de Tipo 1 inapropiadas.

Aterosclerosis. La aterosclerosis es un trastorno común de las arterias. La grasa, el colesterol y otras sustancias se acumulan en las paredes de las arterias y forman "ateromas" o placas. Actualmente se aprecia que están implicadas respuestas inmunes mediadas por células inflamatorias crónicas en la patogénesis de la aterosclerosis. La activación de células T en placas ateroscleróticas se describe que se inicia por antígenos derivados de placas, tales como LDL oxidada (oxLDL). Otros han informado de la detección de células T reactivas con *Chlamydia pneumoniae* en placas ateroscleróticas humanas de la arteria carótida. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para la identificación de patrones tempranos de reactividad inmune. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la medición cuantitativa de epítopes de antígenos relacionados con la patogénesis de la aterosclerosis tales como oxLDL o antígeno de *Chlamydia* con reactividad cruzada, que son reconocidos por células T. (c) Terapéutico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para determinar epítopes específicos que pueden usarse para desarrollar nuevas vacunas basadas en péptidos para prevenir la progresión de la aterosclerosis.

Debe entenderse que los ejemplos que se proporcionan a continuación son representativos de la invención y pretenden ser ilustrativos de la invención, pero no debe interpretarse que limitan el ámbito de la invención de ningún modo. Pueden realizarse modificaciones en las características del procedimiento de la invención sin alejarse del ámbito de la invención. Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que también pueden usarse procedimientos alternativos sin alejarse del ámbito de la invención. En particular, el procedimiento para medir la producción de citocinas presentado en los ejemplos es simplemente representativo y en la presente invención puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para medir concentraciones de citocinas.

## Ejemplo 1

Respuestas inmunes específicas de antígeno detectadas tan pronto como 48 horas por incubación simple de CMSP de donantes normales con un péptido viral. Para determinar si una respuesta inmune específica de antígeno puede detectarse mediante los procedimientos de la presente invención usando CMSP y un solo péptido, se incubaron CMSP recientes de un voluntario normal HLA-A0201+ con péptidos restringidos por HLA-A0201. Se sabía que el donante tenía células T CD8+ específicas de Flu-MP pero no células T CD8+ específicas de Mage 3 mediante otros procedimientos (no se muestran los datos).

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de sangre recién extraída de un voluntario sano HLA-A0201+ mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Se resuspendieron CMSP a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI complementado con suero AB humano inactivado por calor al 10% (Gemini Bio-Products), L-glutamina (2 mM), penicilina (200 UI/ml), estreptomycin (200  $\mu$ g/ml), piruvato sódico (1 mM), aminoácidos no esenciales al 1%, 2- $\beta$ -mercaptoetanol (50  $\mu$ M, Sigma) y HEPES pH 7,4 (25 mM, Gibco) (medio completo: MC). Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 1  $\mu$ l de péptidos restringidos por HLA-A0201 (concentración de solución madre 1 mg/ml, concentración de cultivo 10  $\mu$ g/ml); Flu-MP58-66 (GILGFVFTL), o MAGE-3271-279 (FLWGPRLV, MultiPeptide Systems, San Diego, CA), o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 horas después y se midieron las citocinas y quimiocinas con Luminex.

Las CMSP estimuladas con péptido Flu-MP inducían una gran serie de citocinas incluyendo IFN- $\gamma$  en 48 horas (no se muestran los datos). Los resultados demostraban que las CMSP recientes de un donante normal responden a péptido Flu-MP y producen una gran serie de citocinas y que esas respuestas inmunes específicas de antígeno pueden detectarse ya a las 48 horas por incubación simple de CMSP con un péptido.

## Ejemplo 2

Respuestas inmunes específicas de antígeno detectadas ya a las 48 horas para un amplio repertorio de células reactivas con péptido en CMSP que incluyen antígenos tumorales. Los antígenos virales son capaces a menudo de inducir respuestas de memoria más potentes que los antígenos tumorales. Para determinar si se pueden detectar respuestas inmunes específicas de antígeno tumoral por los procedimientos de la presente invención, las CMSP crioconservadas en nitrógeno líquido de 2 pacientes de melanoma que recibieron al menos 8 inyecciones de vacuna CD (CD derivadas de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ autólogas cargadas con 4 péptidos HLA-A2 de antígenos asociados con melanoma) se descongelaron con PBS fría. Después de un segundo lavado con PBS, se incubaron CMSP en MC durante 15 min a 37°C, y se retiraron los restos celulares con un filtro de células de nylon. Las células se lavaron de nuevo con MC y se resuspendieron en MC a  $1 \times 10^6$ /ml. Después, se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 1  $\mu$ l de cada péptido restringido por HLA-A0201: (concentración de solución madre 1 mg/ml, concentración de cultivo 10  $\mu$ g/ml); Flu-MP 58-66, CMV PP65 (NLVPMVATV, Biosynthesis, Lewisville, TX), MAGE-3 271-279, MART-1 27-35 (AAGIGILTV), gp100g209-2M (IMDQVPFSV), Tirosinasa 368-376 (YMDGTMSQV, NCI) o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 horas después y se midieron las citocinas producidas con tecnología de Luminex. Además, se realizó un ensayo ELISPOT para detección de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas de antígeno de acuerdo con el protocolo del fabricante (Mabtech). En resumen, se añadieron CMSP ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) a placas previamente recubiertas con 10  $\mu$ g/ml de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  primario (Mabtech, Stockholm, Suecia) en presencia o ausencia de péptidos 10  $\mu$ g/ml.

El paciente 1, que se sabía que tenía células T CD8+ para Flu-MP y CMV por ELISPOT de IFN- $\gamma$  directo (no se muestran los datos) demostró inducción de IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IP-10 en respuesta al péptido Flu-MP o CMV, pero no con 4 péptidos de melanoma (no se muestran los datos). Esto muestra que los péptidos de melanoma no modulan la respuesta inmune inespecíficamente. El paciente 2, que se demostró que tenía células T CD8+ específicas de MART-1, así como Flu-MP o CMV (no se muestran los datos), presentaba un ligero aumento de IL-1 $\alpha$  y un aumento marcado de IP-10 en respuesta al péptido MART-1, pero no con otros péptidos de melanoma (no se muestran los datos). Los resultados indican que las CMSP recientes de donante normal responden al péptido Flu-MP y producen IL-1 $\alpha$  e IP-10. Los perfiles de producción de citocinas/quimiocinas son diferentes entre dos donantes normales diferentes, lo que sugiere que con un ensayo EPIMAX pueden identificarse diferentes tipos de células T CD8+ que reconocen el mismo péptido Flu-MP. Dado el hecho de que IP-10 puede regularse positivamente en respuesta a IFN, las interacciones de CD-T pueden inducir la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células T, lo cual conduce a la producción de IP-10 a partir de CD. Por lo tanto, IP-10 podría ser un marcador útil para la respuesta de células T de Tipo 1.

## Ejemplo 3

La inducción de IP-10 en respuesta a péptido Mart-1 en un paciente de melanoma vacunado con CD CD34- cargadas con péptido depende de IFN- $\gamma$ . Para examinar si la producción de IP-10 depende de IFN- $\gamma$ , se estimularon CMSP obtenidas de un paciente con melanoma que se vacunó con CD-CD34- autólogas cargadas con péptidos de melanoma HLA-A2, con péptido MART-1 n° 6 (10  $\mu$ M) o péptido HLA-A2 Flu-MP (10  $\mu$ g/ml) en presencia de mAb de bloqueo anti-IFN- $\gamma$ R1. La producción de IP-10 se suprimía completamente por bloqueo de IFN- $\gamma$ R1 (no se muestran los datos). Por lo tanto, la producción de IP-10 dependía de la producción de IFN- $\gamma$ , indicando que IP-10 puede ser un marcador sustituto para la producción de IFN- $\gamma$ .

## ES 2 341 723 T3

Se sembraron CMSP criopreservadas descongeladas en nitrógeno líquido de dos pacientes con melanoma que recibieron al menos 8 inyecciones de vacuna de CD (CD derivadas de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ autólogas cargadas con (4) péptidos HLA-A2 de antígenos asociados con melanoma) por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de cada péptido restringido por HLA-A0201: Flu-MP<sub>58-66</sub>, CMV PP65 (NLVPMVATV), MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV), MART-1<sub>27-35</sub> (AAGIGILTV), gp100<sub>209-2</sub> M (IMDQVPFSV), Tirosinasa<sub>368-376</sub> (YMDGTMSQV) o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O); y se recogieron los sobrenadantes de cultivo 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. Se realizó un ensayo ELISPOT para la detección de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas de antígeno en el que se añadieron CMSP (2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) a placas previamente recubiertas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  primario en presencia o ausencia de péptidos a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados demostraron que se identificó un amplio repertorio de células reactivas con péptido en CMSP por el procedimiento de la presente invención.

### 15 Ejemplo 4

Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de una secuencia peptídica específica reconocida por células T. Para determinar si un epítipo o epítopos antigénicos reconocidos por células T y una respuesta inmune inducida por ese epítipo pueden identificarse con los procedimientos de la presente invención, se incubaron 5 grupos de péptidos constituidos por 4-7 péptidos de la biblioteca de péptidos MART-1 de 15 aminoácidos con CMSP obtenidos de un paciente con melanoma HLA-A0201+ que recibió una vacuna de CD-CD34-. Se diseñaron péptidos solapantes de 15 aminoácidos con desfase de (4) aminoácidos para abarcar la secuencia de aminoácidos completa de MART-1 (Mimotopes, San Diego, CA). Cada péptido se reconstituyó con Acetonitrilo al 50% a 2 mM y se mantuvo a -80°C hasta el uso. Se obtuvieron CMSP de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Se sembraron 4-5 péptidos agrupados (1  $\mu\text{l}$  por péptido) o péptido individual (1  $\mu\text{l}$ ) en placas de 96 pocillos por triplicado y se secaron a temperatura ambiente. Después, se añadieron 2 x 10<sup>5</sup> CMSP en 200  $\mu\text{l}$  de MC a cada pocillo y se incubaron durante 48 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% humidificado. Los niveles de citocinas o quimiocinas en sobrenadante de cultivo se midieron con Luminex.

Se descubrió que se detectaba una cantidad significativamente superior de IP-10 en el cultivo del grupo n° 1. Después, se preparó un segundo cultivo de CMSP con un solo péptido de la biblioteca MART-1 para identificar el péptido responsable dentro del grupo n° 1. El péptido n° 6 inducía IP-10 marcado, indicando que este péptido es el epítipo para las células T de pacientes con melanoma. Curiosamente, este péptido contiene la secuencia del epítipo dominante de HLA-A0201 (MART-127-35; AAGIGILTV). Se obtuvieron CMSP de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Este paciente es HLA-A\*0201<sup>pos</sup> y se demostró que tenía células T CD8+ específicas de MART-1 que reconocen el epítipo dominante restringido por HLA-A\*0201 (MART-1<sub>26-35</sub>) con ensayo de unión de tetrámeros (no se muestran los datos). Cuando se cultivaron CMSP con este péptido MART-1 dominante de HLA-A\*0201, se indujeron específicamente dos citocinas, IL-1 $\alpha$  e IP-10, pero no se observó regulación positiva de IFN- $\gamma$  (no se muestran los datos). Dado que IP-10 se secreta por muchos tipos celulares en respuesta a interferones de tipo I o de tipo II, se supuso que IP-10 se producía en respuesta a IFN- $\gamma$  secretado de células T específicas de MART-1. Por consiguiente, la producción de IP-10 se suprimía completamente por bloqueo de la función de IFN- $\gamma$  (Figura 4C). Los resultados indican que la inducción de IP-10 en respuesta al péptido MART-1 en el paciente con melanoma vacunado con CD CD34- cargadas con péptido depende de IFN- $\gamma$ .

Para comprobar si las CMSP de este paciente contienen células T CD8+ que reconocen este epítipo dominante, se cultivaron CMSP con CD derivadas de monocitos autólogas cargadas con MART-127-35 u otros péptidos de HLA-0201 (por ejemplo, Mage-3, Tirosinasa y Flu-MP) y se examinaron para determinar la inducción de una población de células T CD8+ específicas de antígeno con tetrámeros específicos. Como se muestra en las Figuras 4B-4E, las células T CD8+ específicas de MART-1 se expandieron fácilmente en 7 días, indicando que este paciente tiene células T CD8+ de memoria o efectoras para MART-1 y que esta población de células T CD8+ se reconocía de acuerdo con procedimientos de la presente invención con la biblioteca MART-1.

### 55 Ejemplo 5

Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes. Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación simultánea de epítopos para respuesta inmune así como el tipo de respuesta inducida. De acuerdo con los procedimientos generales proporcionados en el Ejemplo 4, se incubaron CMSP de pacientes con melanoma antes de la vacuna o después de la vacuna con grupos de 5-6 péptidos de bibliotecas de péptidos MART-1 o NY-ESO1 durante 48 horas (MART-1 con 5 grupos; NY-ESO1 con 8 grupos). Se mostró que los resultados típicos representan distintivos de perfiles de citocinas correspondientes a diferentes respuestas inmunes (no se muestran los datos). Los grupos de péptidos que presentaban el patrón de cada respuesta inmune se muestran en barras grises. En una respuesta de Tipo 1, la producción de IL-10 se suprime y la de IP-10 se induce. Por el contrario, en una respuesta T-Reguladora, se induce más IL-10 y la producción de IP-10 se suprime debido a la inhibición de respuestas de Tipo 1. Se detectan IL-13 y eotaxina en respuestas de Tipo 2 sin afectar al nivel de IP-10. Por lo tanto, la presente invención identifica diversos tipos de respuestas inmunes inducidas por cualquier clase de antígenos ya a las 48 horas. Se estimularon 2 x 10<sup>5</sup> CMSP recientes de un donante HLA-A0201+ con Flu-

## ES 2 341 723 T3

MP58-66 restringido por HLA-A0201, Mage3271-279 o diluyente por triplicado durante los periodos indicados. Se midieron las citocinas en el sobrenadante de cultivo con un ensayo múltiple de citocinas basado en perlas. Se muestran la media  $\pm$  DT a partir de los datos por triplicado. Este resultado muestra que la producción específica de péptido de IL-1 $\alpha$  e IP-10 alcanzaba una meseta a las 48 h de la estimulación con péptido.

5

### Ejemplo 6

Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de otros tipos de respuestas inmunes inducidas por células no T. Se sabe que péptidos de 15 aminoácidos son reconocidos por otras células inmunes, tales como células B, células NK o células T-NK y que algunos péptidos se unen a un receptor no identificado, conduciendo a la modulación de respuestas inmunes. Se usó otro ejemplo de la presente invención para identificar una respuesta inmune inducida por células no T con un péptido que presentaba un distintivo regulador en una no restringida por CMH. Se incubaron CMSP de un paciente con melanoma con grupos de péptidos de una biblioteca de survivina. Como se muestra en las Figuras 6A-6H, el péptido n° 15 del grupo de survivina n° 3 inducía un fuerte patrón regulador de producción de citocinas. En concreto, se indujo intensamente IL-10 e IL-1 $\beta$ , e IL-1 $\alpha$  e IP-10, que son marcadores para respuestas de Tipo 1, se suprimieron intensamente.

Para determinar si esta respuesta está restringida a un tipo determinado de molécula de CMH, se incubaron CMSP obtenidas de sangre reciente tomada de 5 voluntarios sanos normales con péptido de survivina n° 15 durante 48 horas y se midieron las concentraciones de citocinas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. El péptido n° 15 inhibía la producción de IP-10 en los cinco voluntarios normales (no se muestran los datos), indicando que este péptido no está restringido a un subtipo de HLA determinado. Se demostró que el péptido de survivina n° 15 tenía una fuerte capacidad para modificar la respuesta inmune ya que las CMSP de un paciente con melanoma estimuladas con virus de la gripe vivo en presencia de péptido n° 15 presentaba una fuerte supresión de la inducción de IP-10, aparentemente debida a la producción de IL-10 (no se muestran los datos). Además, el péptido n° 15 inhibía parcialmente la proliferación de células T inducida por TSST-1 (no se muestran los datos). Los estudios de disminución mostraban que las células CD56+ eran responsables de la producción de IL-10 y del bloqueo de IP-10 (no se muestran los datos), indicando que el péptido de survivina n° 15 actúa sobre la célula NK, NK-T o la población de células T gamma/delta. También se mostró que el péptido n° 15 mantiene la supervivencia de células NK CD3-CD56+ (no se muestran los datos). Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención son útiles para la identificación de cualquier clase de modulación inmune inducida por ciertos tipos de péptido.

### Ejemplo 7

Los procedimientos de la presente invención permiten la inmunomonitorización del paciente con melanoma durante la vacunación. Se sembraron células a  $2 \times 10^5$  por pocillo en placas de cultivo de Fase I de 96 pocillos previamente acondicionadas y codificadas. Las placas de cultivo de Fase I contienen 5 grupos de péptidos cada una de los antígenos tumorales GP100, MAGE3, NY-ESO y MART-1, por cuadruplicado con 12 péptidos solapantes de 15 aminoácidos de longitud cada uno, por grupo, así como controles de células KLH y Colo destruidas. Las placas pueden prepararse por adelantado para maximizar el rendimiento y minimizar la variabilidad entre ensayos. Las células se incubaron durante 5 días a 37°C. En paralelo, se cultivaron células diseñadas para la reestimulación durante 7 días en presencia de CD maduras autólogas cargadas con el espectro completo de grupos de péptidos antigénicos a una proporción de 30:1 de CMSP respecto a CD. El séptimo día, estas células se lavaron exhaustivamente y se transfirieron a una placa de cultivo de Fase I durante 24 horas. Después de la incubación, estas células reestimuladas se sedimentan y se transfieren 150 microlitros de cada sobrenadante en un formato de 96 pocillos a una estación de trabajo Luminex 100 Cytokine Multiplex totalmente automatizada equipada con un procesador de muestras robótico TECAN Genesis RPS (TECAN).

50

Puede usarse una estación de trabajo capaz de un procesamiento de muestra independiente de operario con identificación por código de barras y análisis de microplacas aleatorio. Los sobrenadantes se exploran rápidamente por duplicado para determinar la presencia de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-10 y Granzyme-B usando una mezcla madre de múltiples perlas y reactivos previamente preparados y validados. Las muestras de sobrenadantes restantes se congelan para un análisis posterior. Se prevé que las CD del co-cultivo pueden contribuir a la producción de citocinas de fondo durante la incubación de 24 horas en la placa de Fase I. Por lo tanto, los sobrenadantes de CD maduras sirven como control en el análisis múltiple de citocinas. Las células del ensayo de estimulación primario se centrifugan y se resuspenden en medios que contienen H3 timidina y se incuban a 37°C. Después de 5 días, se evalúa la proliferación específica de antígeno por cuadruplicado mediante un ensayo de incorporación de timidina. Los sobrenadantes del ensayo de estimulación primarios se congelan a -80°C para el análisis en una fecha posterior. Esos grupos de péptidos que son positivos para la producción de citocinas después de la reestimulación, se exploran para la producción de citocinas durante la estimulación primaria.

Grupos de antígenos tumorales que demostraron ser positivos para la reactividad por una serie múltiple de citocinas de Fase I se descomponen en sus componentes constituyentes para la identificación de péptidos antigénicos en placas de cultivo de Fase II. Las placas de cultivos de Fase II incluyen tiras de pocillos que contienen los 12 péptidos componentes para cada grupo por duplicado. Se preparan tiras de pocillos de péptido de Fase II por adelantado y se colocan en marcos marcados con códigos de barras. Se co-cultivan CMSP descongeladas durante 7 días a 37°C con

## ES 2 341 723 T3

CD maduras autólogas cargadas con el grupo de péptidos específico identificado en Fase I, se lavan y se transfieren a una placa de cultivo de Fase II durante 24 horas a  $2 \times 10^5$  por pocillo. Después de la incubación, las células se sedimentan y se transfieren 150 microlitros de los sobrenadantes a la estación de trabajo Luminex para su análisis. La exploración múltiple en Fase II para una tira de péptidos dada está constituida por la citocina o citocinas producidas en respuesta a su grupo precursor durante el análisis de Fase I. Las CD maduras en solitario sirven como un control de fondo para el análisis de Fase II. Una vez que se identifican el péptido o péptidos antigénicos de un grupo dado se usan para aislar las poblaciones efectoras específicas de antígeno.

La monitorización de Fase III está constituida por la identificación y caracterización de células efectoras específicas de péptido. En este procedimiento, se descongelan  $2 \times 10^6$  CMSP y se incuban durante 7 días a  $37^\circ\text{C}$  con CD maduras autólogas cargadas con cada péptido antigénico aislado en Fase II. Después, las células se lavan y se someten a una reestimulación de 24 horas. Después de la reestimulación, las células se tratan con brefeldina-A, se fijan, se permeabilizan y se tiñen con un panel de anticuerpos para caracterizar tanto el marcador de superficie como la expresión de citocinas intracelulares. La identificación de poblaciones efectoras específicas de antígeno se efectúa mediante análisis citométrico de flujo multicolor usando un citómetro/separador de flujo FACSaria (Becton-Dickinson), capaz del análisis y la separación de 9 colores. La función de CTL de células T estimuladas se determina *in vitro* mediante un ensayo de liberación de Cr51 usando B-LCL autólogos transformados con EBV cargados con péptido como dianas. Después de la identificación, las poblaciones de células efectoras específicas de antígeno se subclonan por co-cultivo durante 7 días con CD maduras autólogas cargadas con péptido antigénico en presencia de IL-2 e IL-6, seguido de reestimulaciones semanales con CD maduras cargadas con péptido en presencia de IL-2 e IL-7. Una vez establecidas poblaciones de células efectoras clonales, se emprende una caracterización exhaustiva de los patrones de expresión génica y de la función citotóxica.

### 25 Ejemplo 8

Los procedimientos de la presente invención permiten la selección de epítopes vacunales en cáncer. La detección y caracterización de reactividad de Tipo 1, Tipo 2 o T-Reguladora contra epítopes asociados a tumores específicos usando esta tecnología puede servir como una herramienta para la identificación y caracterización de epítopes antigénicos contra proteínas asociadas a tumores que generan un tipo de respuesta inmune deseada cuando se usan para vacunación.

Para seleccionar epítopes vacunales, se exponen CMSP de un paciente a una serie de bibliotecas de péptidos que representan epítopes antigénicos de proteínas asociadas a tumores. Después de un cultivo de 48 horas, los sobrenadantes se recogen y las citocinas secretadas se analizan de acuerdo con la enseñanza de la presente invención. Se identifican grupos de péptidos que inducen una respuesta de células T Tipo 1, por ejemplo, la producción de IFN- $\gamma$  pero no la producción de IL-10 (respuesta T-Reguladora) o citocinas de Tipo 2. En la siguiente etapa, los péptidos correspondientes a un tipo de HLA de paciente dado pueden seleccionarse adicionalmente y usarse para la vacunación de este paciente particular. Por lo tanto, con la presente invención pueden determinarse agentes para la vacunación adaptados para producir un tipo de respuesta inmune deseada en un paciente.

### Ejemplo 9

Los procedimientos de la presente invención permiten la selección de epítopes vacunales en enfermedades infecciosas. Se sabe que muchas de las vacunas disponibles actualmente contra agentes microbianos no confieren inmunidad protectora, por ejemplo, vacuna del virus del Dengue. La ausencia de la inmunidad protectora puede deberse a la inducción de una respuesta inmune inapropiada, por ejemplo, algunos de los epítopes vacunales actuales pueden inducir células T de Tipo 2 o T-Reguladoras o lugar de células T de Tipo 1, desviando y/o inhibiendo por lo tanto la respuesta inmune hacia una respuesta no protectora. En este ejemplo, la tecnología de la presente invención puede servir como herramienta para la identificación y caracterización de epítopes antigénicos de antígenos asociados a microbios que generan un tipo de respuesta inmune deseada cuando se usan para vacunación.

Para seleccionar epítopes vacunales, se exponen CMSP de un paciente a una serie de bibliotecas de péptidos que representan epítopes antigénicos de un microbio, por ejemplo, el virus del Dengue. Después de un cultivo de 48 horas, los sobrenadantes se recogen y las citocinas secretadas se analizan de acuerdo con la enseñanza de la presente invención. Se identifican grupos de péptidos que inducen una respuesta de células T de Tipo 1, por ejemplo, la producción de IFN- $\gamma$  pero no la producción de IL-10 (respuesta T-Reguladora) o citocinas de Tipo 2. En la siguiente etapa, se seleccionan adicionalmente péptidos y se usan para la vacunación. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención permiten la selección de epítopes que permiten la inducción de una inmunidad antimicrobiana protectora tras la vacunación.

La Figura 1 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un donante normal, evaluada de acuerdo con la presente invención, en la que se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de sangre recién extraída de un voluntario sano HLA-A0201+, se sembraron a  $2 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con  $1 \mu\text{l}$  de péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) o MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRALV), o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O) y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas

## ES 2 341 723 T3

usando tecnología Luminex. Los resultados indican que las CMSP recientes del donante sano responden al péptido Flu-MP y producen una gran serie de citocinas.

La Figura 2 es una gráfica que representa otro ejemplo de respuesta inmune contra péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) en un donante normal de acuerdo con la presente invención. Se aislaron CMSP de sangre recién extraída de otro voluntario sano HLA-A0201<sup>+</sup>, se sembraron a  $5 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con  $10 \mu\text{g/ml}$  de péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) o MART-1<sub>27-35</sub> (AAGIGILTV), o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. Los resultados indican que las CMSP recientes del donante normal responden al péptido Flu-MP y producen IL-1 $\alpha$  e IP-10. Los perfiles de producción de citocinas/quimiocinas son diferentes entre dos donantes normales diferentes, sugiriendo que pueden identificarse diferentes tipos de células T CD8<sup>+</sup> que reconocen el mismo péptido Flu-MP con el ensayo EPIMAX.

Las Figuras 3A-3D son gráficas que representan la respuesta inmune de 2 pacientes de melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. En las Figuras 3A y 3C, para el Paciente 1 y 2 respectivamente, se sembraron CMSP criopreservadas en nitrógeno líquido descongeladas de 2 pacientes con melanoma que recibieron al menos 8 inyecciones de vacuna de CD (CD derivadas de células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> autólogas cargadas con cuatro péptidos HLA-A2 de antígenos asociados con melanoma) por triplicado en placas de 96 pocillos del fondo redondo y se incubaron con  $10 \mu\text{g/ml}$  de cada péptido restringido por HLA-A0201: Flu-MP<sub>58-66</sub>, CMV PP65 (NLVPMVATV), MAGE-3<sub>271-279</sub> (FLWGPRLV), MART-127-35 (AAGIGILTV), gp100<sub>g209-2</sub> M (IMDQVPFSV), Tirosinasa<sub>368-376</sub> (YMDGTMSQV) o diluyente de péptido (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. En las Figuras 3B y 3D para el Paciente 1 y 2, respectivamente, se realizó un ensayo ELISPOT para detección de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas de antígeno, en el que se añadieron CMSP ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) a placas previamente recubiertas con  $10 \mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  primario en presencia o ausencia de péptidos a  $10 \mu\text{g/ml}$ . Los resultados indican que se identificó un amplio repertorio de células reactivas con péptido en CMSP mediante el procedimiento de la presente invención.

Las Figuras 4A-4C son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Para la Figura 4A se obtuvieron CMSP de un paciente con melanoma HLA-A\*0201<sup>pos</sup> que recibió vacunas de CD y se estimularon con CD autólogas cargadas con péptido MART-1 dominante restringido por HLA-A\*0201 (MART-1<sub>26-35</sub>). Se demostró que el paciente tenía células T CD8<sup>+</sup> específicas de MART-1 que reconocen epítipo dominante restringido por HLA-A\*0201 (MART-1<sub>26-35</sub>) con ensayo de unión de tetrámeros (Figura 4A). Cuando se cultivaron CMSP directamente con este péptido MART-1 dominante HLA-A\*0201 se indujeron específicamente dos citocinas, IL-1 $\alpha$  e IP-10, pero no se observó regulación positiva de IFN- $\gamma$  (Figura 4B). Dado que IP-10 se secreta por muchos tipos celulares en respuesta a interferones de tipo I o de tipo II, se supuso que IP-10 se producía en respuesta a IFN- $\gamma$  secretado a partir de células T específicas de MART-1. Por consiguiente, la producción de IP-10 se suprimió completamente por bloqueo de la función de IFN- $\gamma$  usando mAb de bloqueo de IFN $\gamma$ R (Figura 4C). Los resultados indican que la inducción de IP-10 en respuesta a péptido MART-1 en el paciente con melanoma vacunado con CD34-CD cargadas con péptido depende de IFN- $\gamma$ .

La Figura 5 es una gráfica que representa la cinética en la respuesta inmune de un donante normal evaluada de acuerdo con la presente invención. Se estimularon  $2 \times 10^5$  CMSP recientes de un donante HLA-A0201<sup>+</sup> con péptidos restringidos por HLA-A0201 Flu-MP<sub>58-66</sub> o Mage3<sub>271-279</sub>, o diluyente, por triplicado durante los periodos indicados. Se midieron las citocinas en el sobrenadante de cultivo con un ensayo múltiple de citocinas basado en perlas. Se muestran las medias  $\pm$  DT de datos por triplicado. Estos resultados muestran que la producción específica de péptido de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en un ensayo EPIMAX alcanzaba una meseta a las 48 h de la estimulación con péptido.

La Figura 6 representa el esquema de la focalización de epítopes de acuerdo con la presente invención. En primer lugar, se dividen bibliotecas de péptidos solapantes de 15 aminoácidos que codifican proteínas antigénicas en grupos de péptidos (5-10 péptidos/grupo) por duplicado. Primero se estimulan  $5 \times 10^5$  CMSP con cada grupo de péptidos (Análisis de Grupos). Se miden múltiples citocinas en el sobrenadante de cultivo con un ensayo múltiple de citocinas basado en perlas y se determina un grupo "de éxito". En un segundo cultivo, de Focalización de Epítopes, se cultivaron CMSP con péptidos individuales del grupo "de éxito" durante 48 h, y posteriormente se determinó el péptido antigénico con un análisis de múltiples citocinas.

La Figura 7 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de epítopes reconocidos por células T específicas. Se obtuvieron CMSP a partir de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Este paciente es HLA-A\*0201<sup>pos</sup>, y se demostró que tenía células T CD8<sup>+</sup> específicas de MART-1 que reconocían un epítipo dominante restringido por HLA-A\*0201 (MART-1<sub>26-35</sub>) con un ensayo de unión de tetrámeros (Figura 4A). Se sembraron péptidos solapantes de 15 aminoácidos con desfases de 4 aminoácidos que abarcaban la secuencia de aminoácidos completa de MART-1 como 4-6 péptidos agrupados ( $10 \mu\text{M}$  por péptido) o un solo péptido ( $10 \mu\text{M}$ ) por triplicado en placas de 96 pocillos; y se añadieron  $2 \times 10^5$  células CMSP en  $200 \mu\text{l}$  de MC a cada pocillo y se incubaron durante 48 horas a 37 grados C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% humidificado; y los niveles de citocinas o quimiocinas en el sobrenadante de cultivo se midieron con Luminex. Como se muestra en la Figura 7, el péptido MART-1 n° 6 induce una fuerte producción de IP-10 en CMSP obtenidas de un paciente con melanoma vacunado. El péptido MART-1 n° 6 contiene un epítipo

## ES 2 341 723 T3

dominante HLA-A2 de 10 aminoácidos, como se representa en la Figura 4A. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de respuestas de células T específicas de péptido.

La Figura 8 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP se obtuvieron a partir de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Este paciente es HLA-A-\*0201<sup>pos</sup> y se mostró que tenía células T CD8+ específicas de MART-1 que reconocían un epítipo dominante restringido por HLA-A\*0201 (MART-126-35) con un ensayo de unión de tetrámeros (Figura 4A). Se estimularon CMSP durante 48 h con péptido A2-MART-1 o péptido MART-1 de 15 aminoácidos n° 6 en presencia de mAb de bloqueo IFN $\gamma$ R (20  $\mu$ g/ml) o mAb de control. Como péptidos de control se usaron el péptido A2-HIVpol y el péptido MART-1 n° 15 de 15 aminoácidos. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en el sobrenadante de cultivo. Este resultado indica que la producción tanto de IL-1 $\alpha$  como de IP-10 depende de la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células T específicas de péptido, demostrando que IL-1 $\alpha$  e IP-10 son marcadores sustitutos para respuesta de células T de Tipo 1, es decir, células Th1 y Tc1.

La Figura 9 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. CMSP obtenidas de pacientes con melanoma se estimularon durante 48 h con grupos de péptidos solapantes o péptidos individuales que codifican antígenos de melanoma. Los niveles de citocinas/quimiocinas en los sobrenadantes de cultivo a las 48 horas de cultivo se midieron con Luminex. Este resultado indica que el concepto de focalización de epítopes puede aplicarse a cualquier antígeno y a cualquier citocina en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 10 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma que se evaluó de acuerdo con la presente invención. CMSP obtenidas de un paciente con melanoma que recibió series de vacunación con CD se estimularon con grupos de péptidos solapantes o péptidos individuales que codificaban MART-1, un antígeno de diferenciación de melanoma. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en los sobrenadantes de cultivo a las 48 h de cultivo. Con el análisis de grupos (parte superior), los grupos n° 2 y n° 3 inducían la regulación positiva de IL-1 $\alpha$  e IP-10. Con la focalización de epítopes (parte inferior), el péptido n° 6 del grupo n° 2 y el péptido n° 13 del grupo n° 3 se identificaron como epítopes para células T específicas. Este resultado indica que el procedimiento de la presente invención permite la identificación de epítopes para células T específicas capaces de generar IFN- $\gamma$ .

La Figura 11 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se obtuvieron CMSP del mismo paciente que el de la Figura 10 con una leucoféresis, se realizaron alícuotas en criotubos y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el uso. Se estimularon CMSP descongeladas con péptido n° 6, de 15 aminoácidos MART-1, péptido n° 13 o diluyente. Este experimento se repitió tres veces por separado. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en los sobrenadantes de cultivo a las 48 h de cultivo. Tres de 3 experimentos pusieron de manifiesto regulación positiva de IL-1 $\alpha$  e IP-10 tras la estimulación con péptido n° 6 o n° 13, demostrando una alta reproducibilidad de este ensayo EPIMAX.

La Figura 12A es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se estimularon CMSP obtenidas antes de la vacunación con CD y después de 8 vacunaciones con CD a partir de un paciente con melanoma (el mismo de la Figura 10) con péptidos MART-1 de 15 aminoácidos individuales o diluyente. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en los sobrenadantes de cultivo a las 48 h de cultivo. Aunque las CMSP posteriores mostraban regulación positiva de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en respuesta a dos (2) péptidos de 15 aminoácidos identificados, péptido n° 6 y n° 13, las CMSP anteriores no regulaban positivamente IL-1 $\alpha$  e IP-10 en respuesta al péptido n° 13. La producción de IL-1 $\alpha$  e IP-10 a partir de CMSP anteriores en respuesta al péptido n° 6 era menor que la de las CMSP posteriores. Esto resultado sugiere que la vacunación con CD inducía respuesta de células T específicas de péptido n° 13 y potenciaba respuestas de células T específicas de péptido n° 6. Para examinar esta hipótesis, se usó una metodología bien establecida diferente, el ensayo de detección de citocinas intracelulares. Las mismas CMSP se estimularon durante 8 h con péptidos individuales de 15 aminoácidos MART-1 en presencia de mAb anti-CD28/CD49d y monensina. Después de la permeabilización de la membrana celular, las células se tiñeron con mAb anti-IFN- $\gamma$  y las poblaciones de IFN- $\gamma$ + se analizaron con un citómetro de flujo (Figura 12B). Aunque aproximadamente un 0,15% de células CD8+ producían IFN- $\gamma$  en respuesta al péptido n° 6 o n° 13 en CMSP posteriores, no se detectó producción de IFN- $\gamma$  en CMSP anteriores. Estos resultados demuestran que EPIMAX puede usarse para controlar la respuesta de células T específicas de antígeno en pacientes con cáncer y sugiere que la magnitud de cada respuesta de células T específica es predecible observando la magnitud de la modulación de citocinas/quimiocinas en EPIMAX.

La Figura 13 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. El CFSE (éster succinimidílico de diacetato de 5,6-carboxifluoresceína) es un colorante indicador que permite identificar el número de divisiones celulares con un citómetro de flujo. Como el EPIMAX es un ensayo no destructivo, los presentes inventores combinaron la tecnología de EPIMAX y CFSE para determinar la capacidad proliferativa de células T específicas de antígeno. Se confirmó que la tinción con CFSE no altera la producción de citocinas en EPIMAX. CMSP obtenidas del mismo paciente con melanoma (el mismo de la Figura 10) se tiñeron primero con 1  $\mu$ M de CFSE y se estimularon con grupos de péptidos solapantes o péptidos individuales que codifican MART-1. El día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de células T en respuesta a la estimulación con péptido. La figura muestra el análisis de la proliferación de células T CD8+. El grupo n° 2 y n° 3 de MART-1 y el péptido n° 6 y n° 13 inducían dilución de la intensidad de CFSE en algunas poblaciones de células T CD8+, demostrando que la estimulación con péptido inducía la proliferación de células T

## ES 2 341 723 T3

CD8+ específicas de antígeno. Este resultado indica que la combinación con otras metodologías permite obtener una caracterización más fenotípica y/o funcional de células T específicas de antígeno.

5 La Figura 14 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. CMSP obtenidas del mismo paciente con melanoma (el mismo de la Figura 10) se tiñeron primero con una concentración 1  $\mu$ M de CFSE y se estimularon con péptidos individuales que codifican MART-1 por triplicado. El día 8 del cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de células T en respuesta a la estimulación con péptido. La figura muestra el porcentaje de poblaciones de células T CD8+ diluidas con CSFE dentro de las poblaciones de células T CD8+. El péptido n° 6 y n° 13 MART-1 inducían dilución de la intensidad de CFSE en algunas poblaciones de células T CD8+, demostrando que la estimulación con péptido inducía la proliferación de células T CD8+ específicas de antígeno.

15 La Figura 15 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las células T CD8+ reconocen un péptido de 8-10 aminoácidos en el contexto de moléculas del CMH de Clase I expresadas en células presentadoras de antígeno. Para determinar el epítipo exacto para las células T CD8+ identificadas, se generaron péptidos de 10 aminoácidos solapantes con retraso de 1 aminoácido dentro del péptido MART-1 n° 13 de 15 aminoácidos y se usaron para estimular las CMSP del mismo paciente. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 h y el ensayo de dilución de CFSE el día 8 de cultivo. Estos resultados demuestran que MART-1<sub>54-62</sub> es el epítipo para las células T CD8+, lo cual permite la producción de IFN- $\gamma$  y la proliferación de células T CD8+ específicas. Por lo tanto, EPIMAX permite identificar epítipos exactos para células T CD8+.

25 Las Figuras 16A-D representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se estimularon CMSP obtenidas a partir de un paciente con melanoma HLA-A2<sup>neg</sup> con grupos de péptidos solapantes o péptidos individuales que codificaban NY-ESO1, un antígeno de cáncer de testículo ampliamente expresado en la mayoría de las células de melanoma. El péptido de NY-ESO1 n° 24 dentro del grupo n° 5 inducía la regulación positiva de IP-10 a las 48 h (Figura 16A). Estos resultados indican que NY-ESO1<sub>93-107</sub> se reconoce como un epítipo por células T específicas. Para examinar que subconjuntos de células T reconocen este epítipo, las CMSP del paciente se estimularon con péptido NY-ESO1 n° 24 en presencia de mAb de bloqueo anti-CMH de clase I (W6/32) o mAb de control de isotipo. Como se muestra en la Figura 16B, la producción de IP-10 en respuesta al péptido n° 24 se suprimía completamente por W6/32, indicando que la producción de IP-10 depende de la molécula del CMH de clase I, de modo que las células T CD8+ reconocen el péptido n° 24.

35 Para identificar el epítipo exacto para células T CD8+, se generaron péptidos solapantes de 9 aminoácidos dentro del péptido n° 24 y se usaron para estimular las CMSP del paciente. Como se muestra en la Figura 16C, NY-ESO194-102 inducía una fuerte regulación positiva de IP-10, indicando que éste es el epítipo para células T CD8+. Para identificar el elemento de restricción por HLA, las CMSP se estimularon con CD derivadas de monocitos autólogas sometidas a pulsos de péptido NY-ESO1 n° 24 en presencia de IL-2 (10 UI/ml). El día 9 de cultivo, las células se volvieron a estimular con LCL que carecían de moléculas del CMH de clase I transfectadas con plásmidos de expresión que codificaban cada HLA, estimuladas o sin estimular con péptido NY-ESO1<sub>94-102</sub>. La secreción de IFN- $\gamma$  durante la estimulación de 8 h se midió con ELISA. Como se muestra en la Figura 16D, los transfectantes HLA-B\*3501 estimulados con péptido NY-ESO194-102 inducían la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células T, indicando que este nuevo péptido se presenta por una molécula de HLA-B\*3501. Estos resultados indican que el EPIMAX permite identificar nuevos epítipos para células T CD8+ en pacientes HLA-A2<sup>neg</sup> y la combinación con otras metodologías permite identificar sus elementos de restricción por HLA.

50 La Figura 17 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP obtenidas de un paciente con melanoma (el mismo que en la Figura 10) se estimularon con péptidos solapantes de 10 aminoácidos dentro de los péptidos de 15 aminoácidos MART-1 n° 6 y n° 13 durante 48 h. La Figura 17 muestra los niveles de IP-10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas. Los epítipos son MART-1<sub>26-35</sub> (epítipo conocido) y MART-1<sub>53-62</sub> (nuevo epítipo).

55 La Figura 18 representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP obtenidas a partir de dos pacientes con melanoma HLA-A2<sup>neg</sup> se estimularon con péptidos solapantes de 10 aminoácidos dentro de péptidos de 15 aminoácidos MART-1 n° 6 durante 48 h. Se muestran los niveles de IP-10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 h. MART-1<sub>26-35</sub> (epítipo conocido) es el epítipo para ambos pacientes. Se sabe que este epítipo está restringido por HLA-A2. Puesto que estos pacientes son HLA-A2<sup>neg</sup> y los subtipos de HLA de clase I son completamente diferentes entre estos dos pacientes, este epítipo se presenta por al menos tres moléculas de CMH de clase I diferentes. Éste es otro ejemplo de identificación de epítipos para células T CD8+ con EPIMAX.

65 La Figura 19 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP obtenidas a partir de un paciente con melanoma (el mismo que en la Figura 10) se estimularon por triplicado con péptidos de 15 aminoácidos MART-1 individuales de n° 6 a n° 15 durante 48 h. Se muestran los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo a las 48 h. Los péptidos MART-1 n° 10 y n° 11 indujeron la regulación positiva de IL-2. Este resultado demuestra otro ejemplo de identificación de epítipos con EPIMAX.

La Figura 20 representa la producción de IL-2 a partir de células T CD4+ tras la estimulación con el péptido de 15 aminoácidos identificado como se muestra en la Figura 19. Las mismas CMSP de pacientes se estimularon durante 8 horas con péptido de 15 aminoácidos MART-1 n° 10 en presencia de mAb antiCD28/CD49d y monensina. La producción de IL-2 se analizó por tinción con mAb específicos. La figura demuestra las poblaciones de células T CD4+ que producen IL-2 en respuesta al péptido MART-1 n° 10. Estos resultados indican que el EPIMAX también puede identificar epítopes para células T CD4+.

Las Figuras 21A-B representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP obtenidas del mismo paciente con melanoma (el mismo que en la Figura 19) se tiñeron primero con una concentración 1  $\mu$ M de CFSE y se estimularon con péptidos individuales que codifican MART-1 por triplicado. El día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de células T en respuesta a la estimulación con péptido. La Figura 21A muestra el % de poblaciones de células T CD4+ diluidas con CFSE dentro de las poblaciones de células T CD4+. El péptido MART-1 n° 10 y n° 11 inducían más poblaciones de células T CD4+ más diluidas con CFSE en comparación con la ausencia de péptido, demostrando que estos péptidos inducían la proliferación de células T CD4+ específicas de antígeno. La Figura 21B representa las poblaciones de células T CD4+ diluidas con CFSE en respuesta a cada péptido de 15 aminoácidos MART-1 dentro de la población de células T CD4+. El péptido MART-1 n° 10 y n° 11 inducía significativamente más proliferación de células T CD4+ que los otros péptidos de 15 aminoácidos. Estos resultados indican fuertemente que el EPIMAX permite la identificación de epítopes para células T CD4+ y permite determinar la capacidad proliferativa de células T CD4+ específicas por combinación con la tecnología de CFSE.

Las Figuras 22 A-C representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. CMSP obtenidas de un paciente con melanoma HLA-A2<sup>neg</sup> que recibió vacunaciones con CD se tiñeron primero con una concentración 1  $\mu$ M de CFSE y se estimularon con grupos de péptidos que codificaban NY-ESO1. El día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de células T en respuesta a la estimulación con péptido basándose en la dilución de CFSE con un citómetro de flujo. La Figura 22A muestra el porcentaje (%) de poblaciones de células T CD4+ diluidas con CFSE dentro de las poblaciones de células T CD4+. El grupo de NY-ESO1 n° 8 inducía más poblaciones de células T CD4+ diluidas con CFSE que los otros grupos, demostrando que estos péptidos inducían la proliferación de células T CD4+ específicas de antígeno. La Figura 22B representa los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas de cultivo. Se producía IL-2 en el cultivo con NY-ESO1 grupo n° 8. Para identificar el epítipo para células T CD4+, se estimularon CMSP teñidas con CFSE con péptidos individuales dentro del grupo de NY-ESO1 n° 8. Las células T CD4+ proliferantes se analizaron basándose en la dilución con CFSE con un citómetro de flujo el día 8. Como se muestra en la Figura 22C, NY-ESO1<sub>149-167</sub> y NY-ESO1<sub>165-180</sub> inducían más proliferación de células T CD4+, demostrando que éstos son los epítopes. Este resultado indica otro ejemplo de identificación de epítopes de células T CD4+ en antígenos de melanoma.

La Figura 23 representa la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP obtenidas de un paciente con melanoma (el mismo que en la Figura 10) se estimularon por triplicado con péptidos de 15 aminoácidos MART-1 individuales del n° 6 a n° 15 durante 48 h. Se muestran los niveles de IL-5 en el sobrenadante de cultivo a las 48 h. Los péptidos MART-1 n° 10 y n° 11 inducían la regulación positiva de IL-5. Este resultado demuestra otro ejemplo de identificación de epítopes con EPIMAX.

La Figura 24 representa la producción de IL-5 a partir de células T CD4+ tras la estimulación con el péptido de 15 aminoácidos identificado como se muestra en la Figura 23. Las CMSP del mismo paciente se estimularon durante 8 horas con péptidos de 15 aminoácidos MART-1 n° 11 en presencia de mAb antiCD28/CD49d y monensina. La producción de IL-5 se analizó por tinción con mAb específicos. La figura demuestra las poblaciones de células T CD4+ que producen IL-5 en respuesta al péptido MART-1 n° 11. Este resultado indica que EPIMAX puede identificar epítopes así como el tipo de citocinas producidas por células T CD4+ específicas.

La Figura 25 representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. CMSP teñidas con CFSE obtenidas a partir de dos pacientes con melanoma se estimularon con péptidos de 15 aminoácidos individuales del grupo de TRP-1 n° 25 o del grupo de gp 100 n° 15. Las citocinas en los sobrenadantes de cultivo se midieron a 48 h y la proliferación de células T se analizó el día 8 de cultivo basándose en el ensayo de dilución de CFSE. Los resultados indican que el péptido TRP-1 n° 124 y el péptido gp100 n° 152 son epítopes para células T CD4+, siendo ambos nuevos epítopes para células T CD4+. La estimulación con péptidos inducía la producción de diversas citocinas efectoras, tales como IL-2, IL-5, IL-13 e IP-10 (IFN- $\gamma$ ), y la proliferación de células T CD4+ específicas. Estos resultados indican otro ejemplo de identificación de epítopes de células T CD4+ en antígenos de melanoma y sugiere que el EPIMAX puede usarse para identificar diferentes tipos de respuestas de células T.

La Figura 26 representa la respuesta inmune de tres pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. El EPIMAX permite identificar diferentes subconjuntos de células T, tales como células de Tipo 1 (Th1 y Tc1), y de Tipo 2 (Th2 y Tc2). CMSP obtenidas de pacientes con melanoma metastásico se estimularon con péptidos de melanoma recién identificados (15 aminoácidos) durante 48 h y se midieron las citocinas en los sobrenadantes de cultivo con un ensayo múltiple basado en perlas. Las columnas coloreadas representan los niveles de citocinas con péptidos indicados (parte inferior) y las columnas en blanco representan aquellos con diluyente. Se muestra la producción de citocinas representativa para tres subconjuntos de células T diferentes, de Tipo 1, 2 y de Tipo IL-10. La respuesta de Tipo 1 se identifica por regulación positiva de IL-1 $\alpha$  e IP-10, mientras que la respuesta de Tipo

## ES 2 341 723 T3

2 se identifica por regulación positiva de citocinas de Tipo 2, tales como IL-4, IL-5 e IL-13 sin regulación positiva de IP-10. El EPIMAX se usó para identificar una nueva respuesta de células T caracterizada por regulación positiva de IL-10 (Tipo de IL-10).

5 La Figura 27 representa un resumen de nuevos epítopes para células T CD4+ y CD8+ dentro de 4 antígenos de melanoma, es decir, gp100, MART-1, NY-ESO1 y TRP-1, que se identifican con metodología EPIMAX. Estos nuevos epítopes se identificaron por exploración de CMSP de 13 pacientes con melanoma con EPIMAX.

10 La tabla 1 representa el resumen de epítopes para células T CD8+ identificadas con EPIMAX. Se muestran los péptidos de 15 aminoácidos identificados y su número de secuencia de aminoácidos. Algunos péptidos de 15 aminoácidos se focalizaron con péptidos solapantes de 9 aminoácidos o 10 aminoácidos y se muestran en la tabla.

Paciente	Pre o Post	biblioteca de péptidos	epítopes identificados	secuencia del epítope	epítope exacto	Tipo de respuesta
094-001	Pre	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>21-35</sub>	1
	Post	MART-1	p6	MART-1 <sub>25-35</sub>	MART-1 <sub>25-35</sub>	1
	Pre	NY-ESO1	p24	NY-ESO1 <sub>93-107</sub>	NY-ESO1 <sub>94-102</sub>	1
	Post	NY-ESO1	p24	NY-ESO1 <sub>03-107</sub>	NY-ESO1 <sub>94-102</sub>	1
	Pre	gp100	p60	gp100 <sub>237-251</sub>		1
094-004	Pre	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>25-35</sub>	1
094-007	Pre	NY-ESO1	p39	NY-ESO1 <sub>153-167</sub>		1
094-009	Post	MART-1	p6	MART-1 <sub>21-35</sub>	MART-1 <sub>26-35</sub>	1
	Post	MART-1	p13	MART-1 <sub>40-63</sub>	MART-1 <sub>53-62,54-62</sub>	1
	Post	gp100	p52	gp100 <sub>205-219</sub>	gp100 <sub>209-217</sub>	1
094-010	Post	NY-ESO1	p21	NY-ESO1 <sub>61-85</sub>		10
	Post	gyp100	p140	gp100 <sub>557-571</sub>		1
094-012	Post	NY-ESO1	p31	NY-ESO1 <sub>153-167</sub>		1
094-015	Post	NY-ESO1	p38	NY-ESO1 <sub>149-183</sub>		0
	Post	NY-ESO1	p40	NY-ESO1 <sub>157-171</sub>	NY-ESO1 <sub>160-100</sub>	0
	Post	NY-ESO1	p41	NY-ESO1 <sub>161-175</sub>	NY-ESO1 <sub>101-170</sub>	1/10
	Post	gap100	p73	gp100 <sub>280-303</sub>		10

65

## ES 2 341 723 T3

La Tabla 2 representa el resumen de epítopes para células Th0, Th1 y Th2 identificadas con EPIMAX. Se muestran los péptidos de 15 aminoácidos identificados y su número de secuencia de aminoácidos.

Paciente	Pre o Post	biblioteca de péptidos	epítopes identificados	secuencia del epítope	Tipo de respuesta	proliferación
094-004	Post	NY-ESO1	p38/p39	NY-ESO1 <sub>149-167</sub>	0	Sí
		NY-ESO1	p42/p43	NY-ESO1 <sub>165-183</sub>	0	Sí
		TRP-1	p118	TRP-1 <sub>468-483</sub>	1	Sí
		TRP-1	p124	TRP-1 <sub>493-507</sub>	1	Sí
094-009	Post	MART-1	p10/p11	MART-1 <sub>37-55</sub>	2	Sí
		gp100	p152	gp100 <sub>605-610</sub>	0	Sí
		TRP-1	p48	TRP-1 <sub>169-203</sub>	0	Sí
094-012	Post	gp100	p32	gp100 <sub>125-139</sub>	2	Sí
		gp100	p40	gp100 <sub>157-171</sub>	2	Sí
		gp100	p71	gp100 <sub>281-285</sub>	2	Sí
		gp100	p78	gp100 <sub>300-323</sub>	2	Sí
		gp100	p152	gp100 <sub>605-610</sub>	2	Sí
094-015	Post	gp100	p1/p2	gp100 <sub>1-16</sub>	0	Sí
		gp100	p152	gp100 <sub>605-519</sub>	0	Sí
		MART-1	p11	MART-1 <sub>41-55</sub>	0	Sí (CD4/CD8)

La Tabla 3 representa el resumen de epítopes para células T CD4+ de Tipo IL-10 identificadas con EPIMAX. Se muestran los péptidos de 15 aminoácidos identificados y su número de secuencia de aminoácidos.

Paciente	Pre o Post	biblioteca de péptidos	epítopes identificados	secuencia del epítope	Tipo de respuesta	proliferación
094-004	Pre	MART-1	p10	MART-1 <sub>37-51</sub>	10	No
	Post	MART-1	p10	MART-1 <sub>37-51</sub>	10	No
	Pre	TRP-1	p113	TRP-1 <sub>440-483</sub>	10	No
094-005	Pre	gp100	p93	gp100 <sub>300-384</sub>	10	No
094-006	Pre	MART-1	p8	MART-1 <sub>37-51</sub>	10	No
094-007	Pre	NY-ESO1	p43	NY-ESO1 <sub>10-183</sub>	10	No

## ES 2 341 723 T3

Paciente	Pre o Post	biblioteca de péptidos	epítopes identificados	secuencia del epítope	Tipo de respuesta	proliferación
094-009	Pre	NY-ESO1	p39/p40	NY-ESO1 <sub>100-183</sub>	10	Marginal
	Pre	TRP-1	p50	TRP-1 <sub>107-211</sub>	10	Marginal
094-010	Post	NY-ESO1	p23	NY-ESO1 <sub>80-103</sub>	10	Sí
094-*013	Post	NY-ESO1	p23	NY-ESO <sub>80-103</sub>	10	

La Figura 28 son gráficas que representan la respuesta inmune de tres pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. El análisis de EPIMAX de CMSP obtenidas de pacientes con melanoma metastásico (13 pacientes) con péptidos solapantes MART-1, gp100, NY-ESO1 y TRP-1 producía 16 péptidos que inducían respuestas de Tipo 1, 15 péptidos que inducían respuestas de Tipo 0/2 y 9 péptidos que inducían Tipo-IL-10. Las citocinas se midieron el día 2 de los cultivos. Se muestran respectivamente los niveles de IL- $\alpha$  e IP-10 en cada subconjunto de células T. Cada punto representa los niveles de citocinas en cada pocillo por separado de los cultivos de CMSP de estos pacientes estimulados con péptidos individuales identificados. Este resultado indica claramente que IL-1 $\alpha$  e IP-10 se correlacionan completamente en la respuesta de Tipo 1.

Las Figuras 29A-D son gráficas que representan la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se estimularon CMSP obtenidas de un paciente con melanoma con grupos de péptidos o péptidos individuales que codificaban NY-ESO1. Se muestran los niveles de IL-10 en sobrenadante de cultivo a las 48 horas de cultivo (Figura 29A). Los péptidos NY-ESO1 n° 39 y n° 40 son los epítopes. Para explorar el origen de la producción de IL-10, las CMSP se estimularon con péptido n° 39 en presencia de mAb anti-CD28/C49D y monensina durante 8 horas y se tiñeron con mAb específico de IL-10. Como se muestra en la Figura 29B, aproximadamente el 0,11% de células T CD4<sup>+</sup> producían IL-10 en respuesta al péptido NY-ESO1 n° 39. Este resultado indica que el EPIMAX permite células T CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno de melanoma productoras de IL-10 en pacientes con melanoma. A continuación, para evaluar si estas células T productoras de IL-10 tenían propiedades reguladoras, se añadieron CMSP estimuladas con péptido n° 39 o péptido de 15 aminoácidos irrelevante en cultivos polarizados a un MLR de "tercer grupo" para ensayar la supresión de la expansión de las células T por la liberación de mediadores solubles. El MLR usaba células T CD4<sup>+</sup> marcadas con CMSP y CD maduras alogénicas, ambas de voluntarios sanos, para evitar el efecto de respuesta de células T específicas de péptido. Las CMSP de paciente estimuladas con péptido NY-ESO1 n° 39, pero no con péptido de control, suprimían significativamente la proliferación en el MLR (Figuras 29C, 29D). Estos resultados indican que la estrategia de EPIMAX puede identificar células T reguladoras específicas de antígeno tumoral.

La Figura 30 son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. CMSP obtenidas del mismo paciente con melanoma que en las Figuras 29A-D a dos puntos temporales diferentes, es decir, antes de la vacunación con CD y después de la vacunación con 8 CD, se estimularon con péptidos individuales que codificaban NY-ESO1. Se muestran los niveles de citocinas/quimiocinas en el sobrenadante de cultivo a las 48 h de cultivo. Este resultado demuestra que el distintivo de Tipo IL-10 desaparecía después de la vacunación, sugiriendo que la función de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-10 se perdía después de la vacunación. Estos resultados demuestran otro ejemplo de modulación de respuestas de células T por vacuna de CD con un ensayo EPIMAX.

La Figura 31 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se han identificado 9 epítopes diferentes en antígenos de melanoma que inducían respuestas de Tipo-IL-10 en 7 pacientes con melanoma. Se incubaron CMSP obtenidas de pacientes con melanoma con cada péptido de 15 aminoácidos identificado específico de paciente durante 48 h. La figura muestra la inhibición de la producción de IP-10 espontánea por incubación con péptidos de Tipo IL-10 identificados. Ésta es otra demostración de la función supresora de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-10 identificada con EPIMAX.

La Figura 32 es una gráfica que representa la respuesta inmune de pacientes con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se muestran los niveles de IL-1 $\beta$  e IP-10 en cada cultivo de CMSP con péptidos de 15 aminoácidos inductores de IL-10 identificados. Cada punto representa los niveles de citocinas en cada pocillo separado en un cultivo de CMSP con los péptidos de 15 aminoácidos individuales únicos identificados. Este resultado muestra que IL-1 $\beta$  e IL-10 se correlacionan en respuestas de Tipo-IL-10 identificadas, por lo tanto ambas citocinas pueden ser un buen marcador para identificar células de Tipo-IL-10 en EPIMAX.

## ES 2 341 723 T3

La Figura 33 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP recientes obtenidas de tres voluntarios sanos normales se dividieron en 3 lotes. Las CMSP de cada lote se estimularon con grupos de péptidos solapantes de 15 aminoácidos que codifican proteína de la matriz del virus de la gripe (Flu-MP) por duplicado ( $2 \times 10^5$  células/pocillo,  $10 \mu\text{M}$  por péptido), generando por lo tanto 6 réplicas de muestras. Se muestran los niveles de IP-10 a las 48 h de cultivo. Las barras 5 negras y sombreadas representan el valor medio  $\pm 3$  DT de IP-10 en los cultivos sin péptidos. Los niveles de IP-10 se determinaron por encima de la media  $+3$  DT de este efecto de fondo y representan una inducción positiva de IP-10 en respuesta a grupos de péptidos. En el donante normal n° 1, 9 de 12 grupos de péptidos dieron una puntuación más positiva que 4 de 6 réplicas de muestras, indicando que este donante tenía un repertorio muy amplio de células T específicas para Flu-MP. Por el contrario, en el donante normal n° 3, ningún grupo inducía regulación positiva de IP-10. El EPIMAX permite la identificación de la amplitud completa de respuesta de células T contra una proteína antigénica dada. Además, estos estudios muestran que el EPIMAX es un ensayo altamente reproducible.

La Figura 34 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se muestran los niveles de IL-6 e IP-10 en los mismos estudios que se muestran en la Figura 33. Sorprendentemente, en el donante normal n° 3, no se identificaron éxitos con producción de IP-10, pero muchos grupos de péptidos dieron una puntuación positiva con producción de IL-6. Este resultado demuestra un ejemplo que muestra que la medición de diferentes conjuntos de citocinas puede identificar diferentes subconjuntos de células T en el EPIMAX.

La Figura 35 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en los estudios mostrados en la Figura 33. Cada punto representa los niveles de citocinas en cada pocillo por separado en un cultivo de CMSP con los grupos de péptidos. En todos los donantes, los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 se correlacionan muy bien en el EPIMAX, confirmando que estos dos marcadores se correlacionan totalmente en las respuestas Tipo 1.

La Figura 36 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP congeladas obtenidas del donante n° 1 se descongelaron y se estimularon con grupos de péptidos de 15 aminoácidos o péptidos individuales que codificaban Flu-MP. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10. Cada punto representa los niveles de citocinas en cada pocillo por separado en un cultivo de CMSP con los grupos de péptidos o péptidos individuales. Incluso con las CMSP congeladas, los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10 se correlacionan muy bien ( $P < 0,0001$ ,  $r = 0,9121$ ), indicando que estos dos marcadores pueden usarse para identificar respuestas de Tipo 1 en EPIMAX independientemente de cómo se obtengan las CMSP, recientes o congeladas.

La Figura 37 son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP recientes o congeladas obtenidas del donante n° 1 se estimularon con grupos de péptidos de 15 aminoácidos que codificaban Flu-MP. Se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  e IP-10. Como se muestra en la Figura 37, los dos grupos, n° 6 y n° 12, inducían la regulación positiva de IL-1 $\alpha$  e IP-10 en CMSP recientes y congeladas. Este estudio demuestra que las CMSP congeladas pueden usarse para controlar las respuestas de células T específicas de antígeno con EPIMAX.

Las Figuras 38A, 38B son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP congeladas obtenidas del donante n° 1 se descongelaron y se estimularon con un grupo de péptidos o péptidos individuales que codifican Flu-MP en 6 réplicas ( $2 \times 10^5$  células/pocillo,  $10 \mu\text{M}$  por péptido). Se muestran los niveles de IP-10 a las 48 horas de cultivo (Figura 37A). En otro estudio, el mayor número de CMSP ( $2 \times 10^6$  células/pocillo) se estimuló con la misma concentración de péptido de 15 aminoácidos por triplicado. Como se muestra en la Figura 37B, aunque el péptido n° 58 y el n° 59 estimulaban la producción de IP-10 en ambos estudios, el contraste entre muestras y cultivo de control es superior cuando se usan más CMSP/pocillo en EPIMAX. Por lo tanto, el mayor número de CMSP por pocillo ayuda a reducir la variabilidad y sensibilidad en el ensayo EPIMAX. Considerando la baja frecuencia de células T específicas de antígeno en CMSP (habitualmente 1 de  $10^5$  CMSP), es plausible que no se detecten respuestas de células T con EPIMAX (o prácticamente ninguna clase de ensayo) cuando pocas células responden a la estimulación con péptido. Por lo tanto, en un ensayo EPIMAX regular, los presentes inventores están usando  $5 \times 10^5$  CMSP/pocillo.

Las Figuras 39A y 39B son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX. Se resuspendieron CMSP en MC a  $1 \times 10^6$  células/ml, se puso 1 ml de suspensiones celulares en tubos de cultivo y se estimularon con péptidos individuales indicados de una biblioteca Flu-MP durante 7 días. Las CMSP cultivadas se recogieron y se reestimularon con CD sometidas a pulsos del péptido indicado durante 5 h en presencia de monensina. Se examinaron las citocinas citoplasmáticas con mAb específicos después de la permeabilización celular. Se mostraron los porcentajes de células productoras de citocinas en una población de células T CD3 $^+$ CD4 $^+$  (Figura 39A). La estimulación con péptidos dominantes inducía la proliferación de células T CD4 $^+$  específicas. Las CMSP de donante se tiñeron primero con una concentración 1 mM de CFSE. Las CMSP se resuspendieron en MC a  $1 \times 10^6$  células/ml, se puso 1 ml de suspensión celular en tubos de cultivo, y se estimularon con péptidos individuales indicados de una biblioteca de Flu-MP durante 6 días. Las células estimuladas se tiñeron con mAb anti-CD3 y CD4 y se analizaron las células T CD4 $^+$  proliferativas con un citómetro de flujo, basándose en la dilución con CFSE. Se muestran los porcentajes de células CFSE- en una población de células T CD3 $^+$ CD4 $^+$  (Figura 39B). Estos resultados demuestran la prueba de que el EPIMAX permitía la identificación de epítopes para células T CD4 $^+$  específicas de Flu-MP funcionales.

## ES 2 341 723 T3

La Figura 40 son gráficas que representan la respuesta inmune de un voluntario sano normal según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Las CMSP se obtuvieron a partir del donante n° 2 de la Figura 33. Las CMSP congeladas se descongelaron y se estimularon con un grupo Flu-MP n° 11 o péptidos de 15 aminoácidos individuales dentro del grupo n° 11 ( $5 \times 10^5$  células/pocillo,  $20 \mu\text{M}$  por péptido). Se muestran los niveles de citocinas a las 48 h de cultivo. Estos resultados indican que el péptido n° 52 y n° 53 son epítopes para células T específicas de Flu-MP, mostrando otro ejemplo de identificación de nuevos epítopes para células T CD4<sup>+</sup> específicas.

Las Figuras 41A, 41B son gráficas que representan la respuesta inmune de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX. Las CMSP usadas en el estudio en la Figura 40 se marcaron con CFSE y se estimularon con péptidos individuales dentro del grupo de Flu-MP n° 11. Las células T CD4<sup>+</sup> diluidas con CFSE se analizaron el día 8 de cultivo (Figura 41A). En otro estudio, las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> diluidas con CFSE se analizaron los días 6, 7, 8 y 10 de cultivo (Figura 41B). Estos estudios demuestran que el péptido identificado (péptido Flu-MP n° 52 y n° 53) con EPIMAX inducía la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> específicas de péptido, y la población de células T CD4<sup>+</sup> en proliferación alcanzaba un máximo el día 7 u 8 de la estimulación con péptido. Este estudio muestra otro ejemplo de identificación de nuevos epítopes para células T CD4<sup>+</sup> específicas y justifica la realización de un análisis de la población de células T CD4<sup>+</sup> en proliferación el día 8 de cultivo.

La Figura 42 son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se obtuvieron CMSP a partir de un paciente con melanoma que se sometió a vacunaciones con CD. El paciente recibió una vacuna de CD autólogas cargada con líneas celulares de melanoma alogénicas destruidas. Es posible que la vacuna con CD indujera en este paciente células T específicas contra antígenos alogénicos expresados en líneas celulares de melanoma alogénicas usadas para las vacunas de CD. Para examinar esta posibilidad, las CMSP de los pacientes se estimularon con péptidos solapantes de 15 aminoácidos que codificaban HLA-B\*4001, que se expresa en la línea celular de melanoma, pero no en las células de paciente. Como se muestra en la Figura 42, el péptido n° 5 y el péptido n° 7 dentro del grupo n° 1 inducían la producción de IP-10 en el cultivo de CMSP. Según se esperaba, estos dos epítopes pueden ser epítopes antigénicos para el paciente, ya que ambos péptidos contienen emparejamientos erróneos de aminoácidos. Estos resultados demuestran que el EPIMAX puede identificar respuestas de células T específicas de antígeno alogénicas. Por lo tanto, esta metodología puede ser útil para identificar células T específicas de antígeno alogénicas en un entorno de trasplante de órganos.

La Figura 43 es una gráfica que representa la respuesta inmune de un paciente diabético de tipo 1 según se evaluó de acuerdo con la presente invención. Se obtuvieron CMSP de un paciente con diabetes de Tipo 1 que tomaba fármacos inmunosupresores tales como Cellcept y Predonisolona. Las CMSP recientes ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) se estimularon con péptidos de 15 aminoácidos individuales que codificaban IA-2, uno de los auto-antígenos que se expresa específicamente en células de los islotes  $\beta$  pancreáticos. Se muestran los niveles de IP-10 a las 48 h de cultivo. Los péptidos de 15 aminoácidos n° 47, 60, 61, 62, 64 y 66 inducían la regulación positiva de la producción de IP-10 en cultivo de CMSP.

Este estudio demuestra que este paciente tenía un amplio repertorio de células Tipo específicas de IA-2. Además, 5 de 6 (las secuencias de los péptidos n° 47, 60, 61, 62 y 66 se muestran en la Tabla 4) son nuevos epítopes para células T. Por lo tanto, este estudio indica que el EPIMAX permite identificar epítopes y tipos de respuesta de células T en un modelo de enfermedad autoinmune incluso con medicación con fármacos inmunosupresores.

péptido n° 47	IA-789-803
péptido n° 60	IA-2 <sub>841-855</sub>
péptido n° 61	IA-2 <sub>845-859</sub>
péptido n° 62	IA-2 <sub>849-863</sub>
péptido n° 64	IA-2 <sub>857-871</sub>
péptido n° 66	IA-2 <sub>865-879</sub>

Las Figuras 44A y 44B son gráficas que representan la respuesta inmune de un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes. Se incubaron CMSP obtenidas de un paciente con melanoma pre-vacunación con 5 grupos de péptidos (7-8 péptidos/grupo) de la biblioteca de péptidos de survivina. El grupo de survivina n° 3 inducía la regulación negativa de IP-10 y la regulación positiva de IL-10. Las CMSP después se incubaron con péptido individual del grupo n° 3 para identificar el péptido responsable, péptido n° 15. La regulación positiva de IL-10 se correlacionaba con IL-1b. Los datos se muestran en las Figuras 44A y 44C para IP-10, en las Figuras 44B y 44D para IL-10, en las Figuras 44E y 44G para IL-1 $\alpha$  y en las Figuras 44F y 44H para IL-1 $\beta$ .

La Figura 45 es una gráfica que representa la respuesta inmune de voluntarios sanos normales según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células T. Se aislaron CMSP a partir de sangre recién extraída de 5 voluntarios sanos, se incubaron con péptido de survivina n° 15 durante 48 horas y se evaluaron de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. Se midió la proteína IP-10 producida en el sobrenadante de cultivo y los datos de la Figura 45 se proporcionan en valores relativos (%) respecto a cultivos en los que no se añadió péptido. Se demostró que el péptido de survivina n° 15 inhibe la producción de IP-10 en los cinco voluntarios de una forma no restringida por CMH.

## ES 2 341 723 T3

Las Figuras 46A y 46B son gráficas que representan la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T. Se cultivaron CMSP de un paciente con melanoma durante 18 h en presencia o ausencia de Péptido de survivina nº 15 y/o virus de la gripe vivo (Charles River Laboratories, CT). Se midieron las concentraciones de IP-10 (Figura 46A) e IL-10 (Figura 46B) con Luminex. Se mostró que el Péptido survivina nº 15 inhibía la producción de IP-10 a partir de CMSP estimuladas con virus de la gripe vivo.

La Figura 47 es una gráfica que representa la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T. Se estimularon CMSP de un paciente con melanoma durante 5 días con TSST-1 a concentraciones valoradas en presencia de Péptido de survivina nº 15 o Péptido nº 16 (11 aminoácidos son idénticos a los del Péptido nº 15). Después de 5 días, se añadió timidina tritiada ( $1 \mu\text{Ci/pocillo}$ ). Las placas se recogieron 16 horas después y se midió la radiactividad incorporada mediante un contador de centelleo Wallac. Se mostró que el Péptido de survivina nº 15 inhibía la proliferación de células T estimuladas con TSST-1.

Las Figuras 48A-48D son gráficas que representan la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuesta inmune por células no T. Se disminuyó el número de células CD4+, CD8+, CD14+, CD56+, BDCA-4+, o BDCA-1 ó 3+ a partir de CMSP de un paciente con melanoma usando microperlas conjugadas con cada mAb (Miltenyi). Como control negativo, se pasaron CMSP a través de una columna sin ninguna perla (sin reducción). Se resuspendieron las células reducidas en MC a 1 M/ml y se estimularon con virus de la gripe vivo en presencia o ausencia del Péptido de survivina nº 15. Los sobrenadantes se recogieron a las 48 horas y se analizaron los niveles de IL-10 e IP-10 con Luminex. Los datos muestran que las células CD14+ o CD56+ son necesarias para que el Péptido nº 15 induzca la secreción de E-10.

Las Figuras 49A y 49B son gráficas que representan la respuesta inmune en un paciente con melanoma según se evaluó de acuerdo con la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunes por células no T. Se tiñeron CMSP de pacientes con melanoma con CFSE  $5 \mu\text{M}$  y se cultivaron durante 4 días con una concentración  $10 \mu\text{M}$  de Péptido de survivina nº 15 (Figura 49B) o Péptido de control nº 6 (Figura 49A). La población de NK se analizó con FACS. Esas células CD56+ no disminuían la intensidad de CFSE, mostrando que no estaban en proliferación (no se muestra). Por lo tanto, se demostró que el Péptido nº 15 mantenía la supervivencia de células NK CD3-CD56+.

Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de la presente invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin alejarse del ámbito de la invención. Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, sin usar más que una experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Dichos equivalentes se consideran dentro del ámbito de la presente invención y están incluidos en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar uno o más péptidos inmunomoduladores, que comprende las etapas de:
- 5 cultivar células inmunes aisladas de un sujeto con un grupo de varios péptidos solapantes de una biblioteca de péptidos solapantes;
- 10 analizar simultáneamente un sobrenadante de un medio de cultivo con respecto a múltiples parámetros de reactividad inmune que comprenden la especificidad y la respuesta de citocinas de citocinas y quimiocinas, lo cual permite la identificación de fenotipos de células de Tipo 1, de Tipo 2 y T-Reguladoras contra el grupo de varios péptidos solapantes;
- 15 cultivar células inmunes aisladas del sujeto con péptidos individuales del grupo de péptidos solapantes y analizar simultáneamente el sobrenadante del medio de cultivo con respecto a dichas citocinas y quimiocinas; y
- determinar el tipo de respuesta inmune basándose en la expresión coordinada de citocinas en respuesta a los péptidos individuales en el medio de cultivo.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además identificar células efectoras específicas de péptido.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además identificar múltiples células efectoras específicas de fragmentos peptídicos.
- 25 4. Un procedimiento para evaluar el estado inmune de un sujeto, que comprende las etapas de:
- identificar una serie de péptidos inmunomoduladores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tipo de reactividad inmune es indicativo del estado inmune del sujeto.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, **caracterizado** porque se evalúa el grado de inmunosupresión del sujeto.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 4, **caracterizado** porque se evalúa el grado de hiperactivación del sistema inmune del sujeto.
7. El procedimiento de la reivindicación 4, **caracterizado** porque se evalúa el estado inmune de un sujeto con respecto a múltiples péptidos inmunomoduladores para proporcionar un repertorio completo de células T para el sujeto.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 4, **caracterizado** porque el péptido inmunomodulador y el tipo de reactividad inmune son indicativos del riesgo del sujeto de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 8, **caracterizado** porque las enfermedades relacionadas con el sistema inmune se seleccionan del grupo constituido por enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, enfermedades autoinflamatorias, cáncer, inflamación crónica y alergia.
10. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además predecir la respuesta del sujeto a terapia por determinación del estado inmune específico de epítipo del sujeto como indicador del resultado del tratamiento.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 10, **caracterizado** porque la terapia es inmunoterapia, tal como vacunación, inmunoterapia pasiva y transferencia de células adoptivas.
- 55 12. Un procedimiento para identificar y **caracterizar** nuevos agentes terapéuticos para inmunoterapia que comprende las etapas de:
- identificar una serie de péptidos inmunomoduladores de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células inmunes se cultivan en presencia o ausencia de un inmunomodulador y uno o más péptidos de la biblioteca de péptidos solapantes, en el que la inhibición de la reactividad inmune es indicativa de un agente terapéutico inmunosupresor y en el que la potenciación de la reactividad inmune es indicativa de un adyuvante.
- 60 13. El procedimiento de la reivindicación 12, **caracterizado** porque los agentes terapéuticos son una combinación de péptidos inmunomoduladores que dirigen el tipo de respuesta inmune hacia Th1, Th2, Tc1, Tc2 y combinaciones de las mismas.
- 65

## ES 2 341 723 T3

14. El procedimiento de la reivindicación 12, **caracterizado** porque los nuevos agentes terapéuticos son epítopes vacunales.

5 15. El procedimiento de la reivindicación 14, **caracterizado** porque las secuencias del uno o más péptidos se determinan después del aislamiento.

16. El procedimiento de la reivindicación 14, **caracterizado** porque el agente antigénico comprende un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo, un parásito o un helminto.

10 17. El procedimiento de la reivindicación 14 ó 16, **caracterizado** porque el agente antigénico es un auto-antígeno.

18. El procedimiento de las reivindicaciones 14 a 17, **caracterizado** porque el cultivo celular se analiza y se determina el perfil de secreción de citocinas de una o más células T, células B, células dendríticas, monocitos, neutrófilos, mastocitos y eritrocitos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

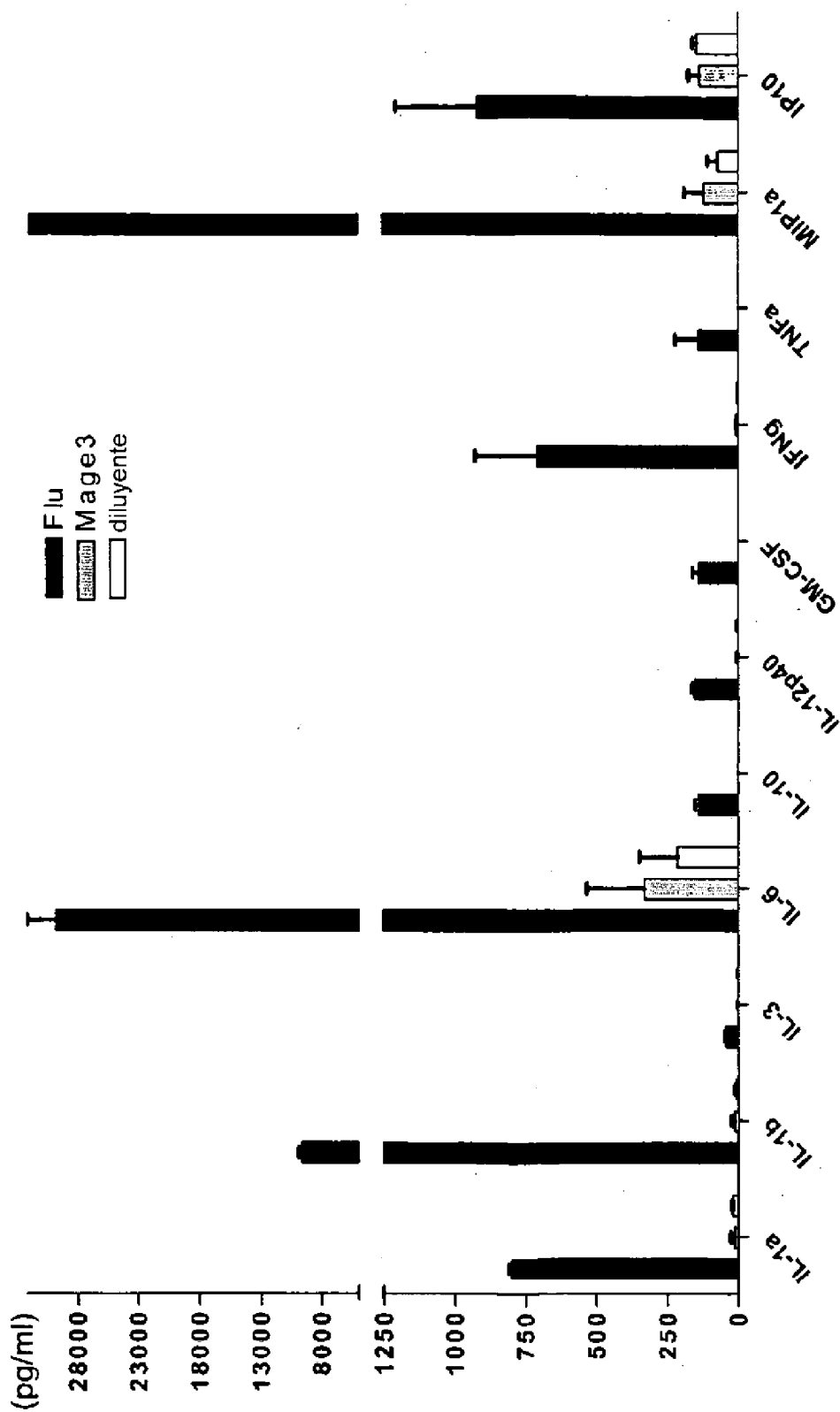


Figura 1

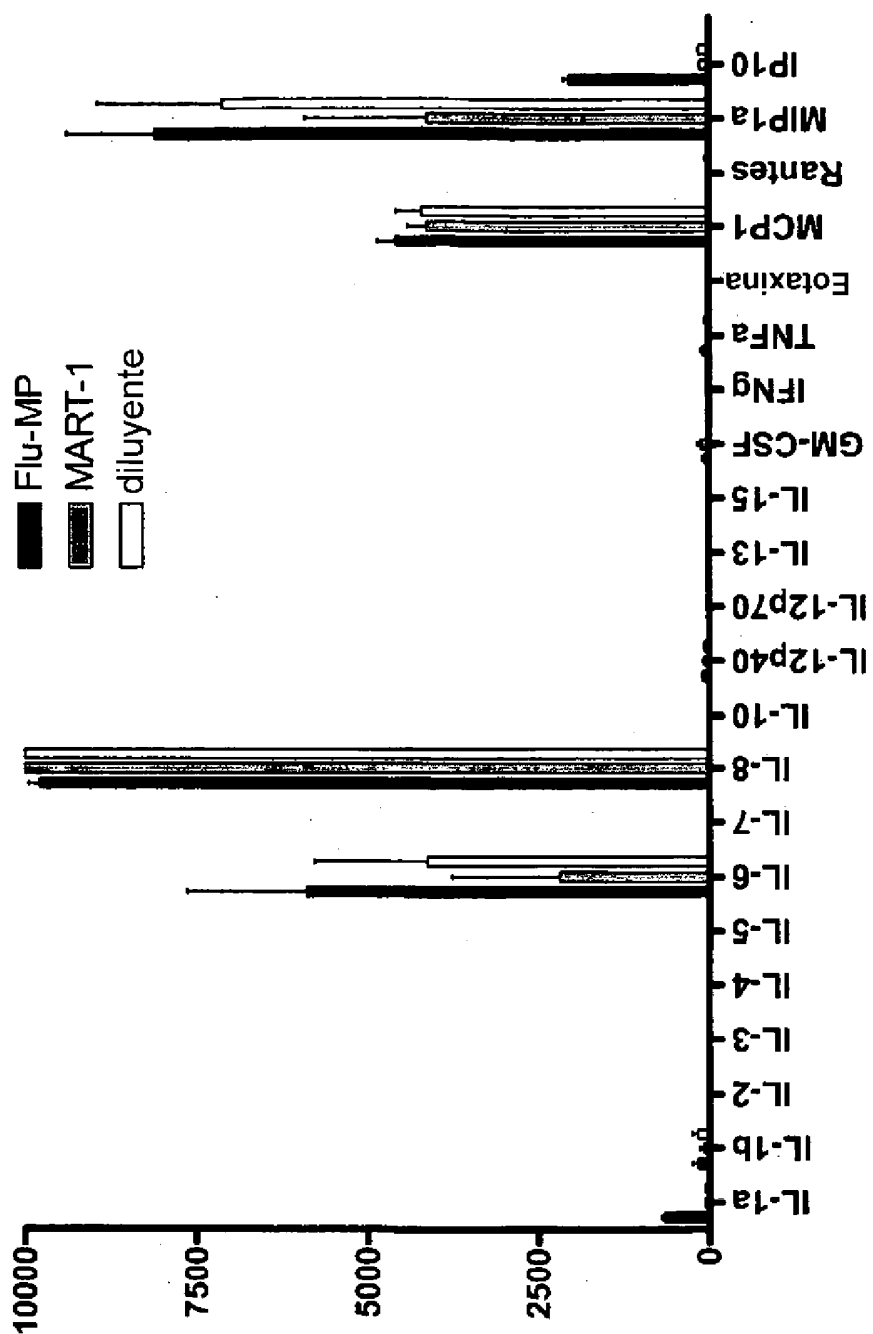
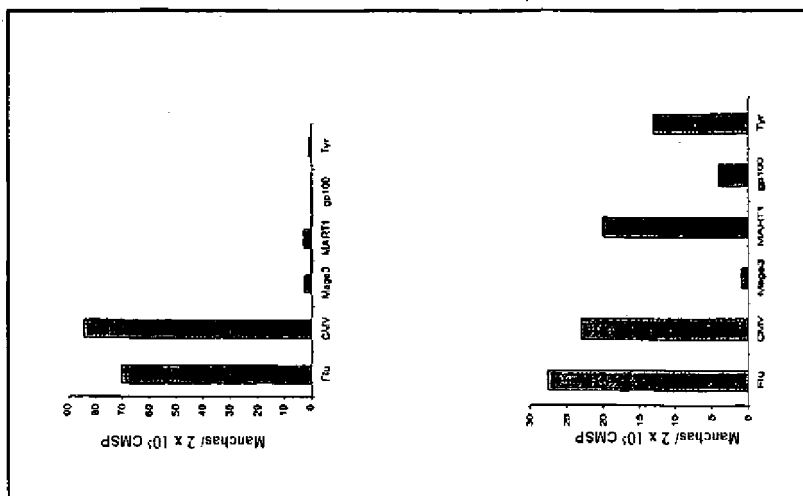
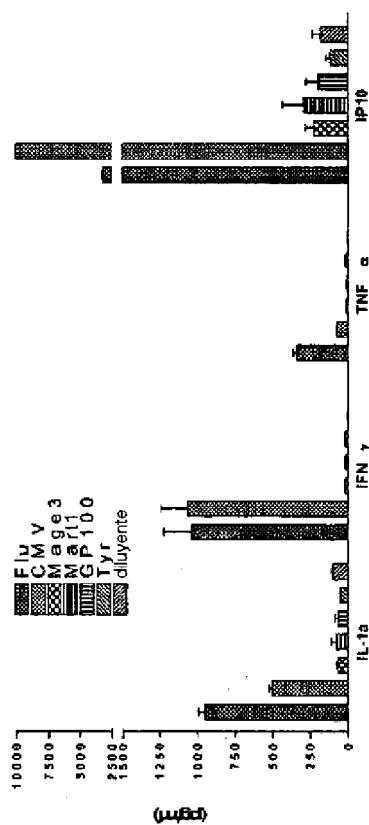


Figura 2

ELISPOT de IFN- $\gamma$  Directo



paciente 1



paciente 2

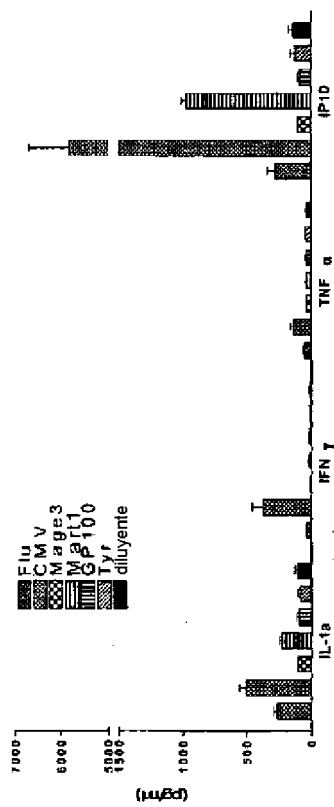


Figura 3

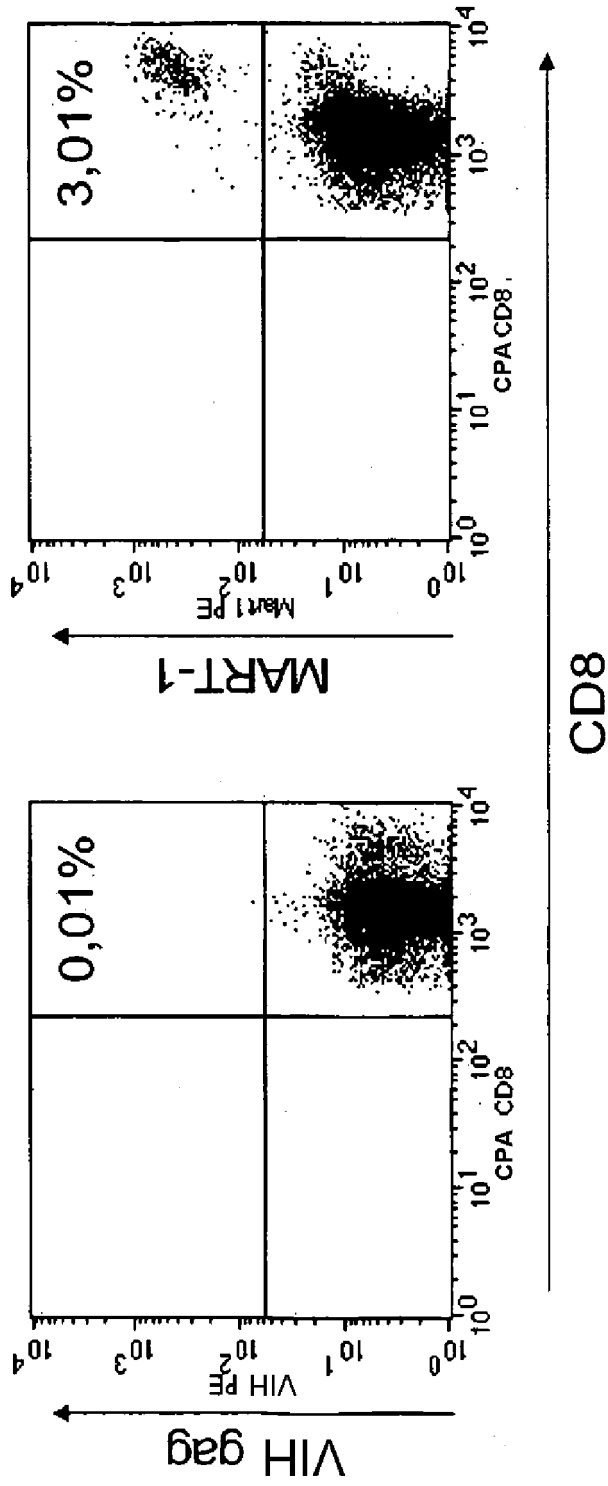


Figura 4A

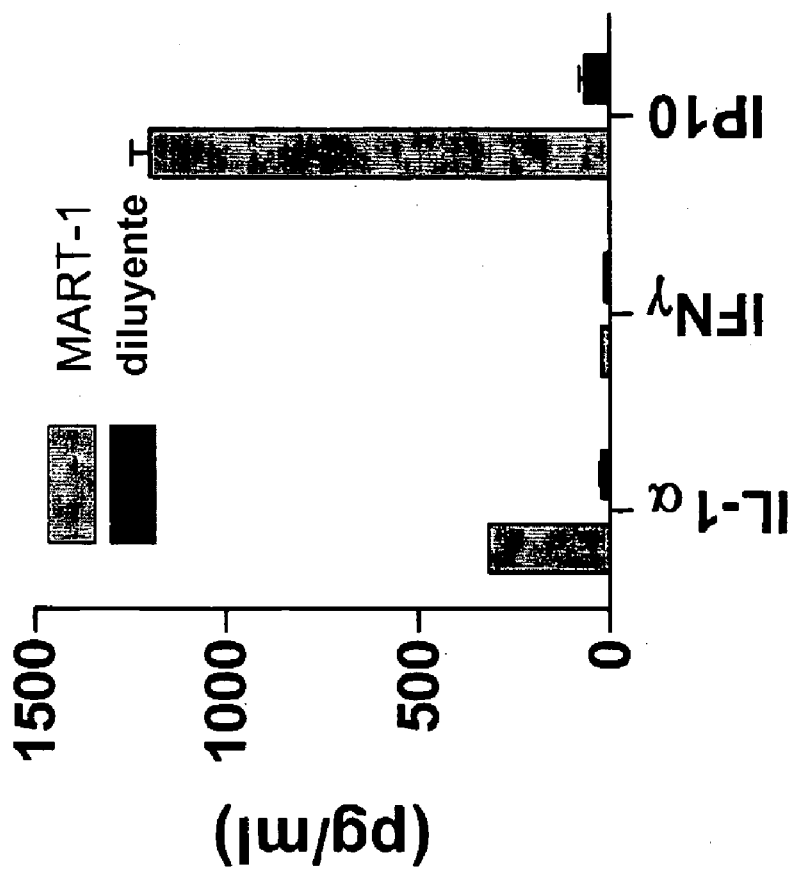


Figura 4B

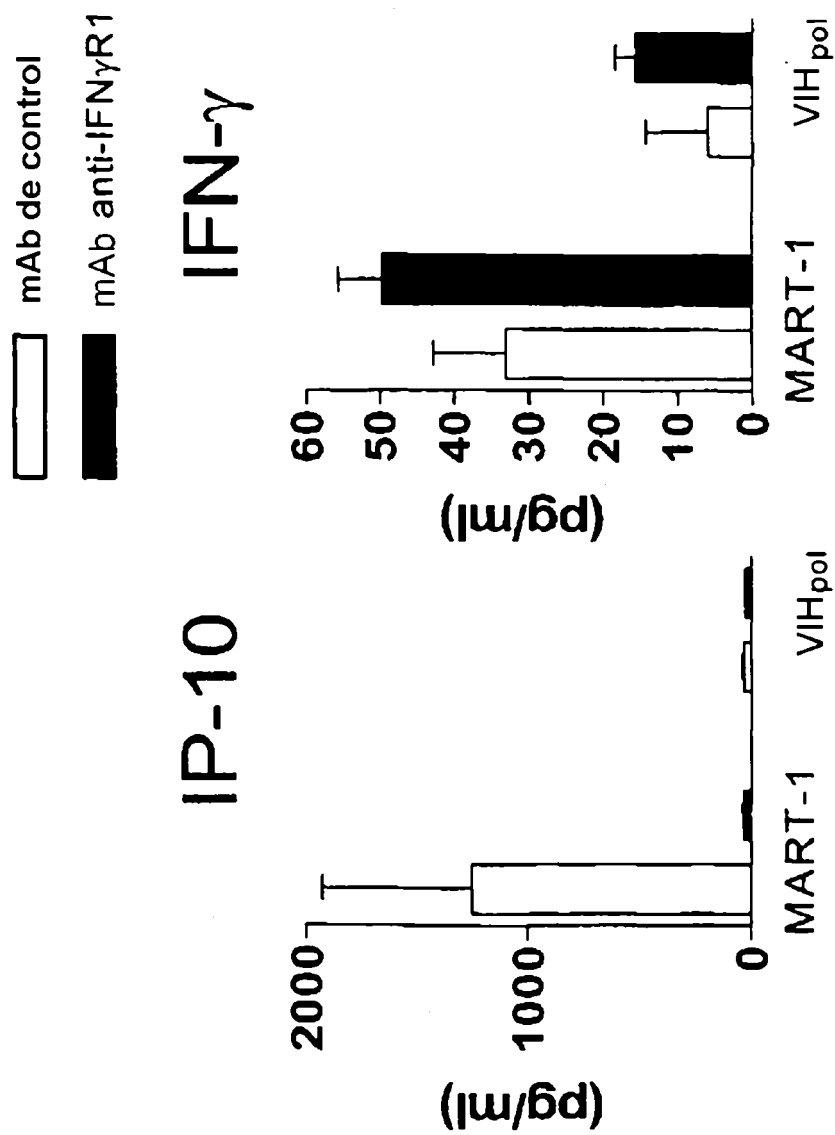


Figura 4C

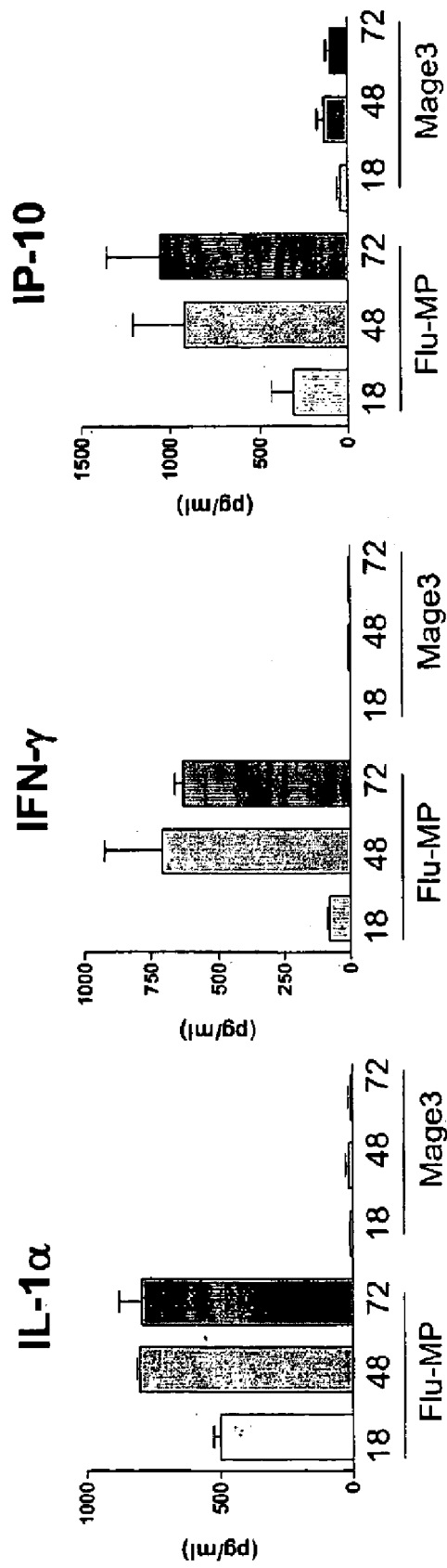


Figura 5

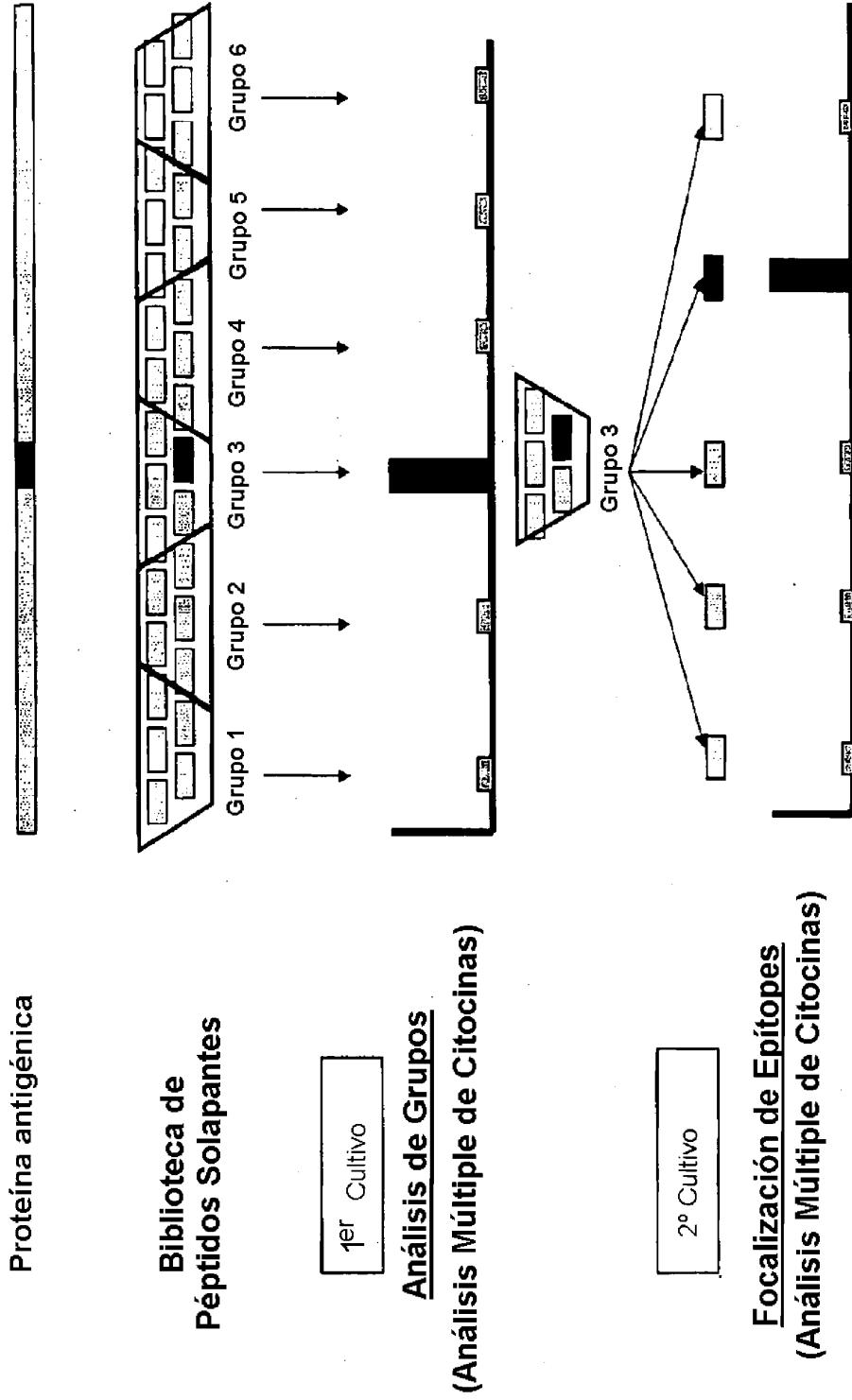
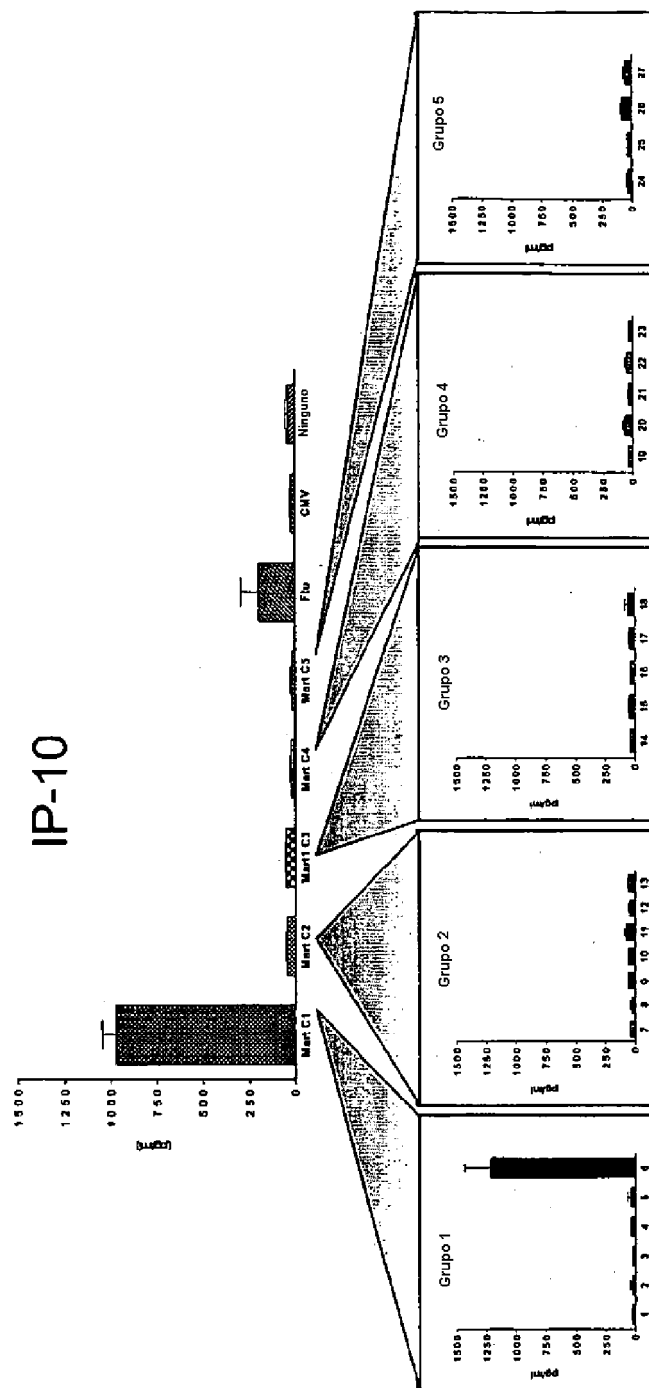


Figura 6



El péptido MART-1 n° 6 contiene el epítipo dominante MART1 A2 AAGIGILTV (27-35).

Figura 7

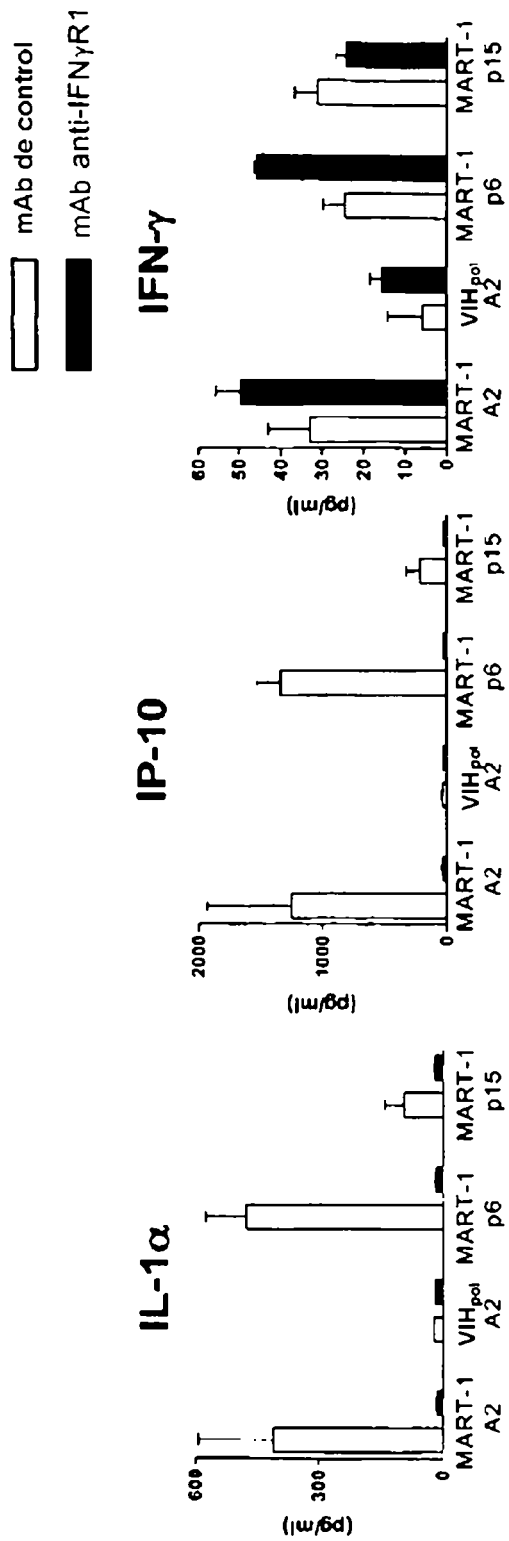


Figura 8

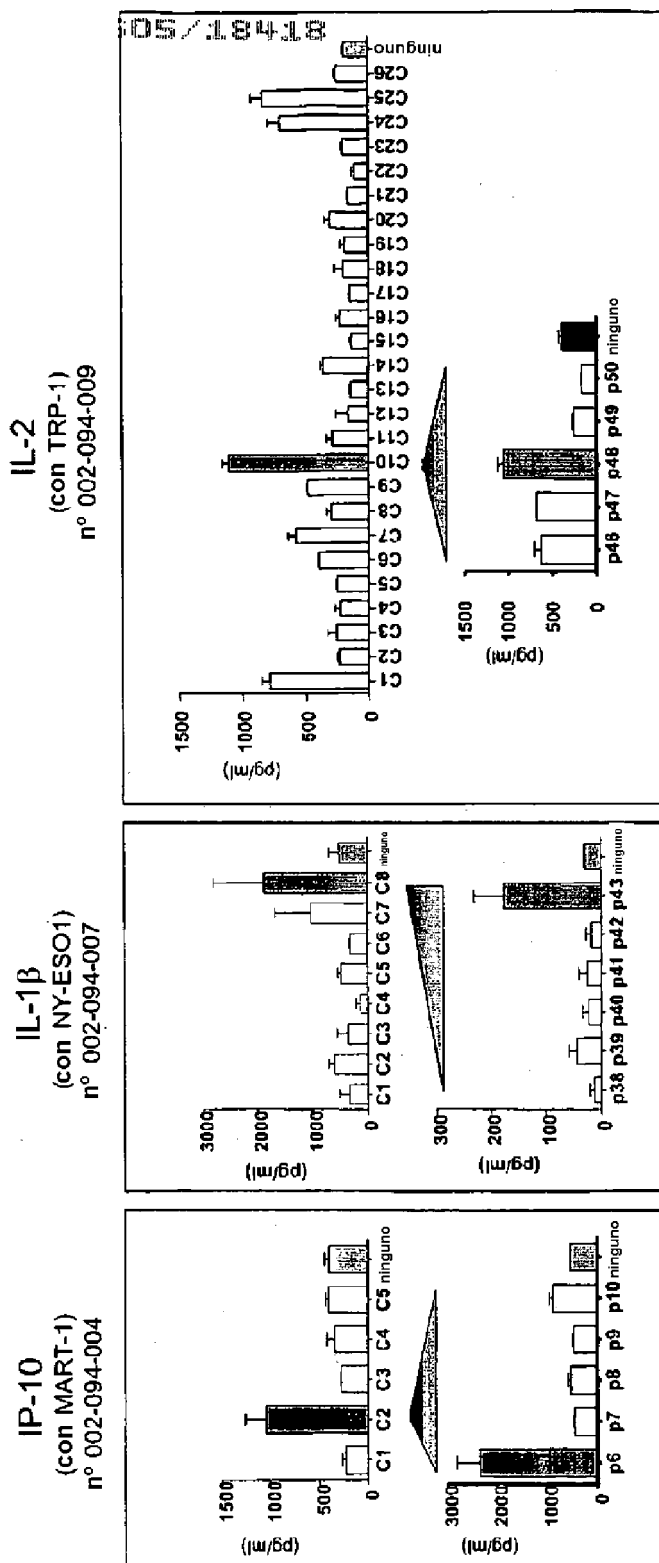


Figura 9

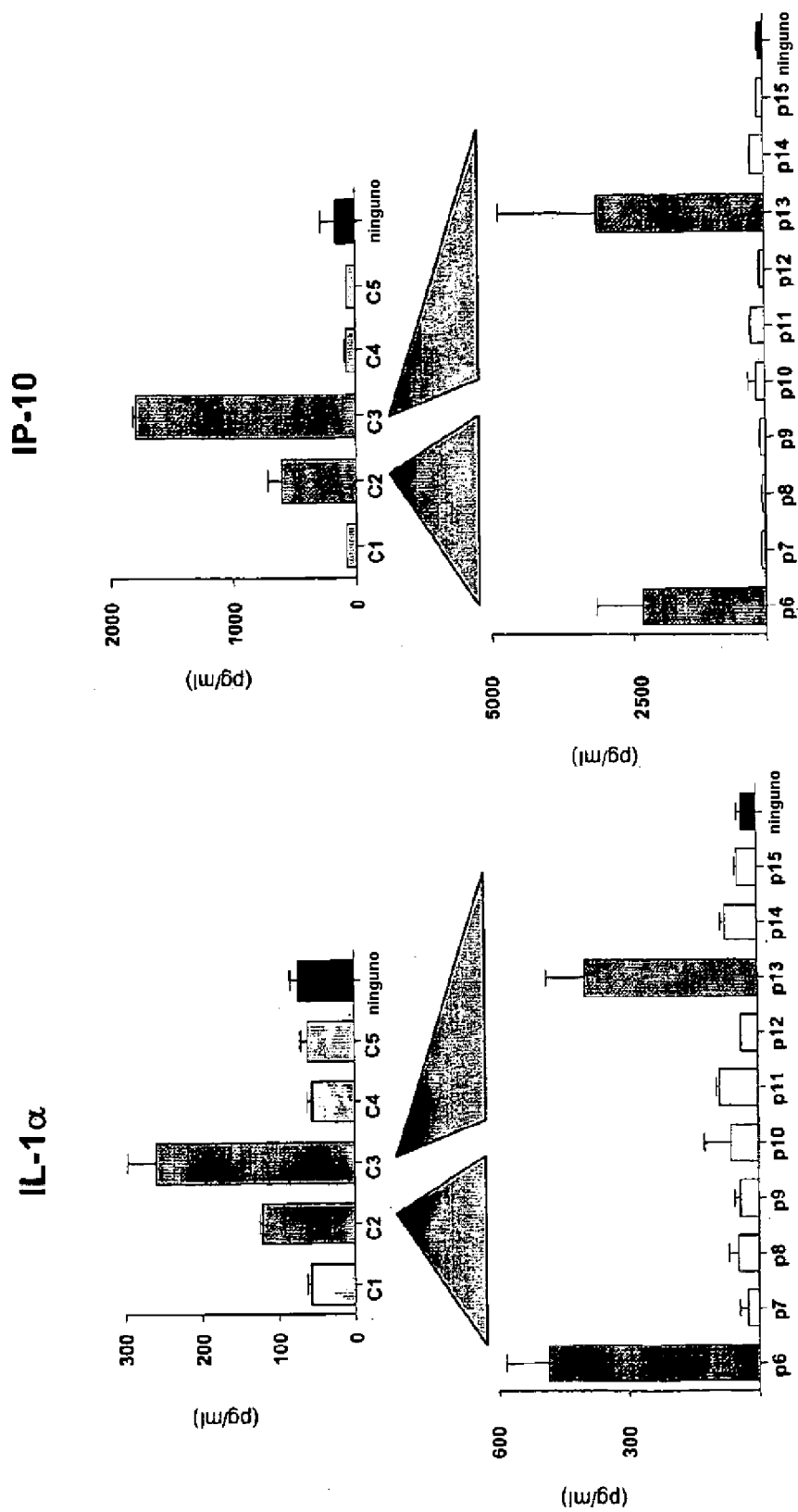


Figura 10

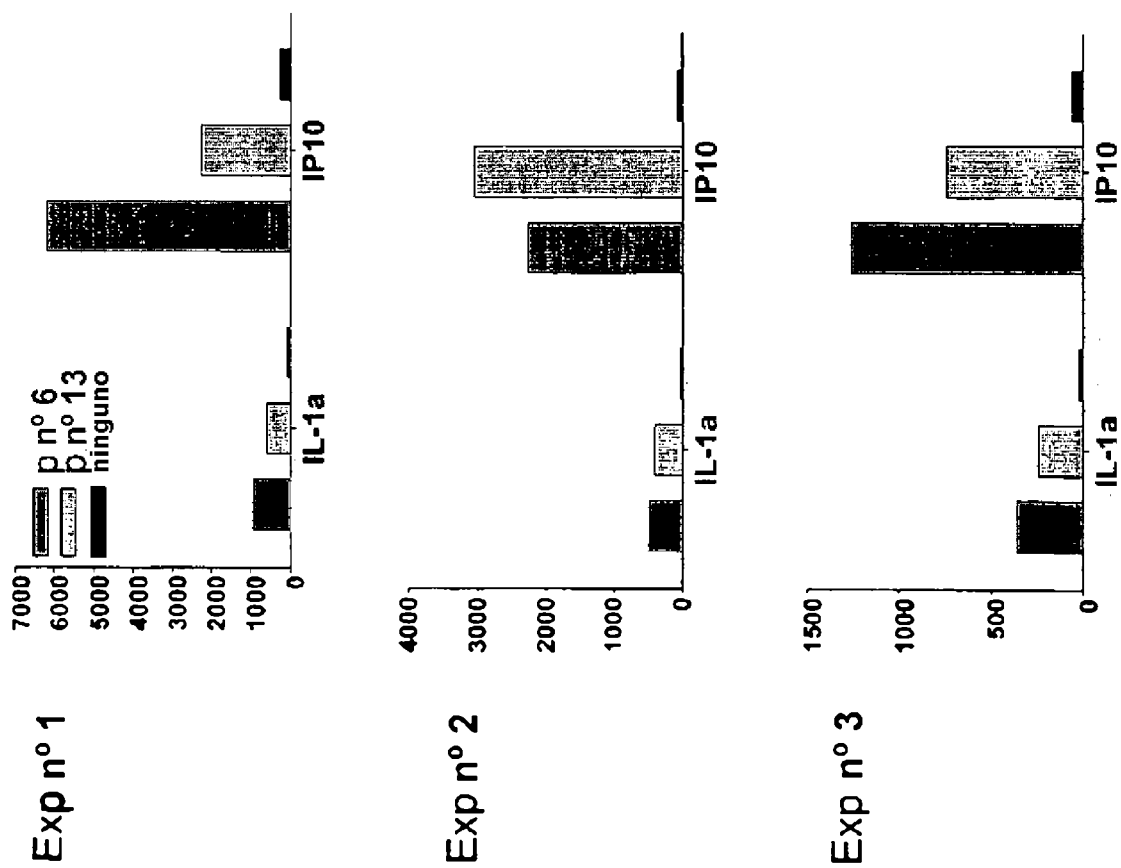


Figura 11

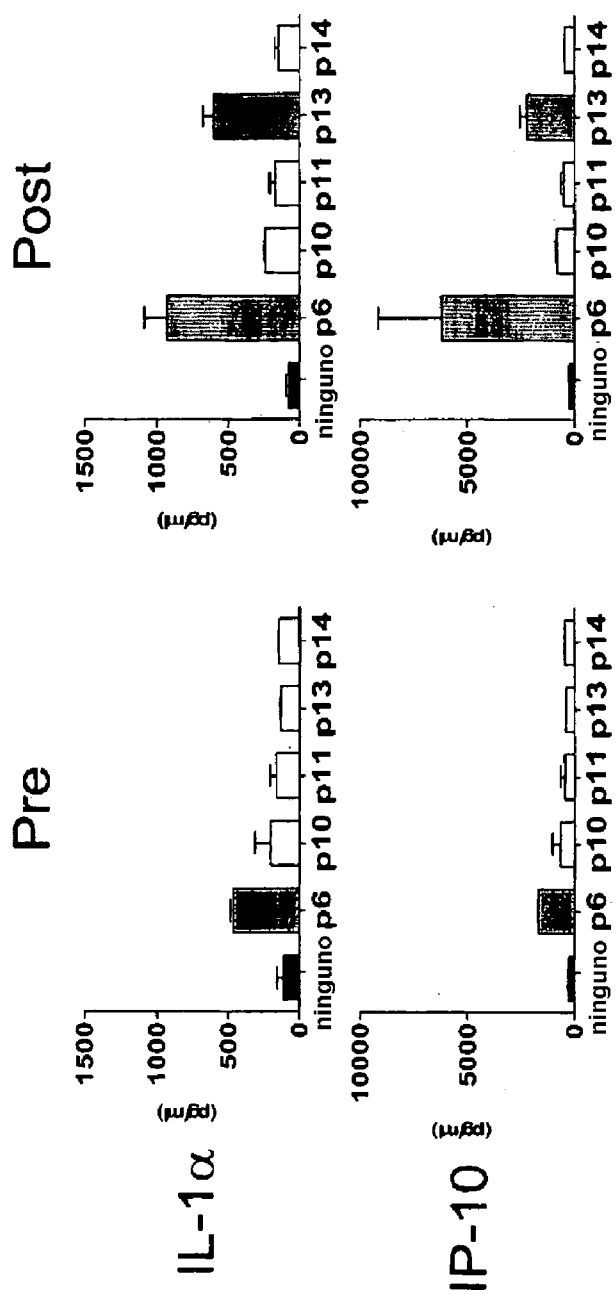


Figura 12A

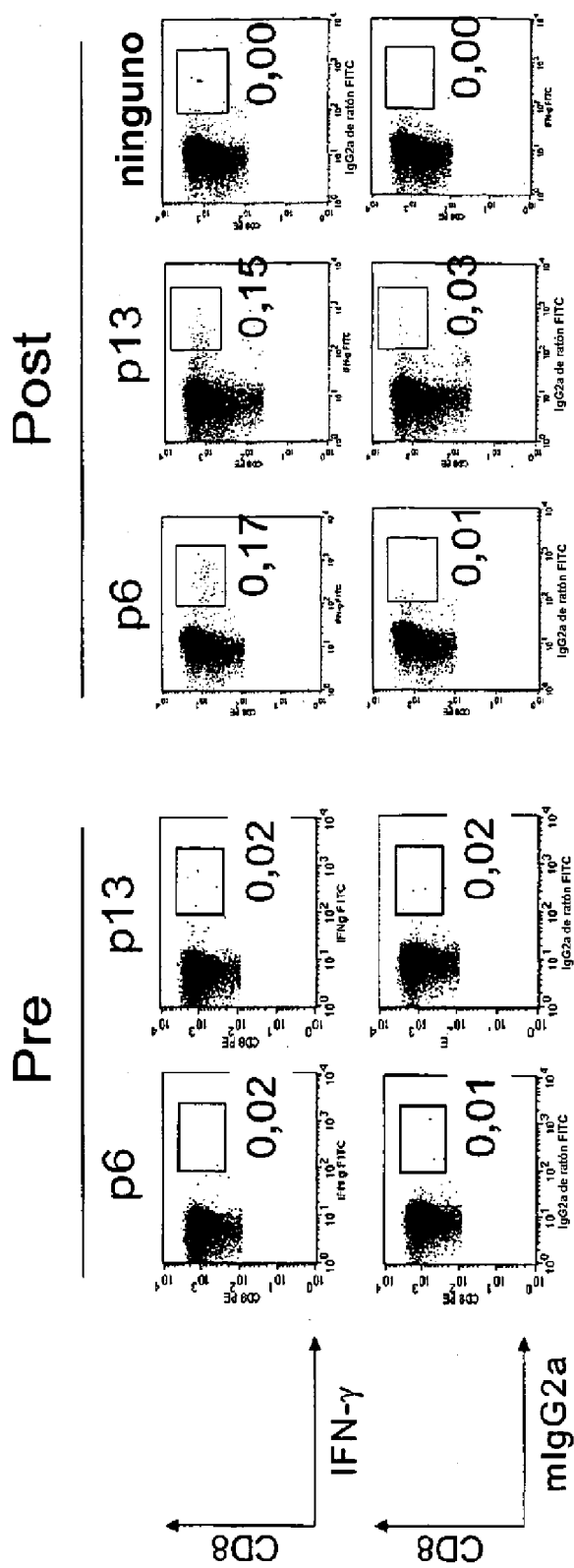


Figura 12B

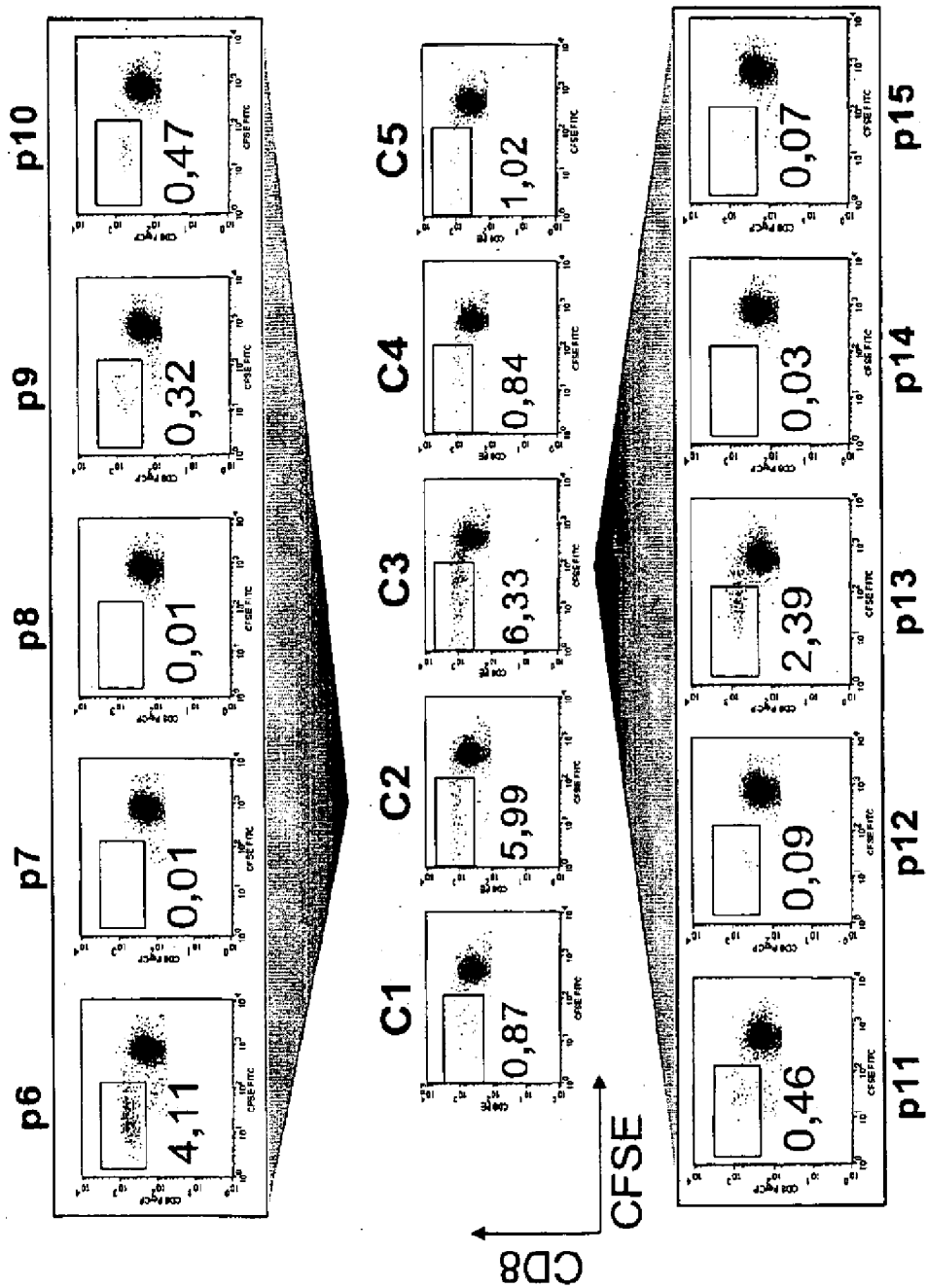


Figura 13

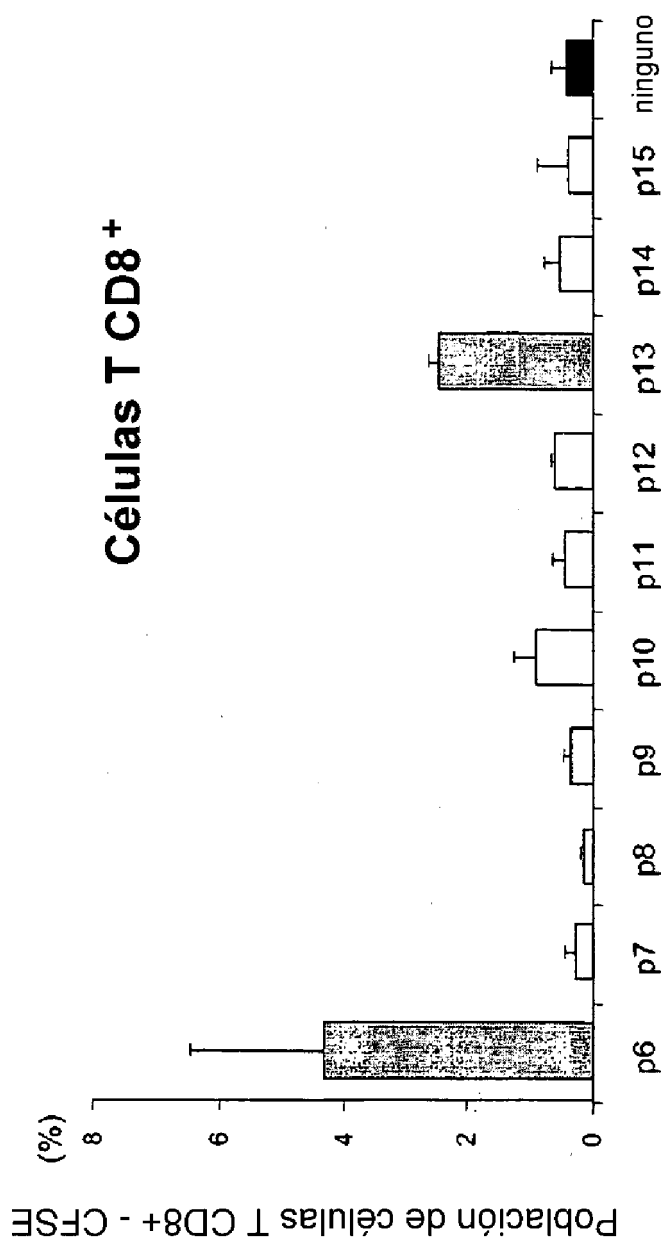


Figura 14

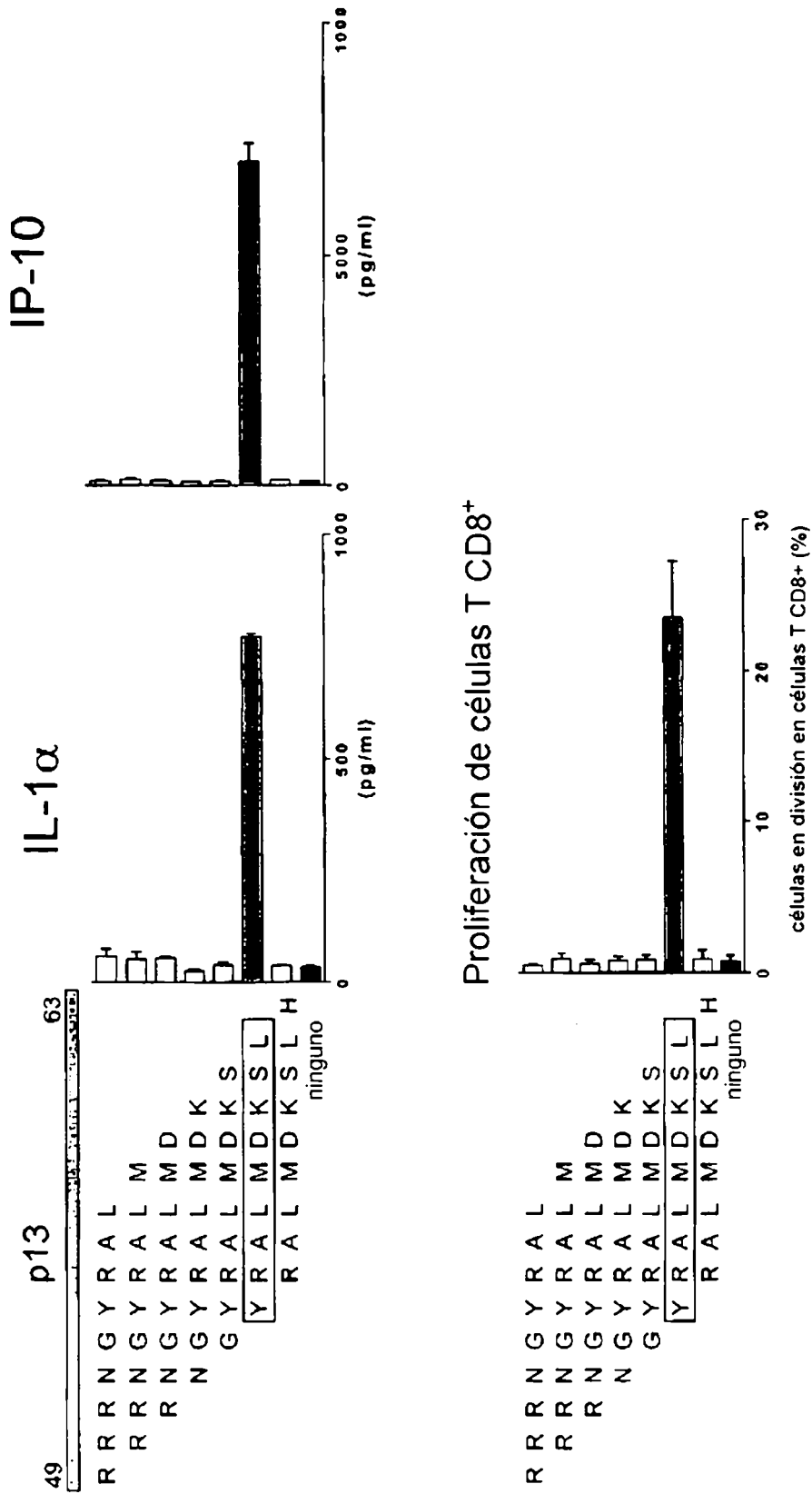


Figura 15

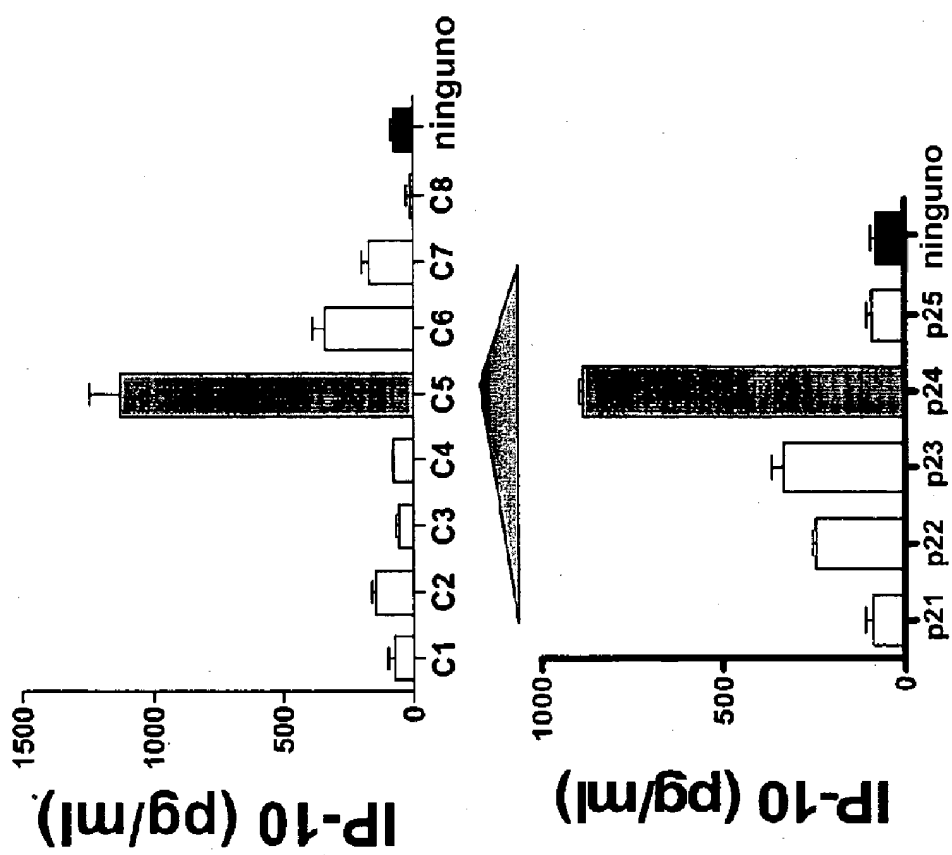


Figura 16A

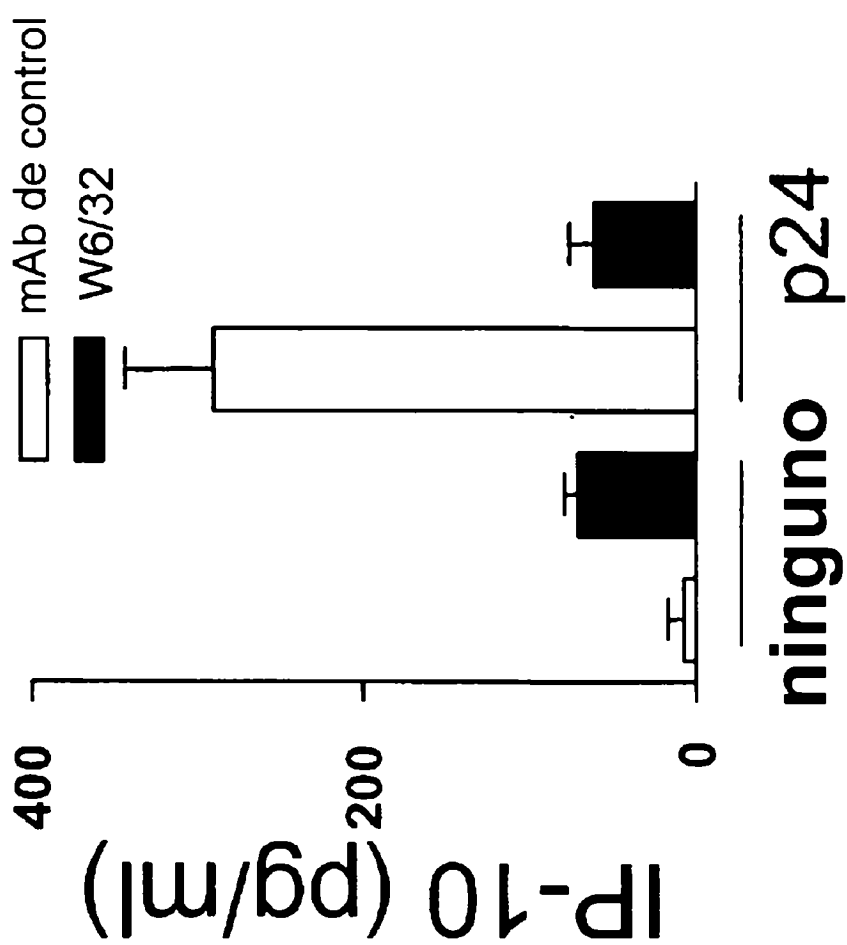


Figura 16B



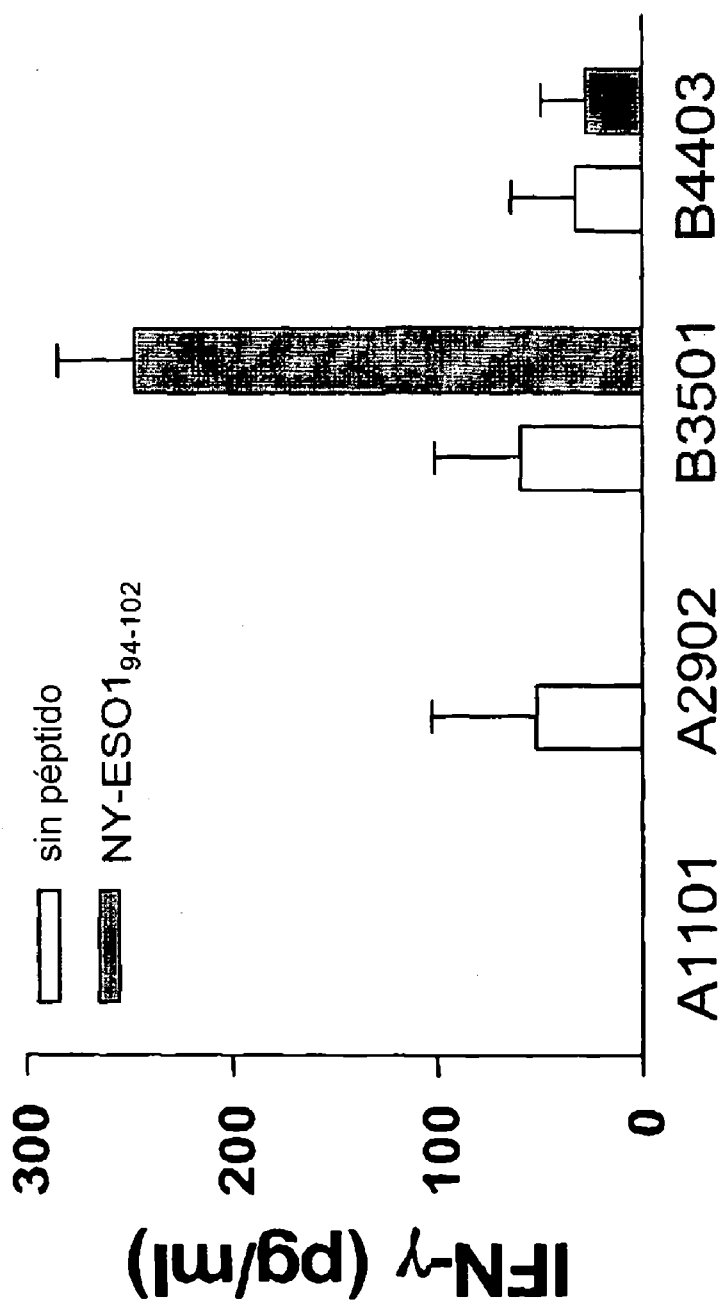


Figura 16D

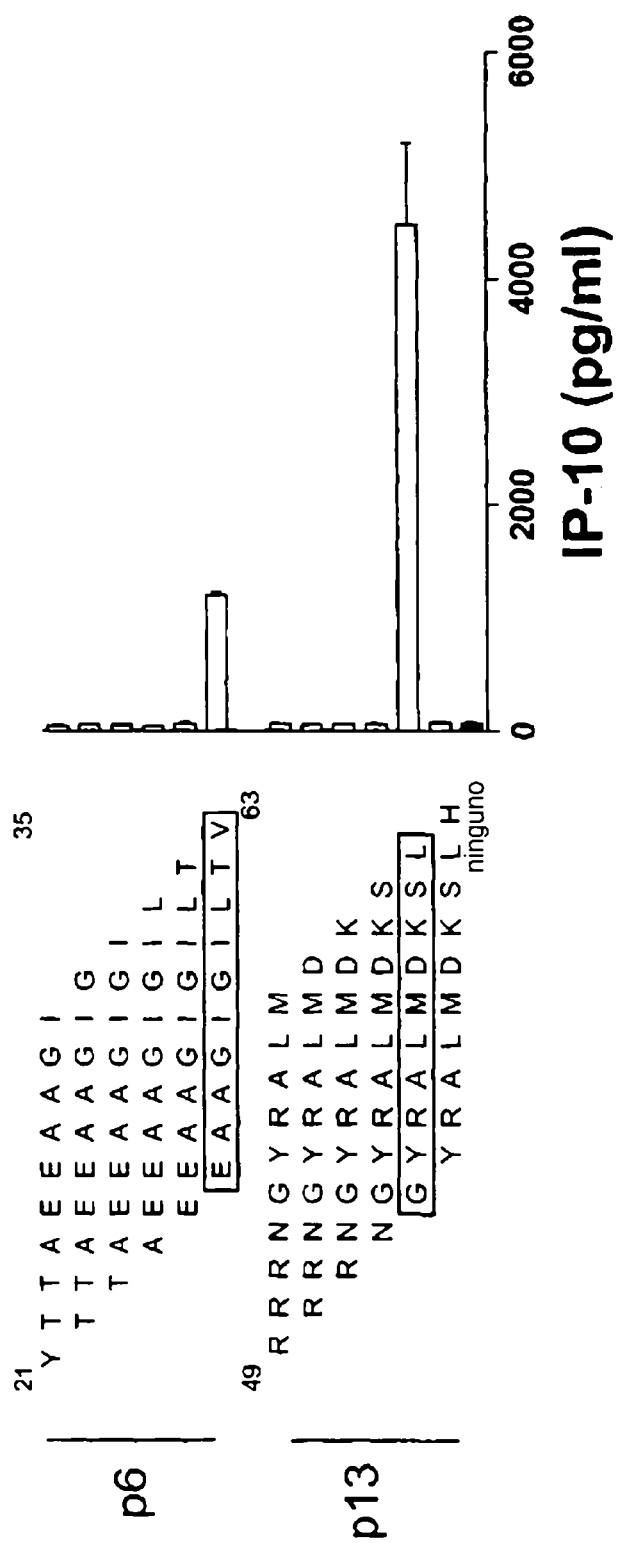


Figura 17

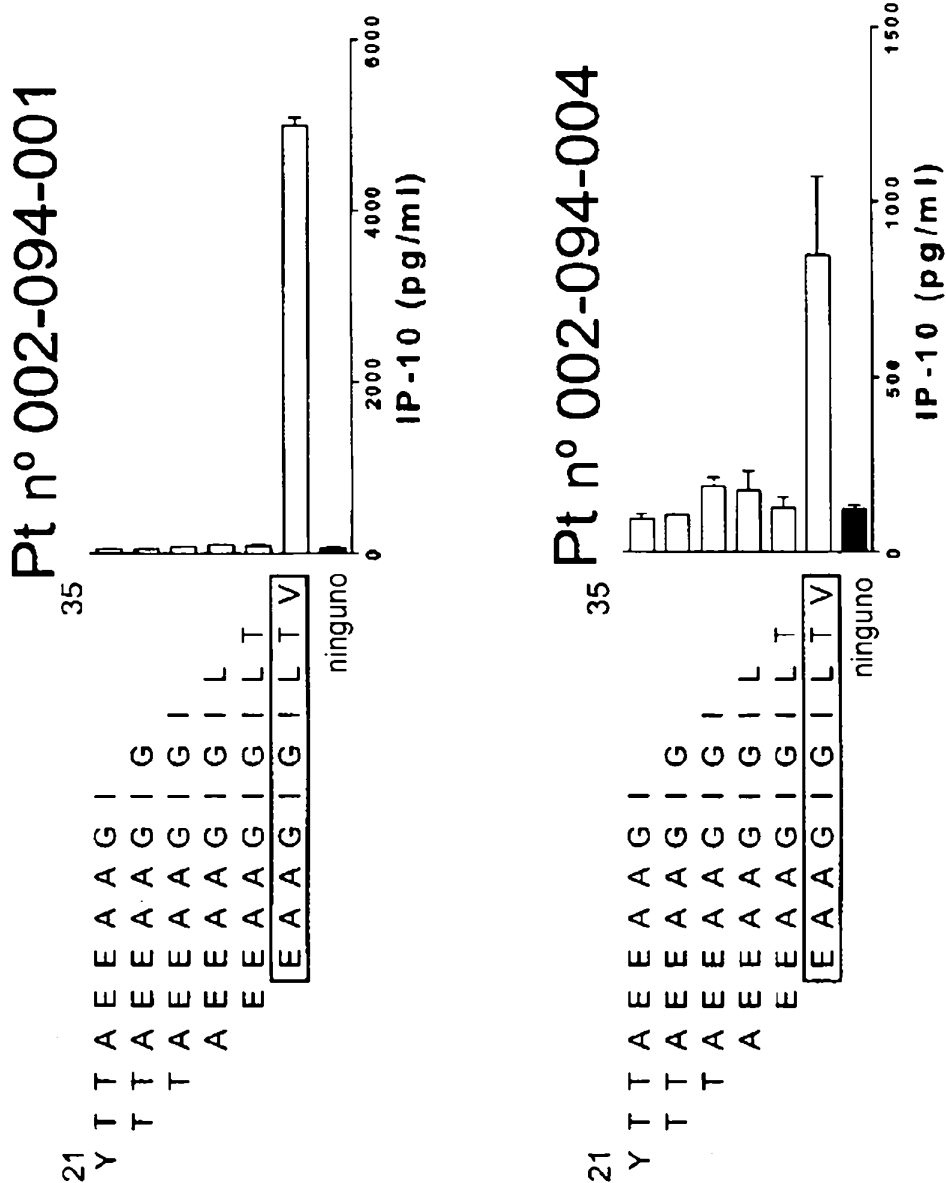


Figura 18

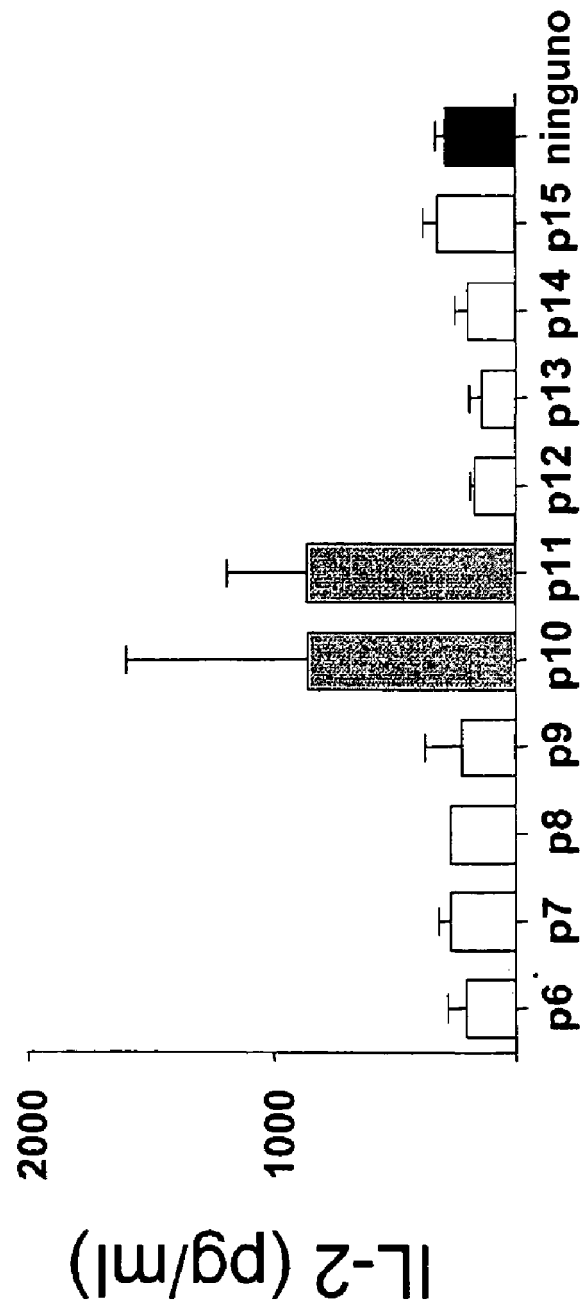


Figura 19

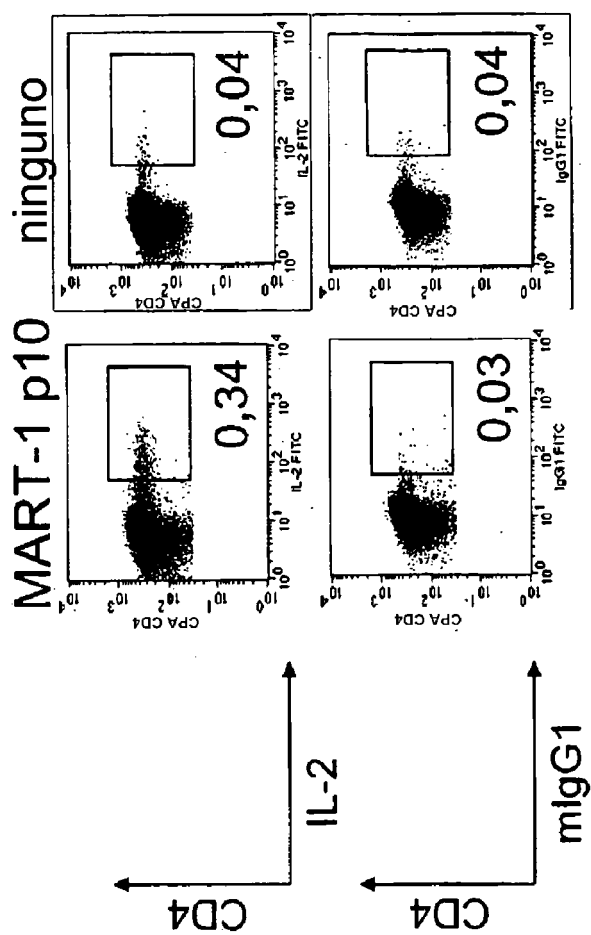


Figura 20

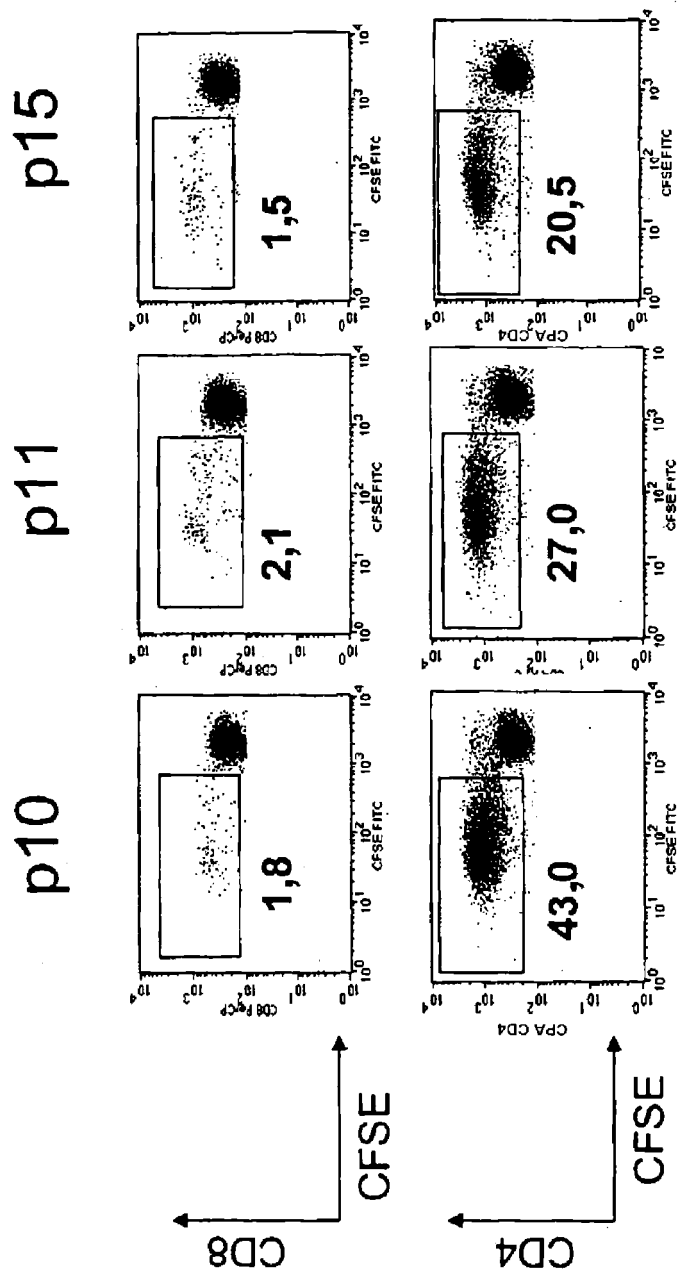


Figura 21A

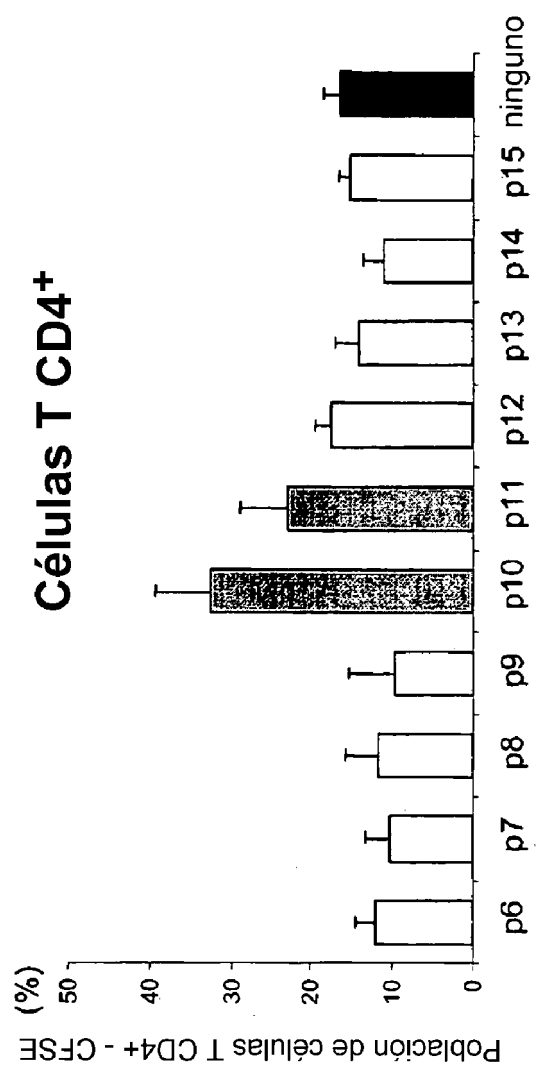


Figura 21B

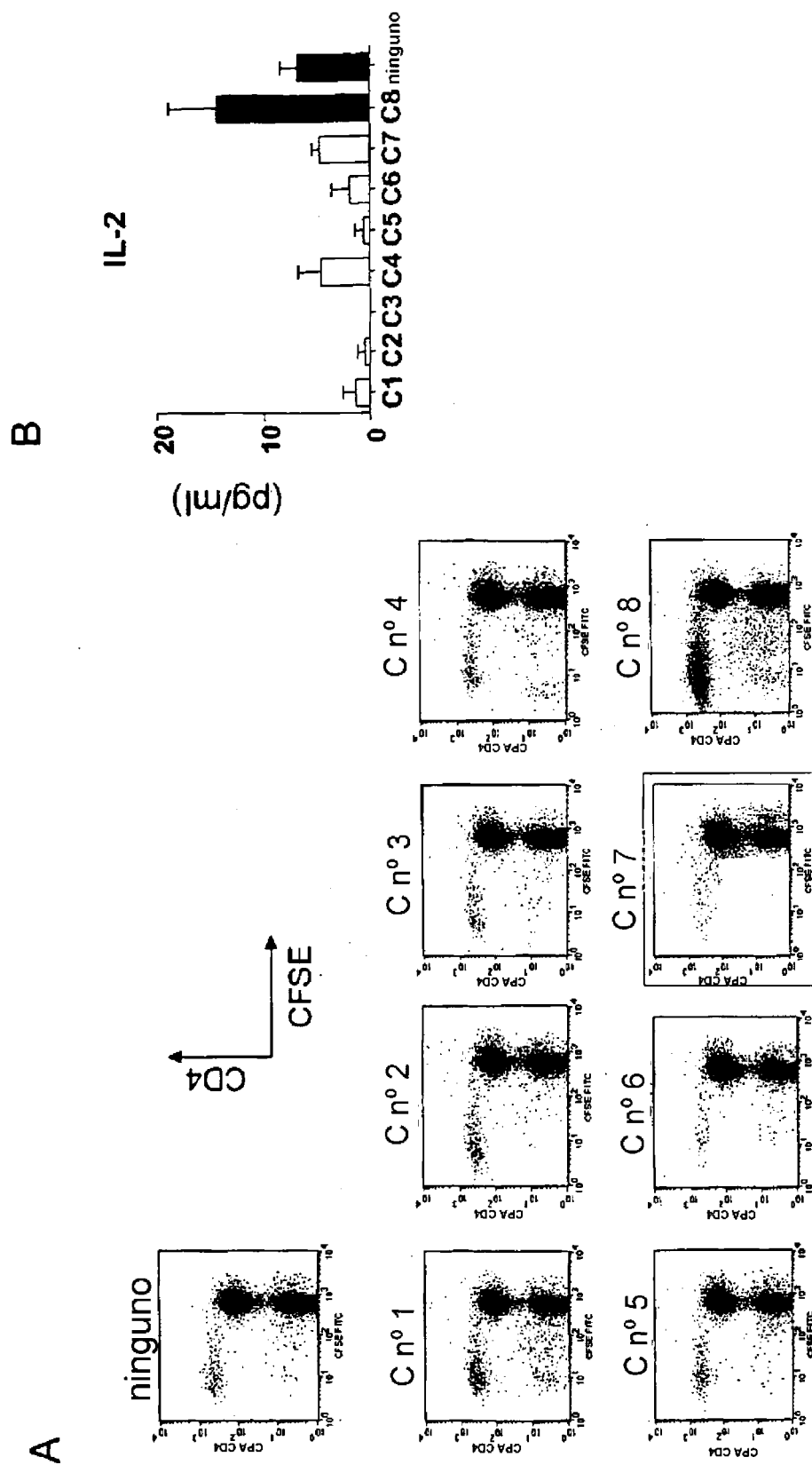


Figura 22A, B

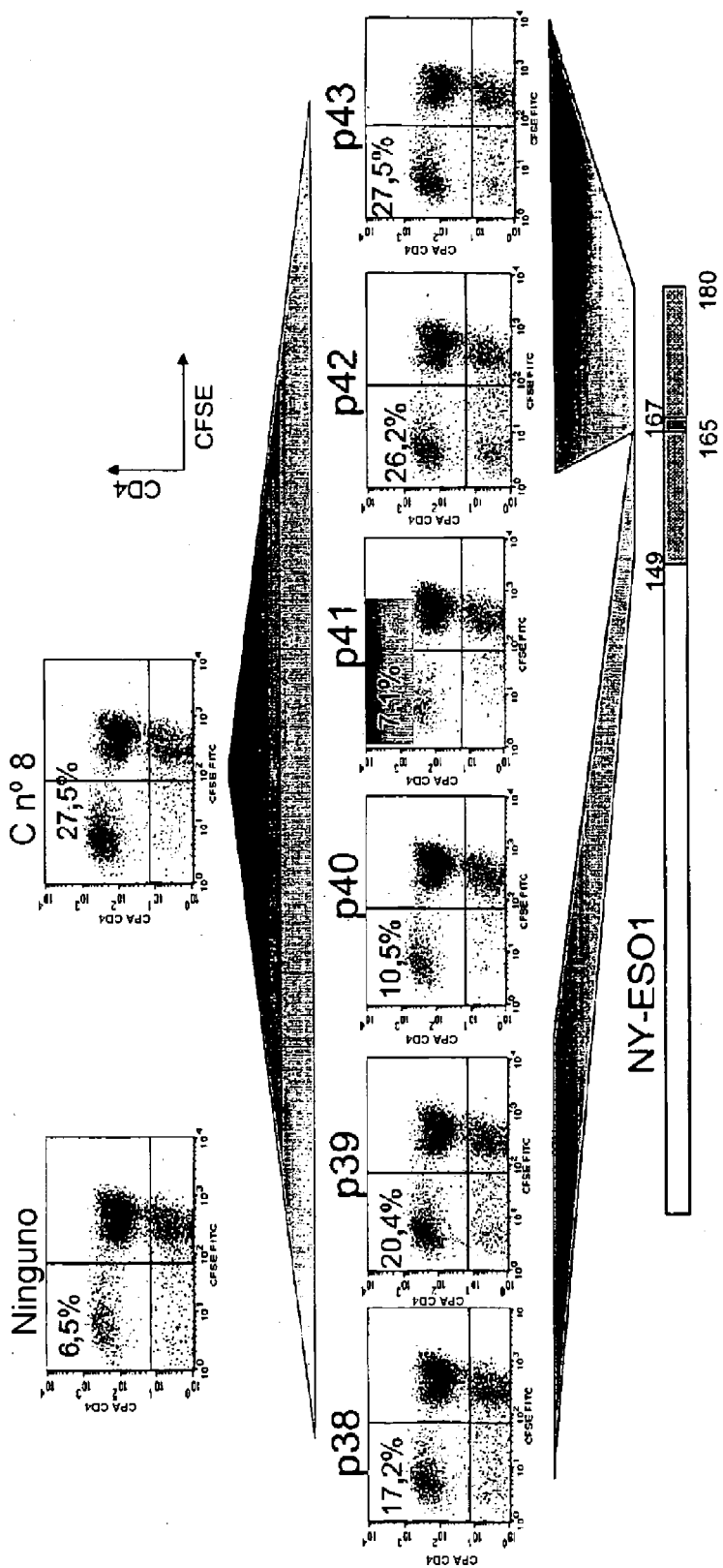


Figura 22C

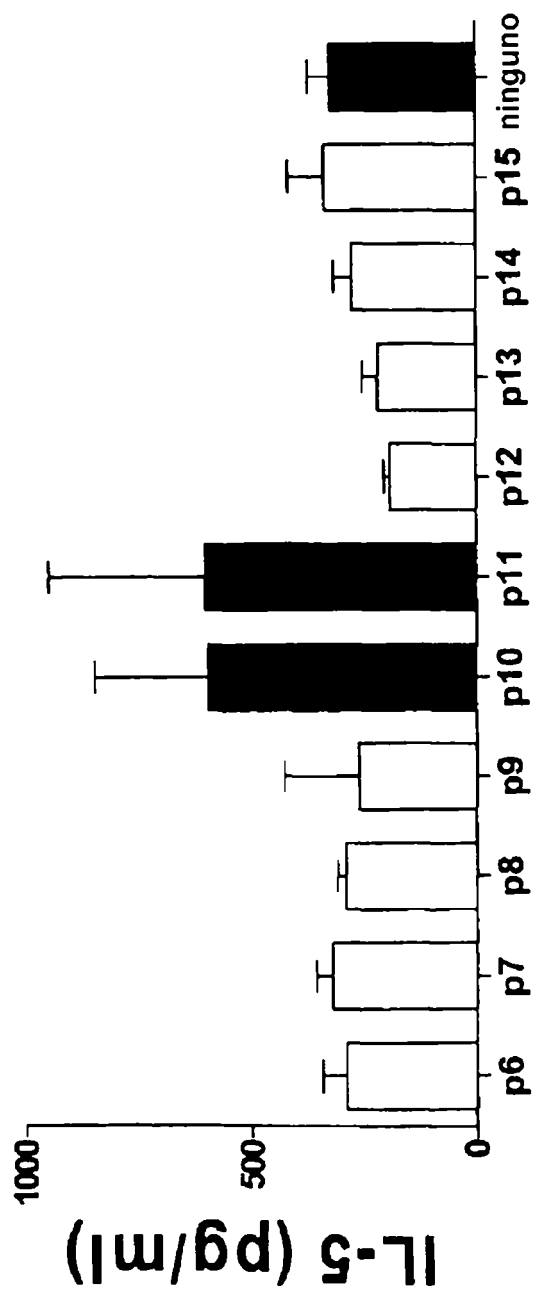


Figura 23

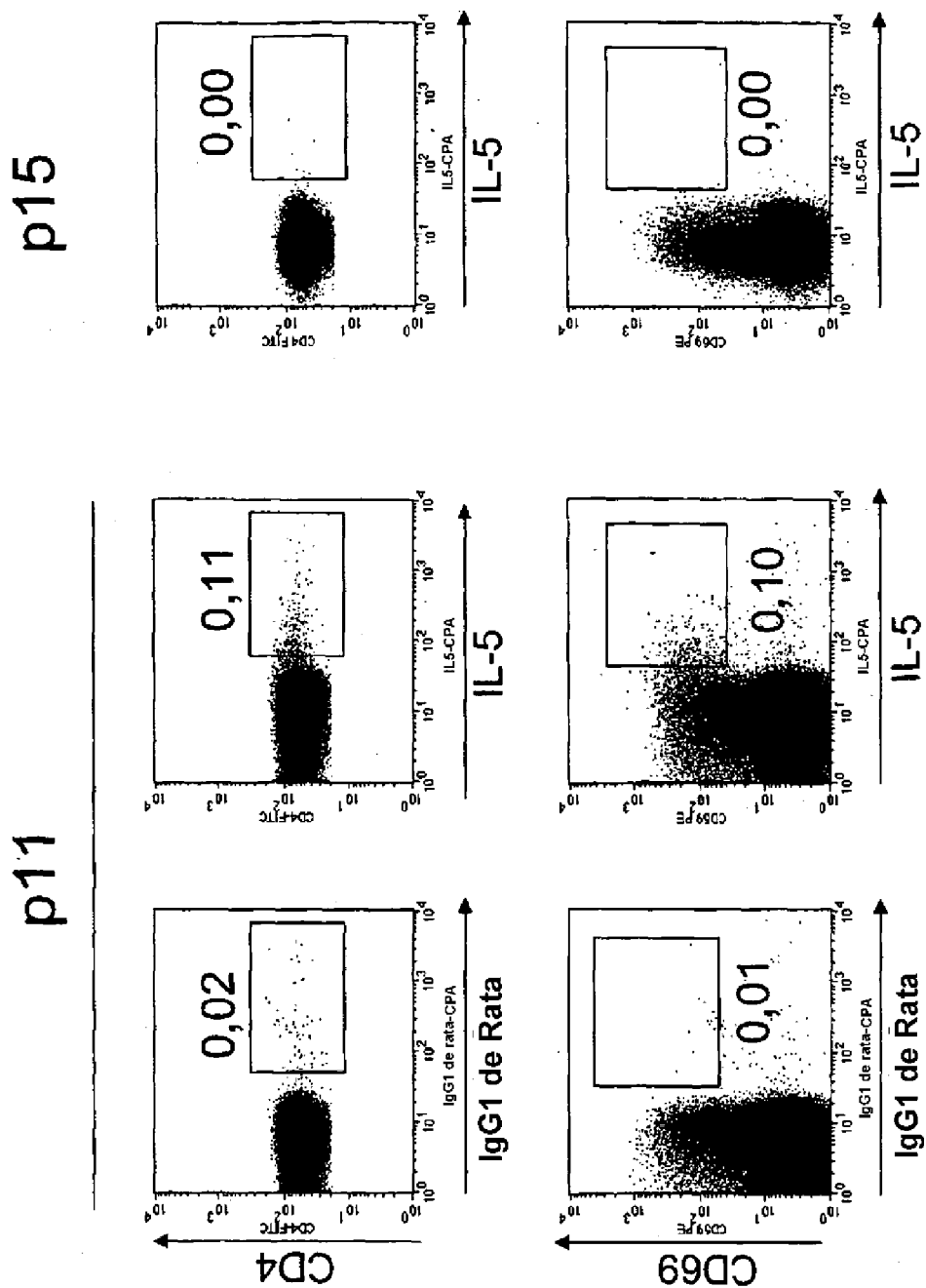
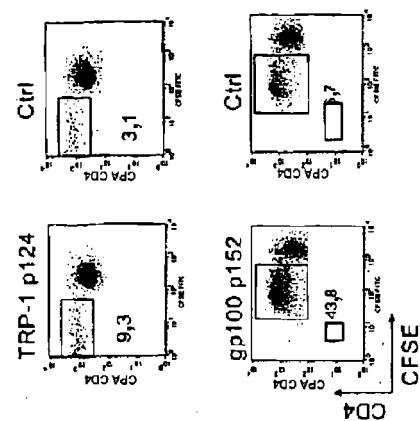
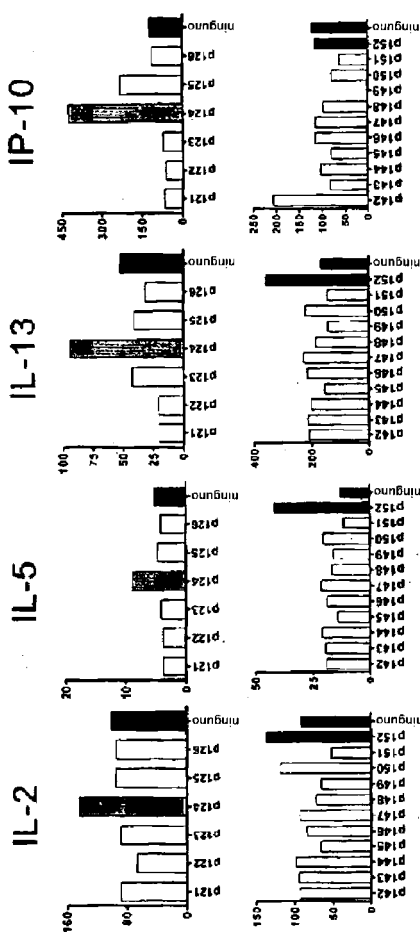


Figura 24

Análisis de CFSE



Análisis de citocinas



Paciente C

Paciente D

Fig. 25

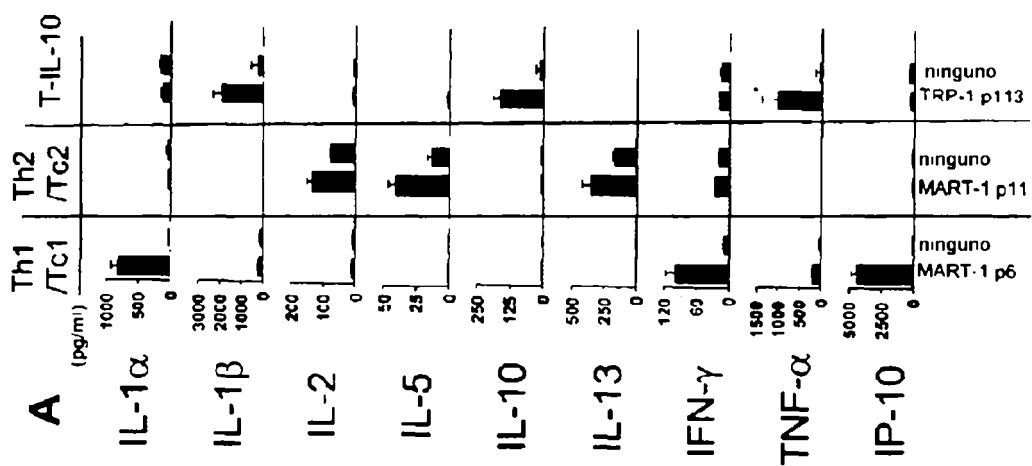


Figura 26

Nuevos epítopes identificados con EPIMAX

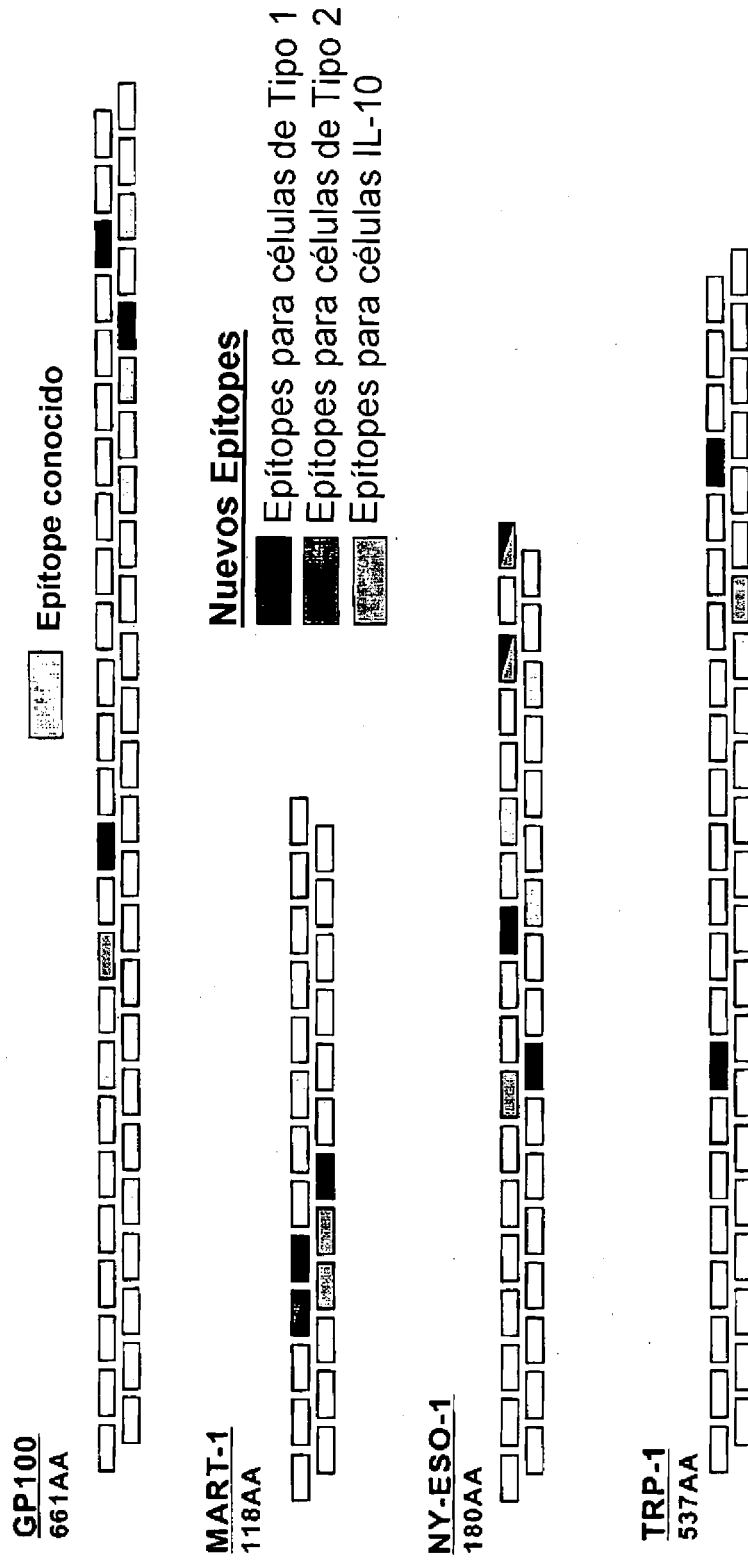


Figura 27

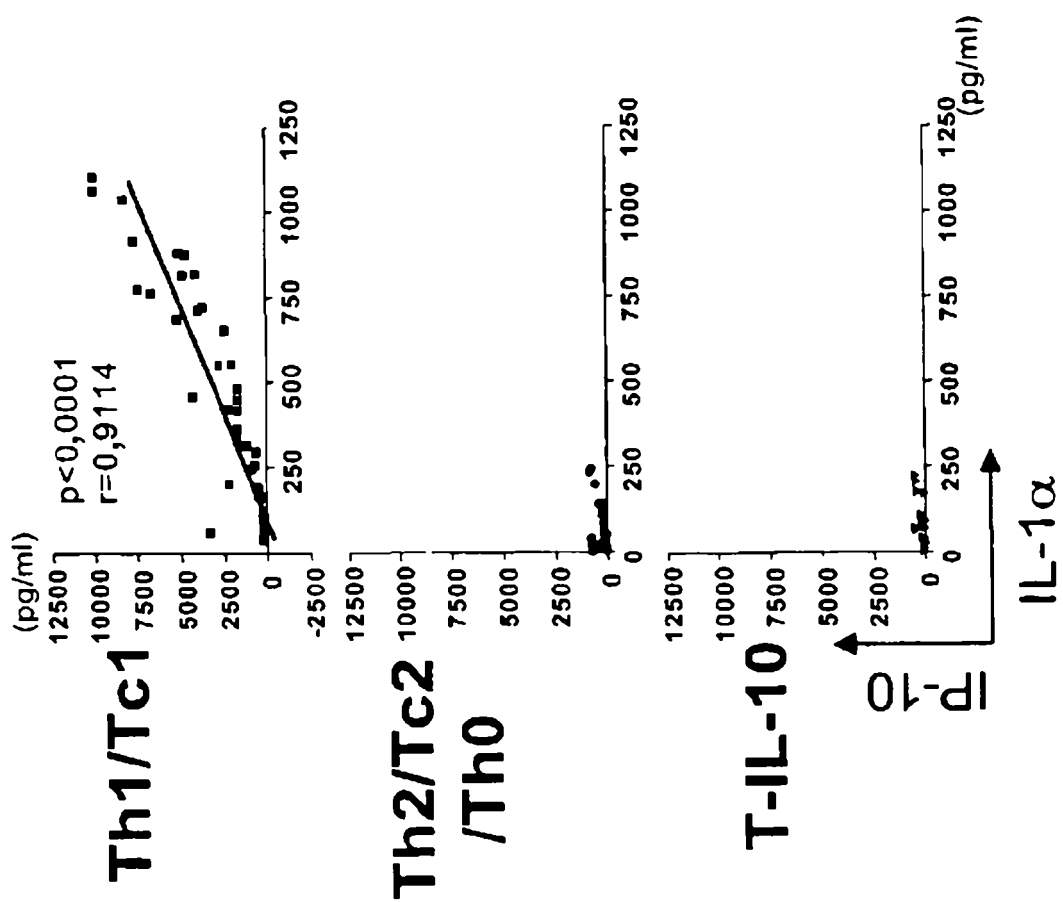


Figura 28

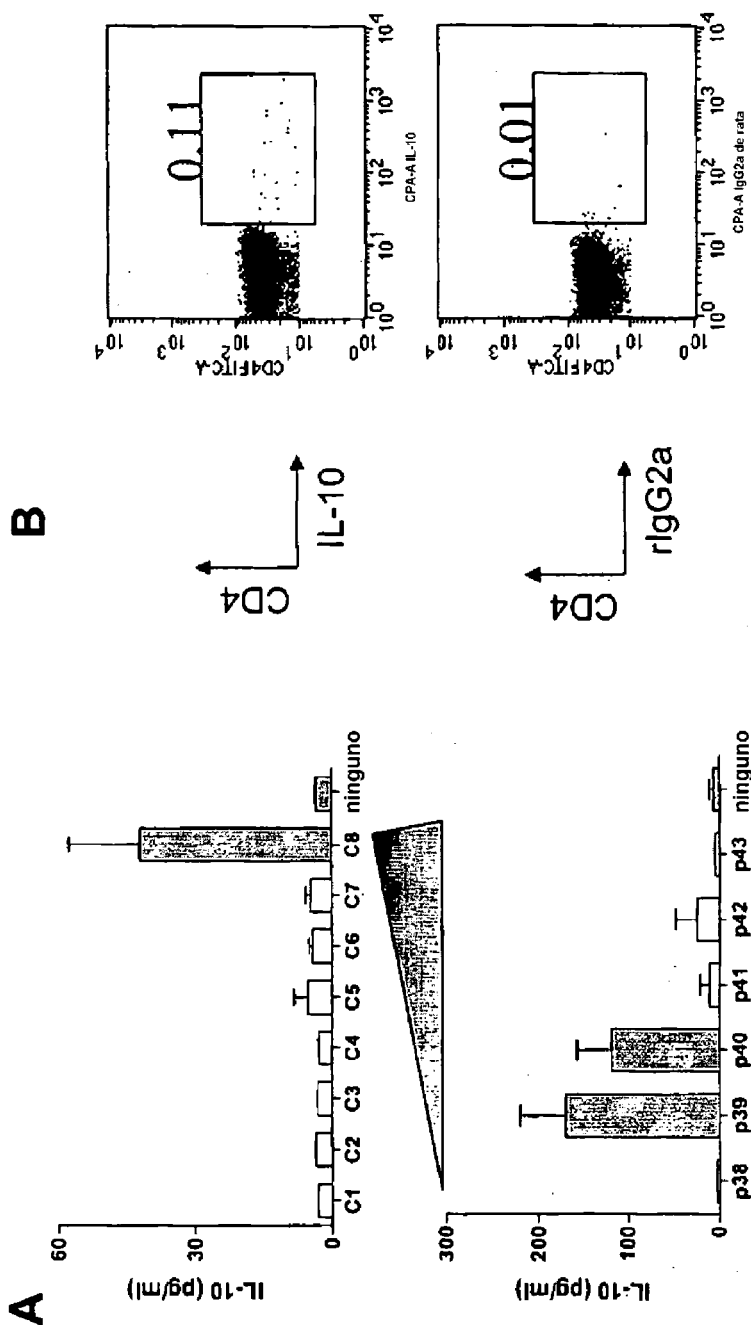


Figura 29

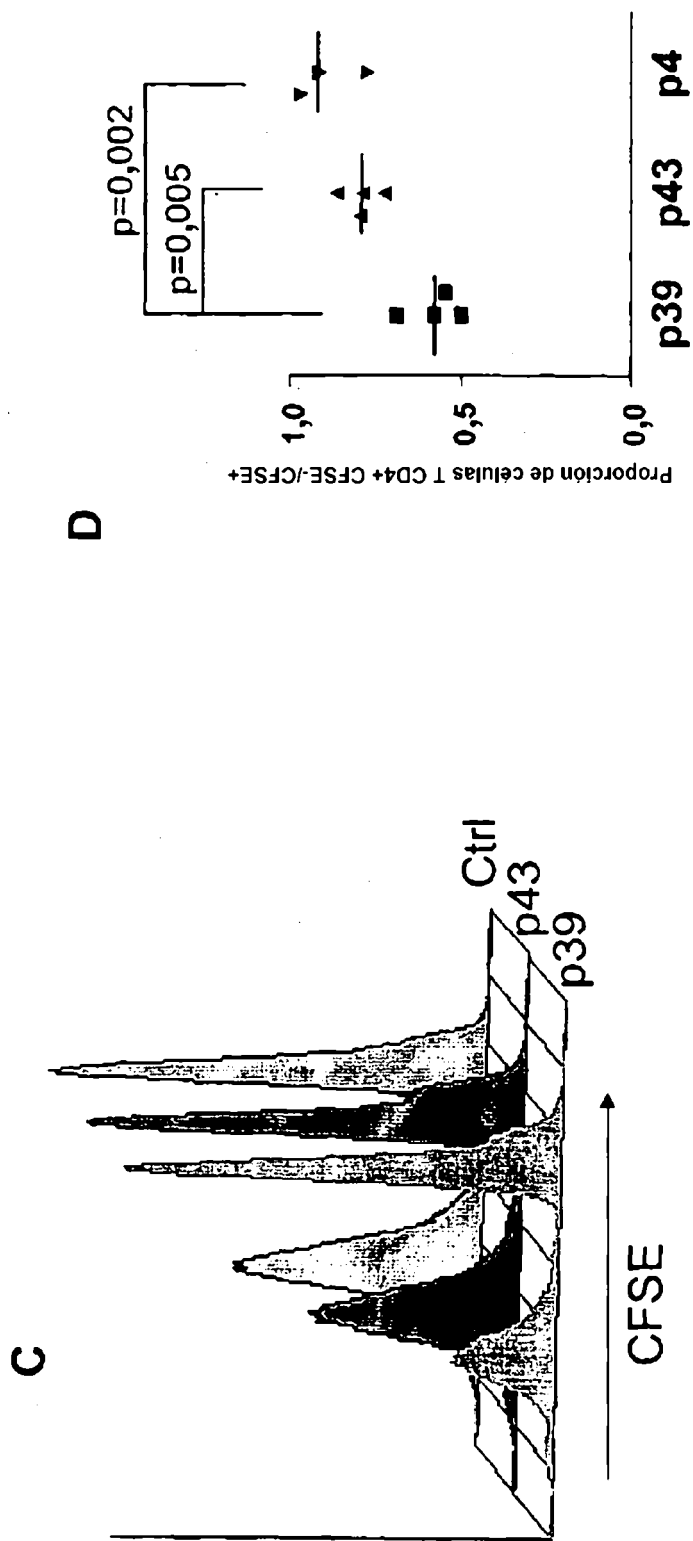


Figura 29

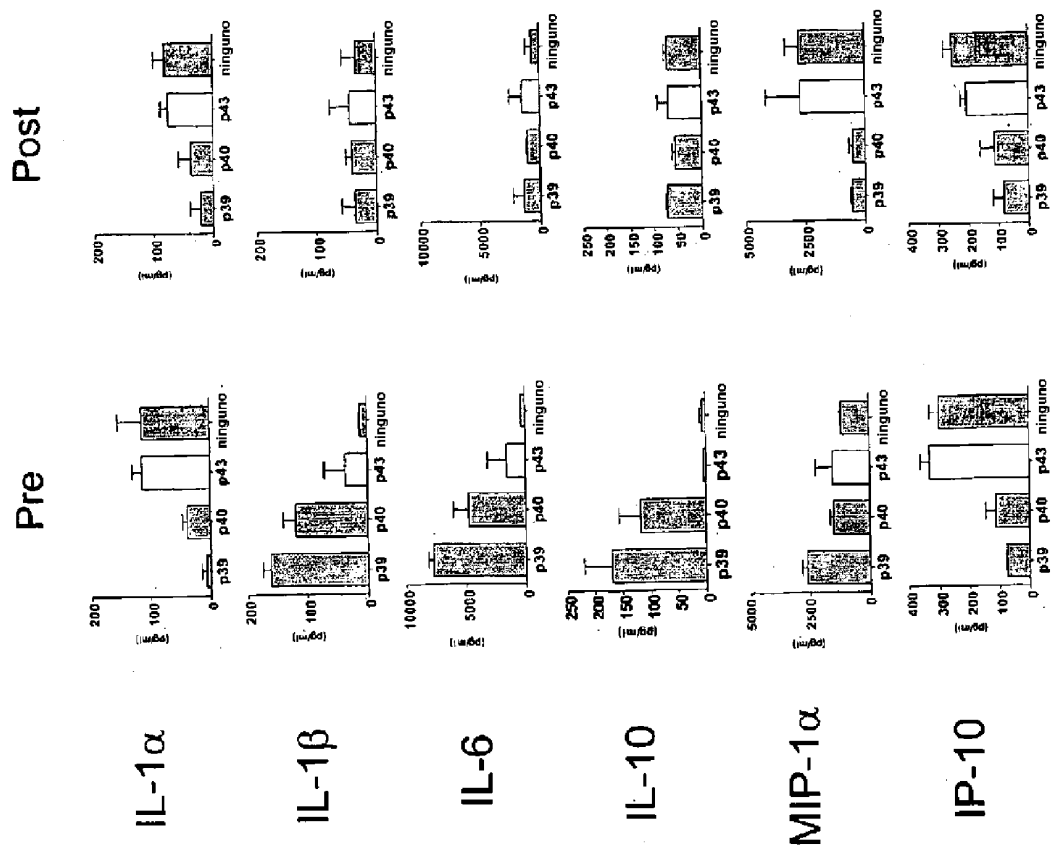


Figura 30

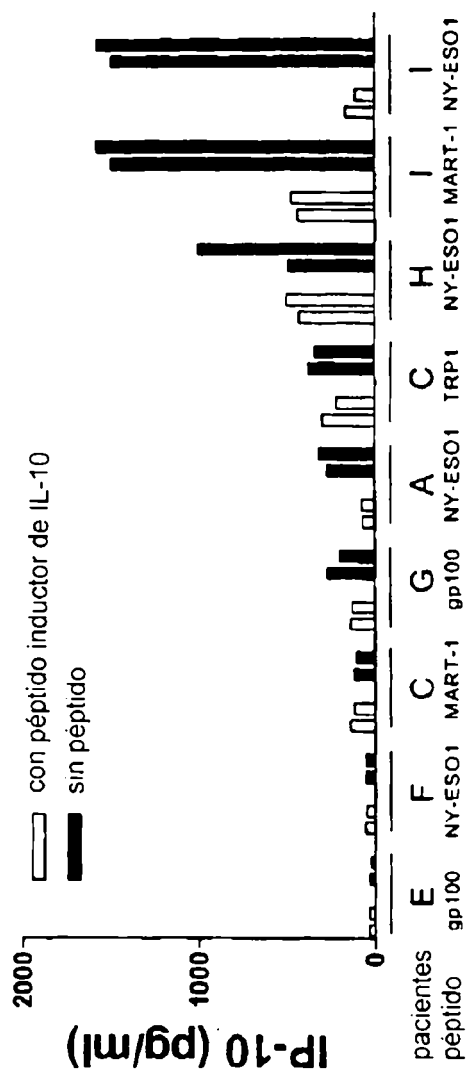


Figura 31

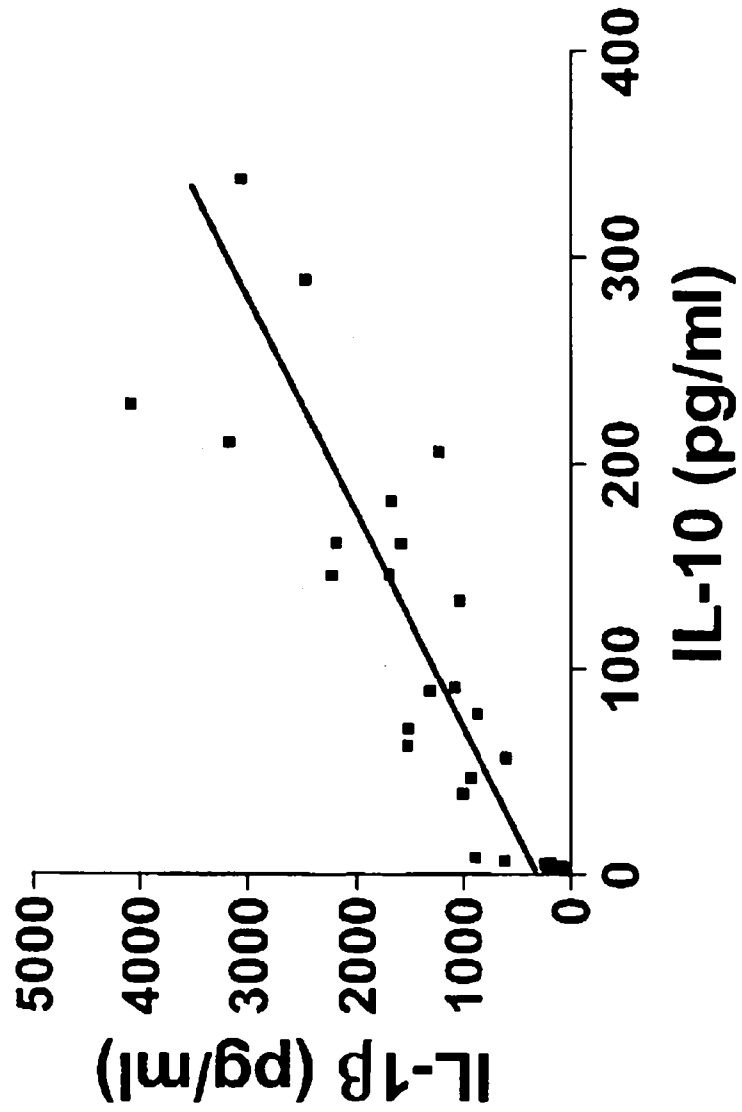


Figura 32

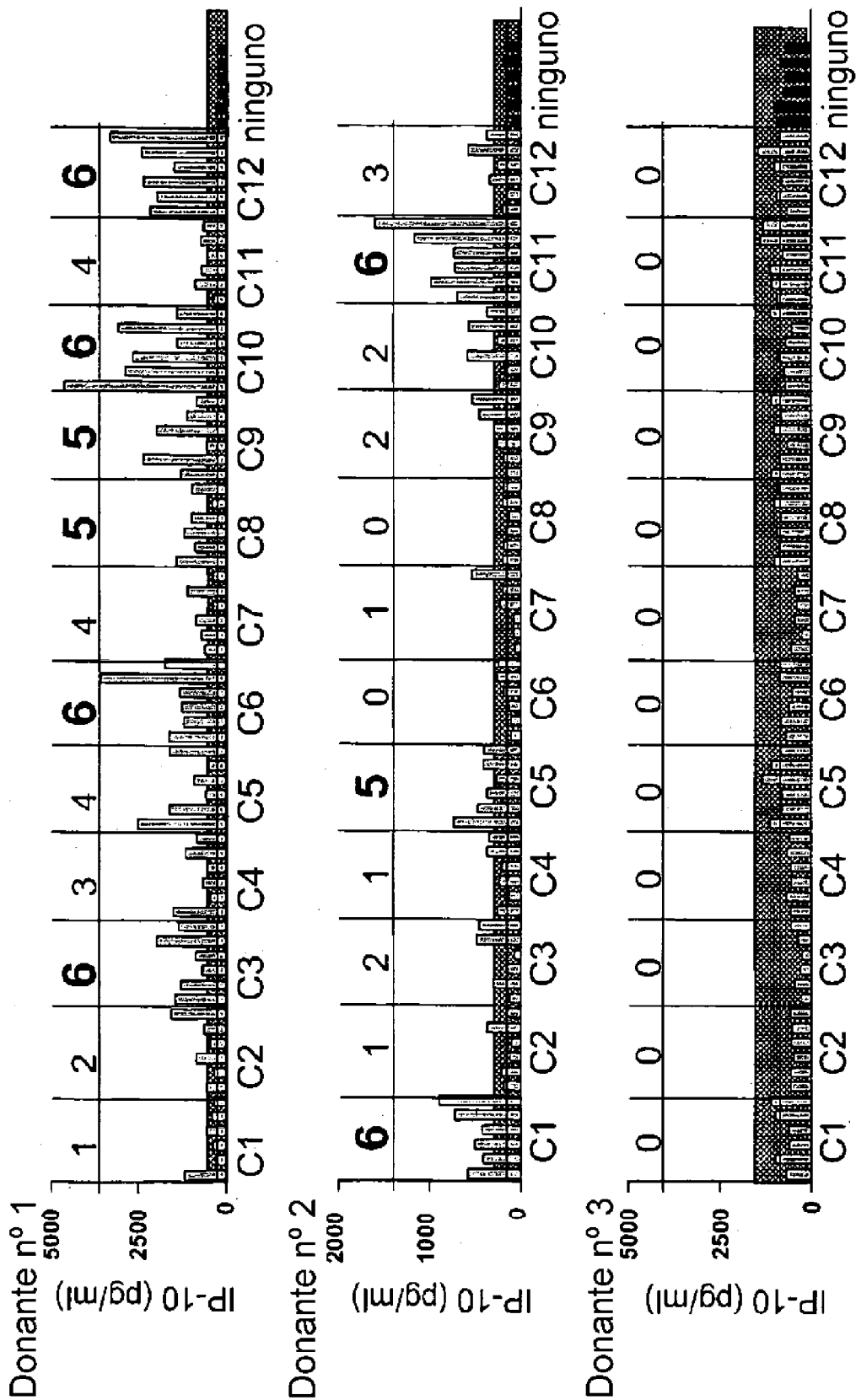


Figura 33

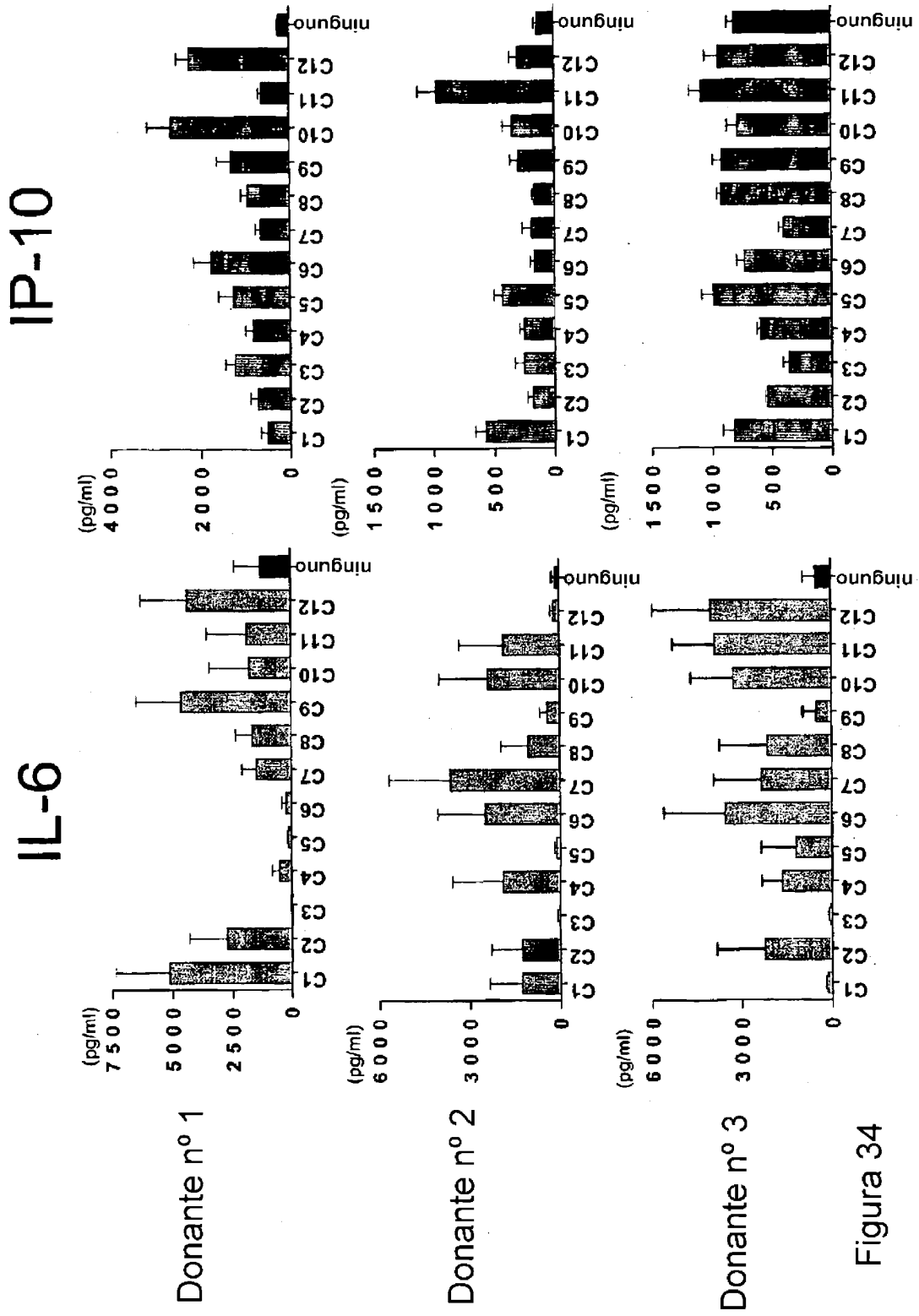


Figura 34

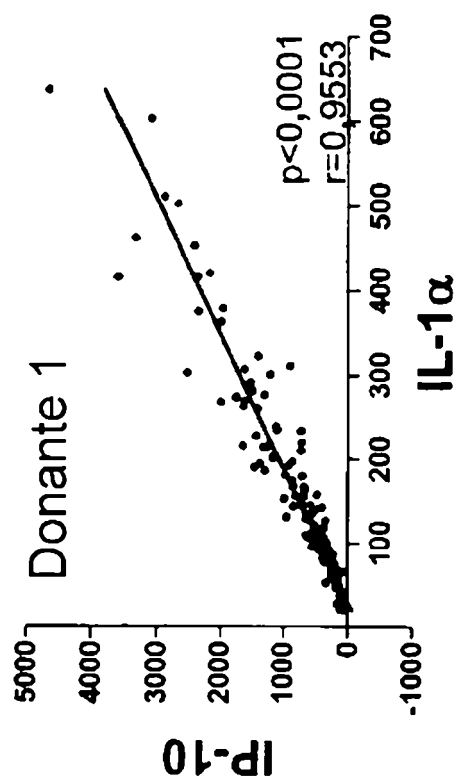
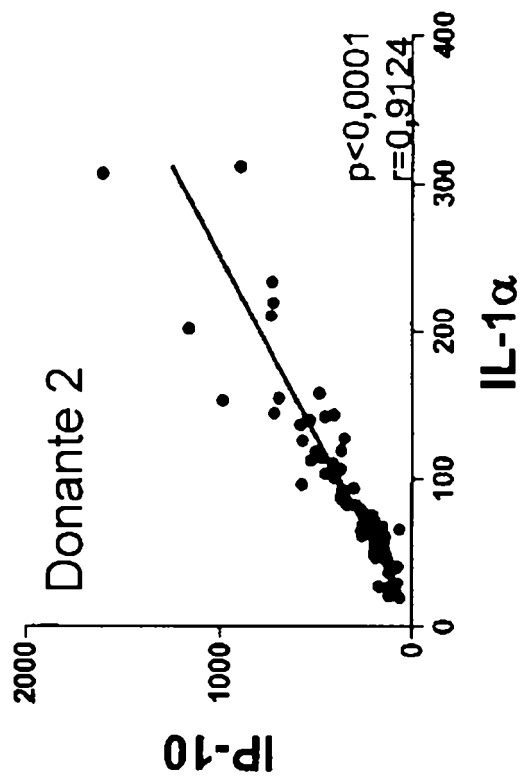


Figura 35

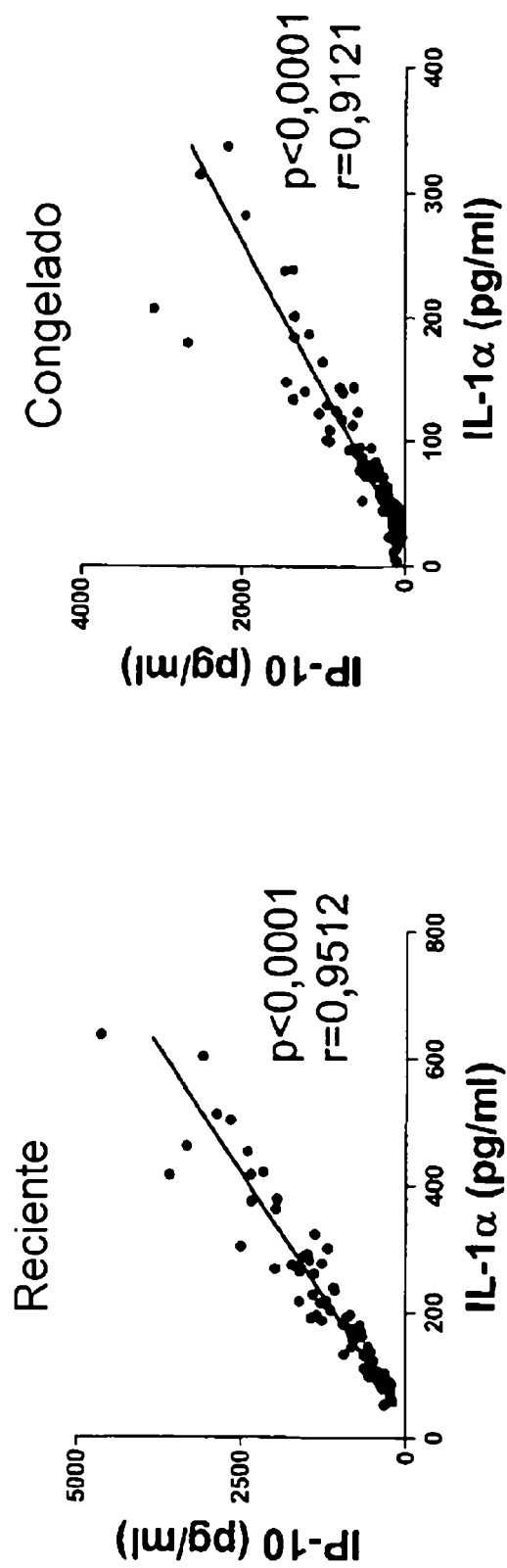


Figura 36

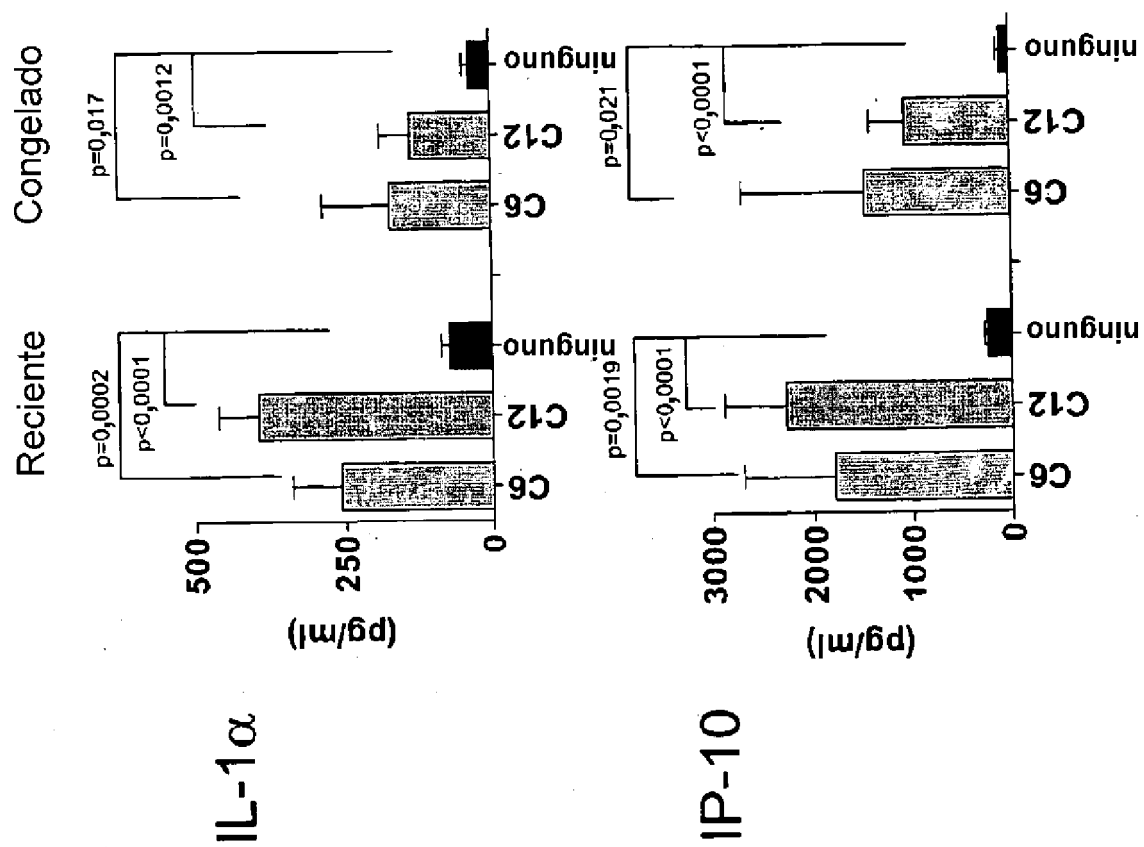


Figura 37

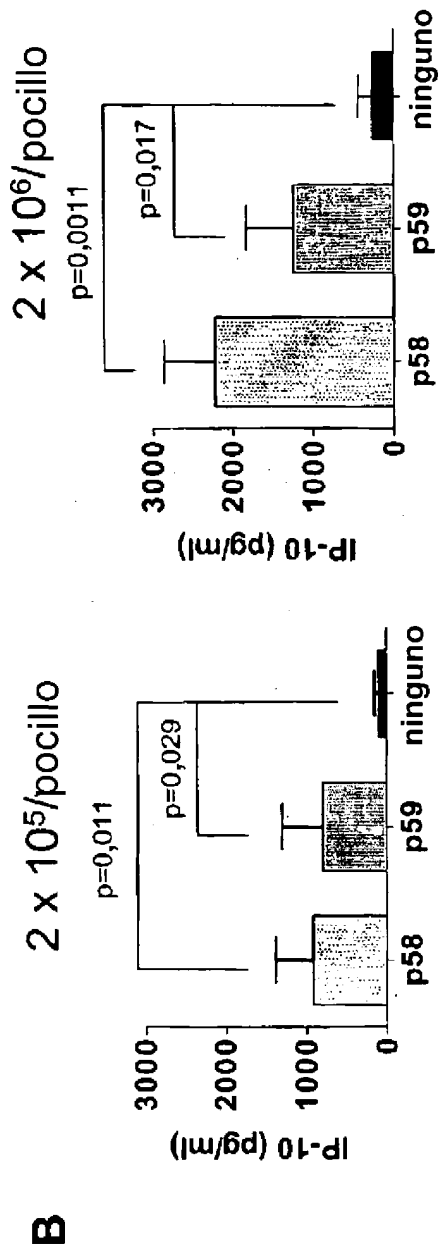
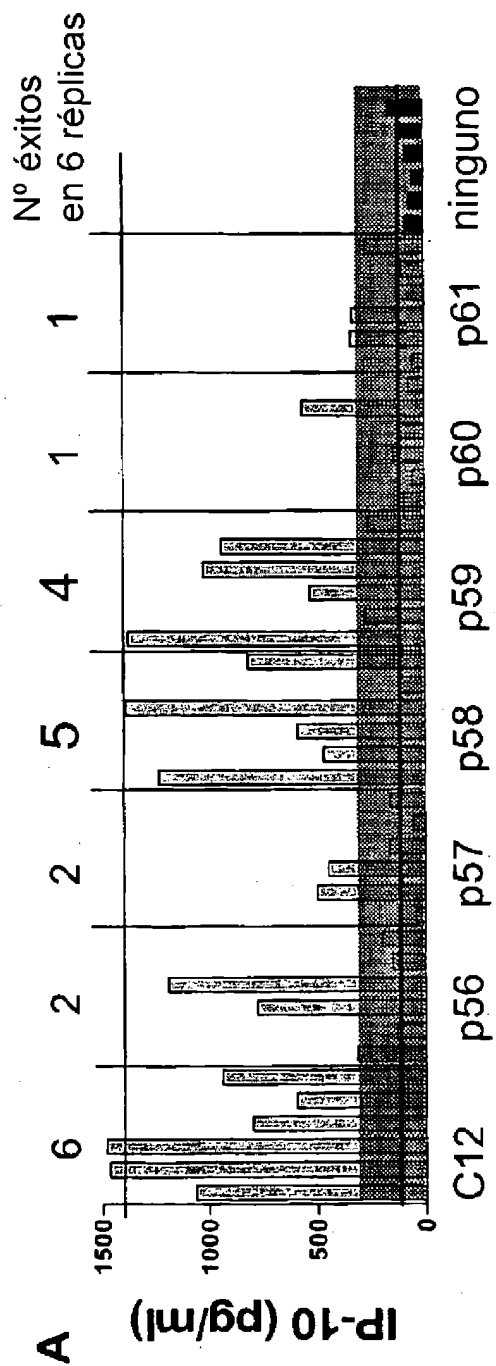


Figura 38

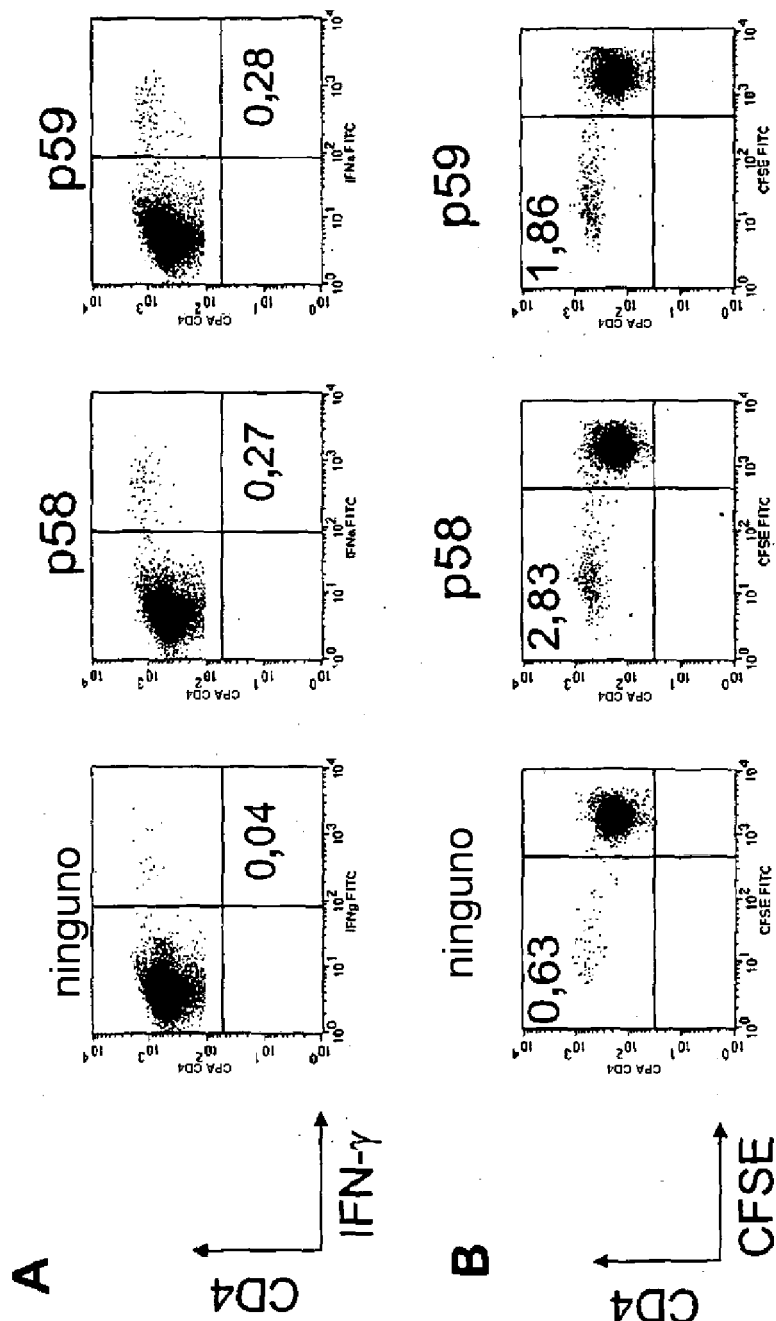


Figura 39

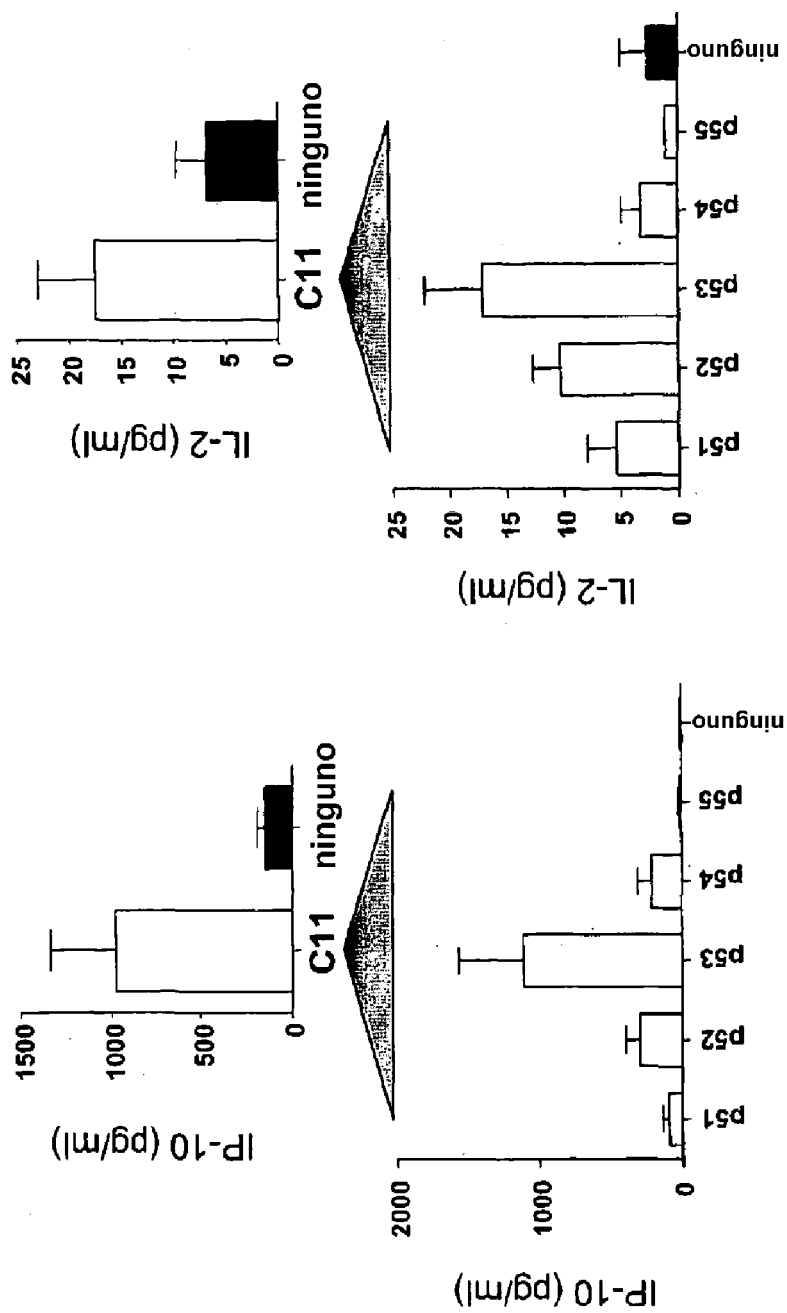


Figura 40

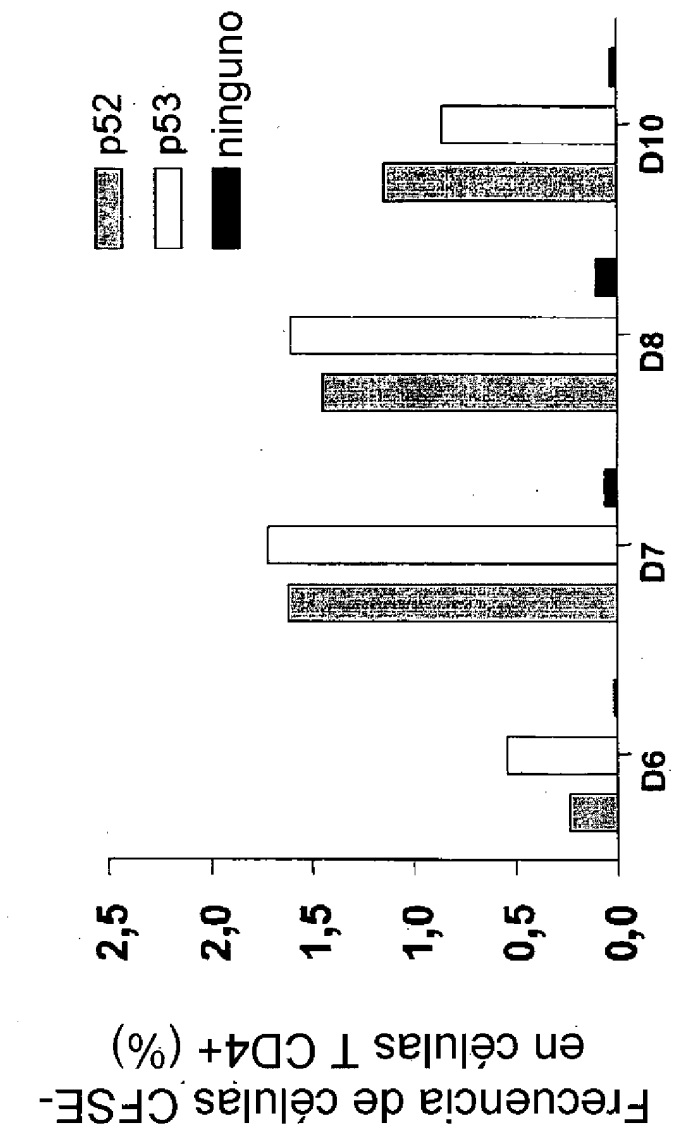
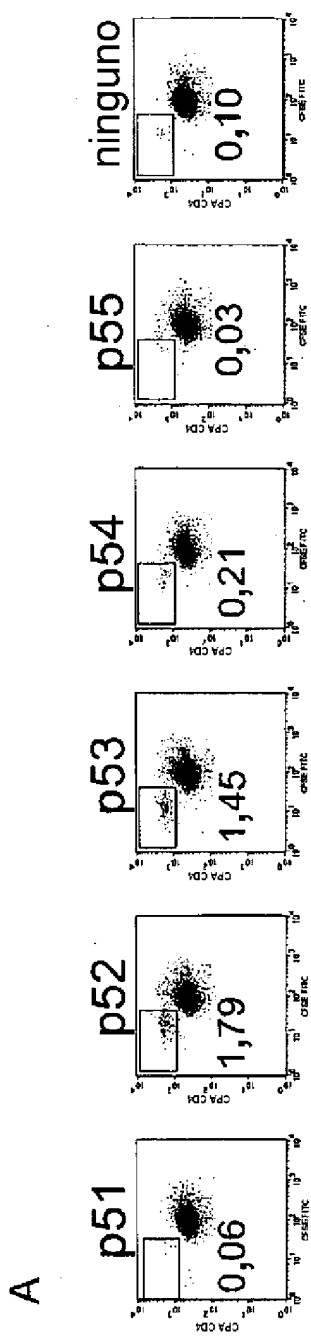


Figura 41

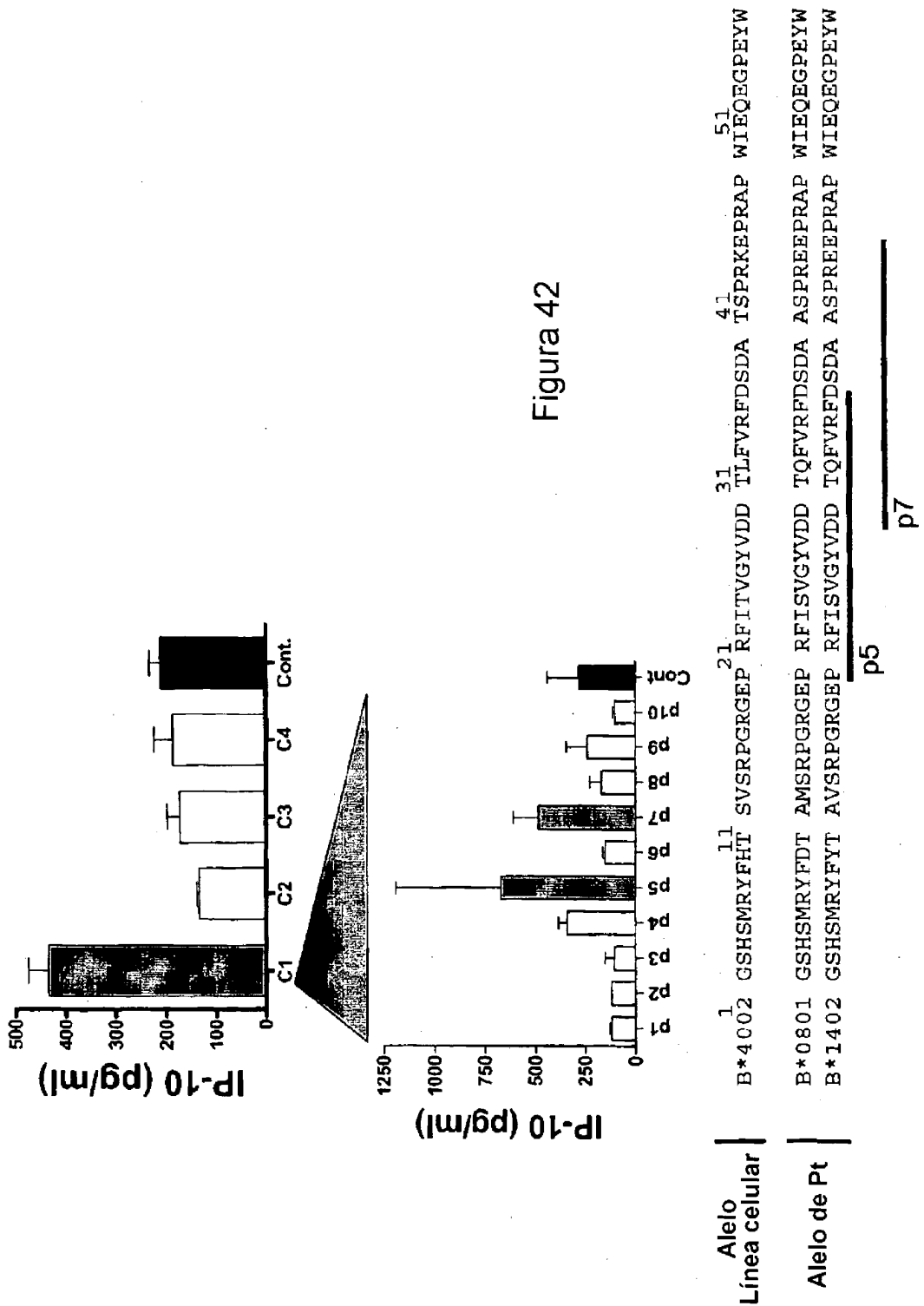


Figura 42

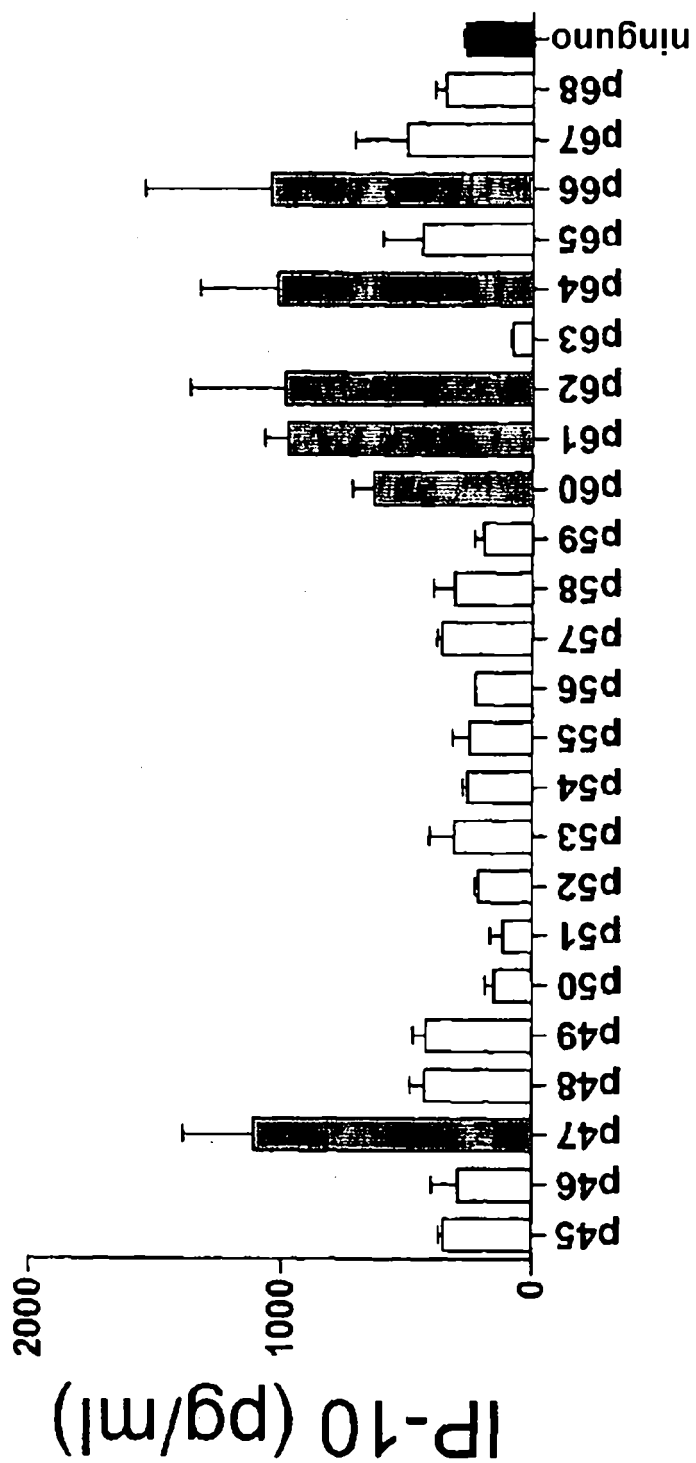


Figura 43

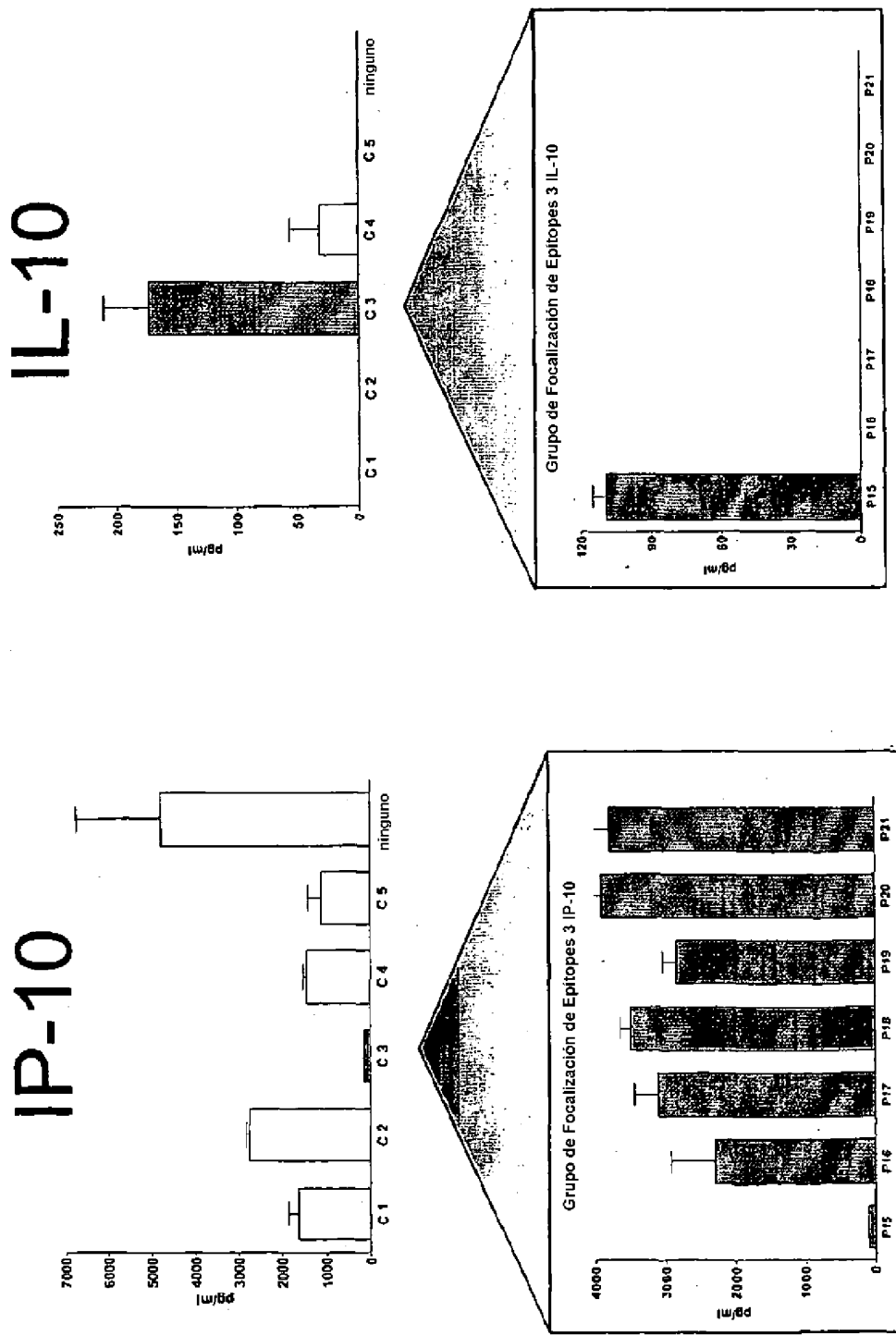


Figura 44a

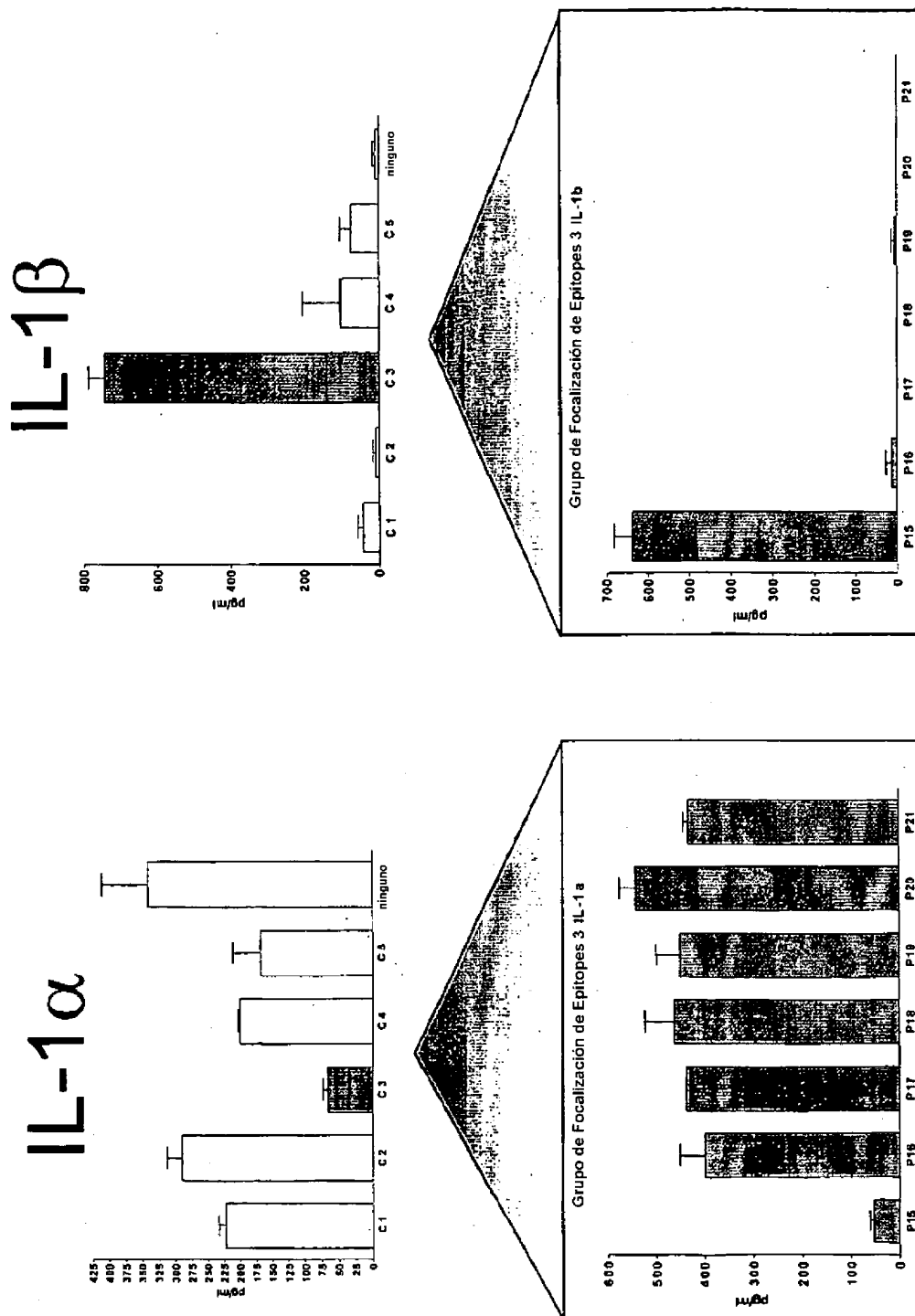


Figura 44b

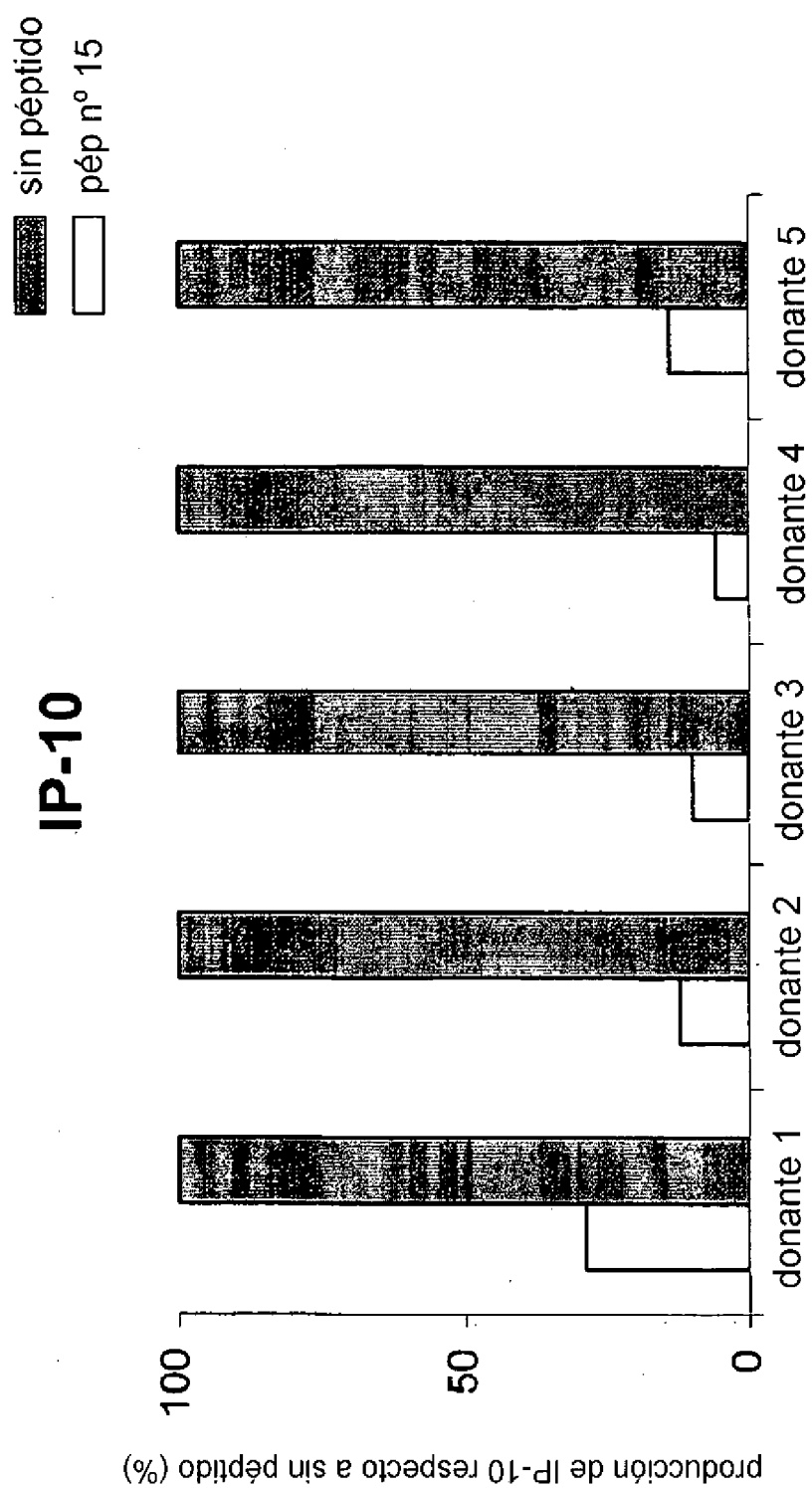


Figura 45

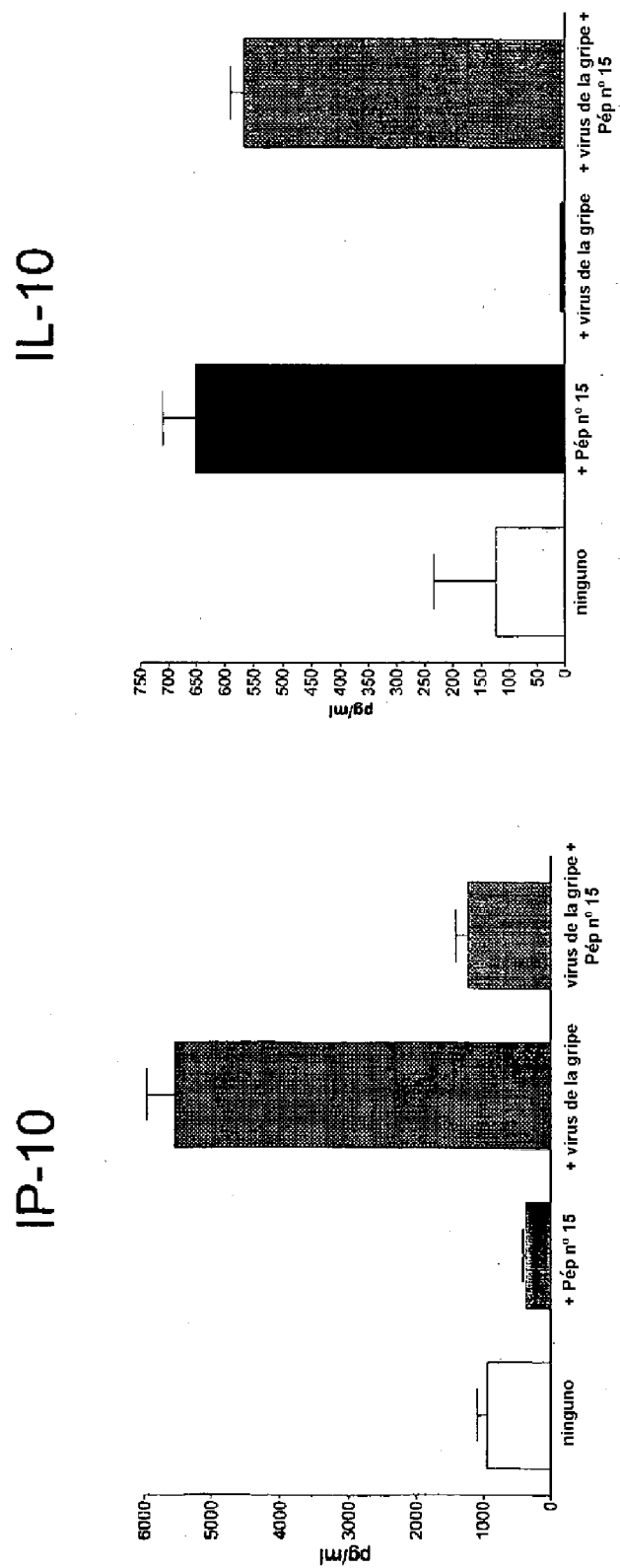


Figura 46

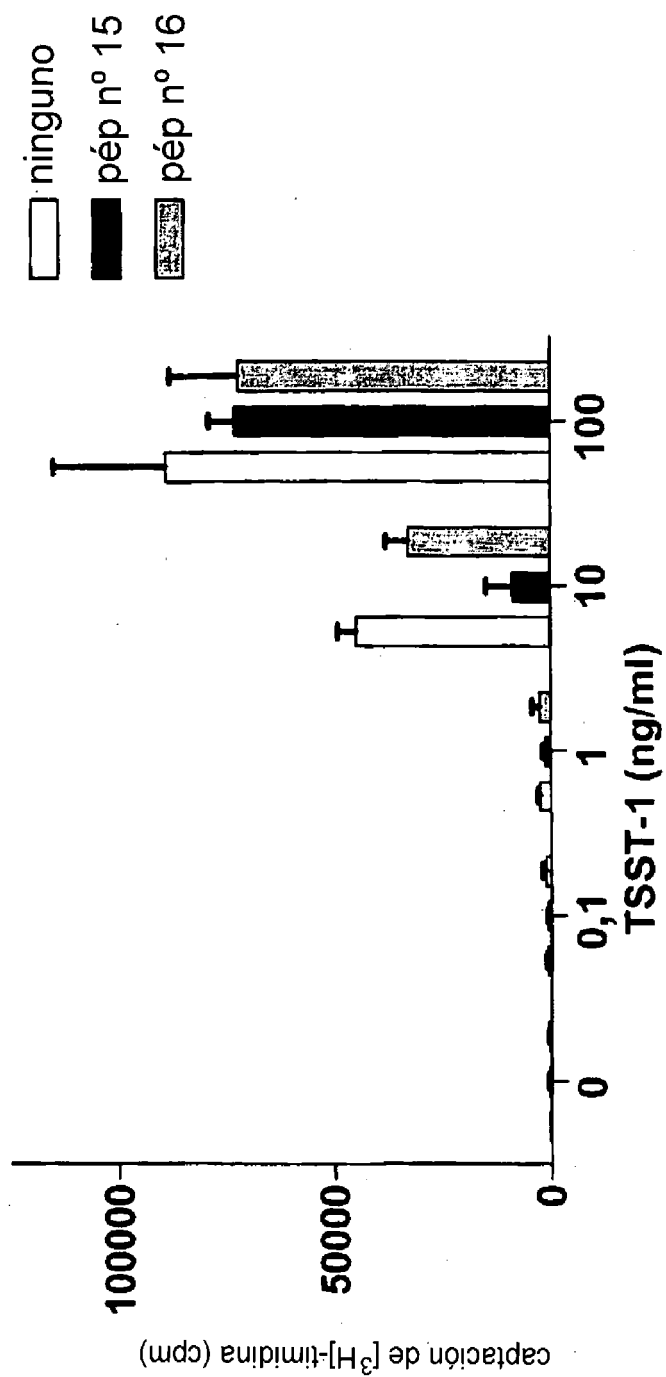


Figura 47

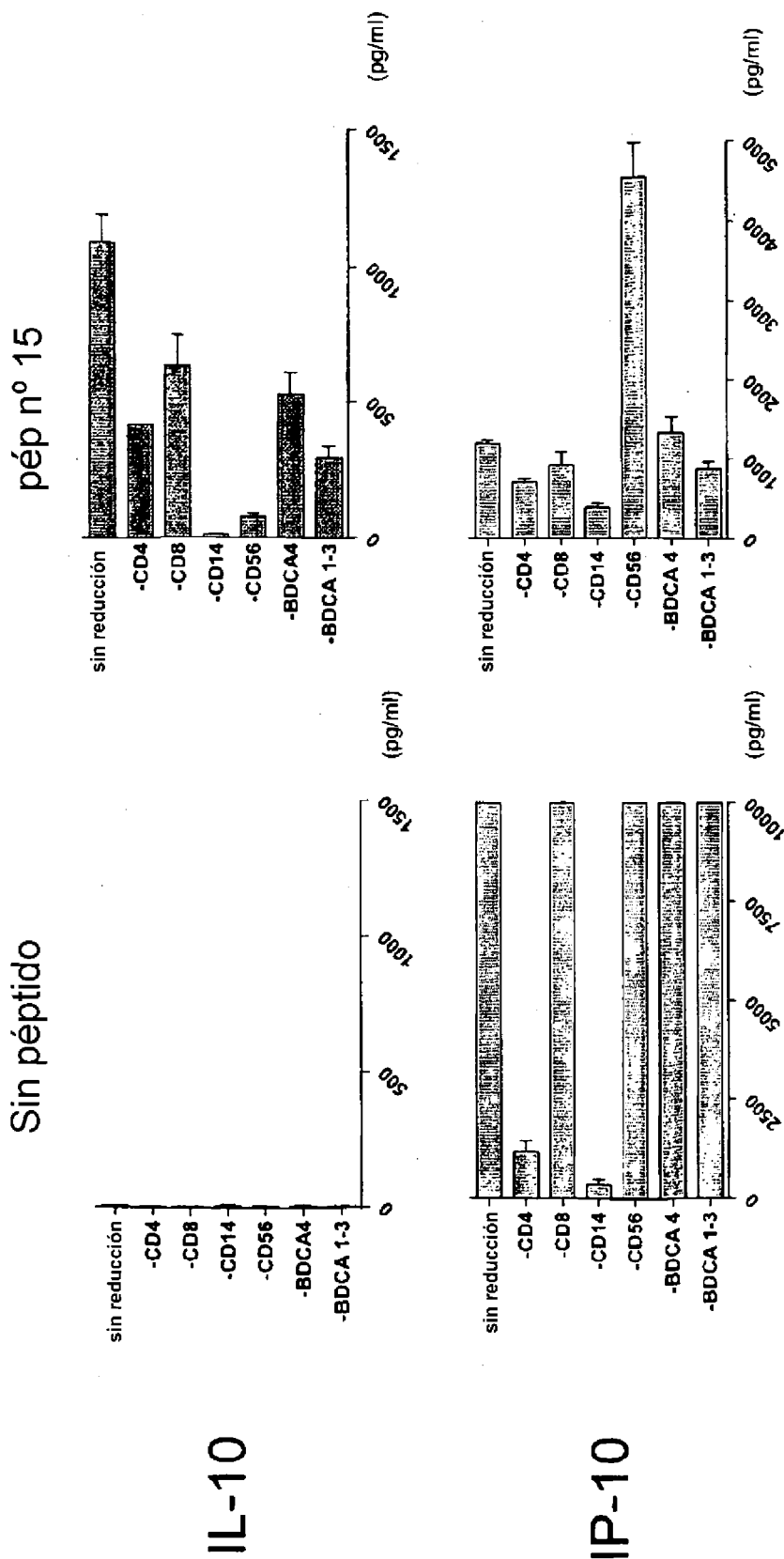


Figura 48

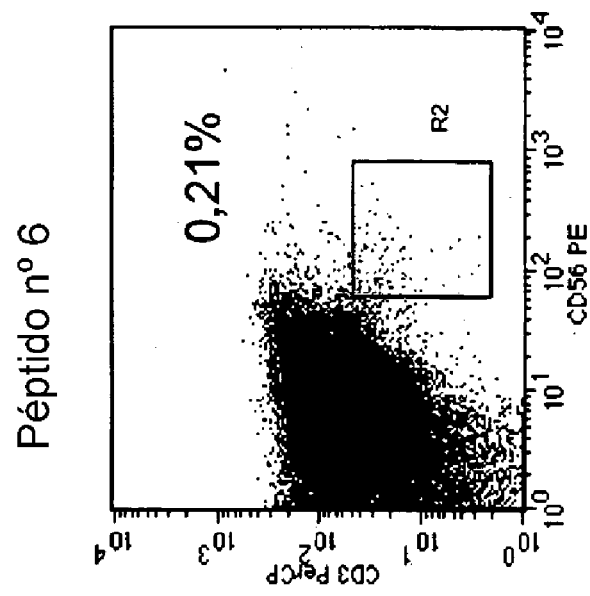
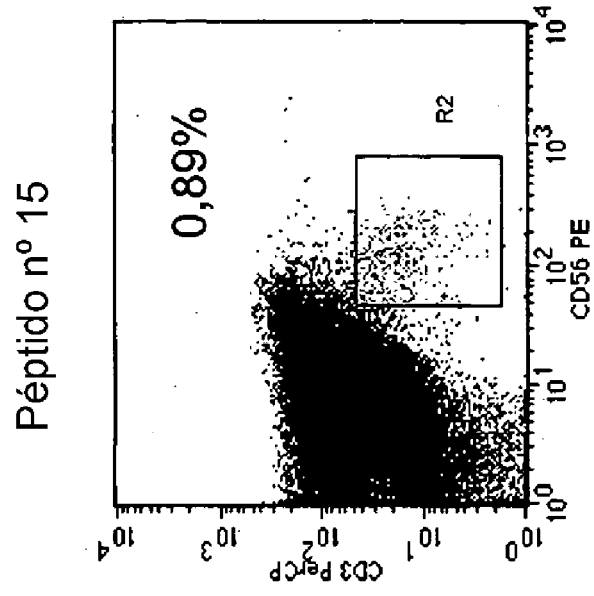


Figura 49