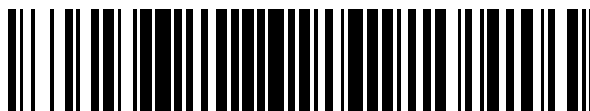


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 248**

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: **09179139 .2**
96 Fecha de presentación: **24.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2184607**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

54 Título: **Procedimiento de evaluación de respuestas inmunitarias**

30 Prioridad:
24.05.2004 US 573912 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
BAYLOR RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
3310 Live Oak Street, Suite 501
Dallas, TX 75204, US

72 Inventor/es:
BANCHEREAU, JACQUES;
CONNOLLY, JOHN E.;
PALUCKA, ANNA KAROLINA y
UENO, HIDEKI

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 390 248 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 respuestas inmunitarias

Campo técnico de la invención

5 La presente solicitud se refiere a procedimientos para predecir una respuesta inmunitaria en un sujeto a una terapia inmunitaria.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario proporciona protección contra el ataque microbiano. Por su propia esencia es un sistema complejo ya que debe poder reconocer y adaptarse a amenazas en constante cambio a la vez que limita la lesión colateral al propio tejido. Es una consecuencia de esta complejidad que la disfunción, tanto hiper como hipo-actividad, estén en la raíz de muchas enfermedades humanas. El sistema inmunitario adaptativo (compuesto por linfocitos B y linfocitos T) reconoce antígenos en forma de patrones moleculares tales como péptidos, glucopéptidos, fosfopéptidos y lípidos, unidos a y presentados en el contexto de clases especializadas de moléculas presentadoras de antígeno. Los fragmentos derivados de antígeno, por ejemplo, péptidos que son reconocidos por los linfocitos T, se denominan en lo sucesivo epítopes. Se acepta ampliamente que el reconocimiento por un linfocito T de su epítope específico es el acontecimiento central en la función inmunitaria adaptativa.

15 Estas moléculas presentadoras de antígeno especializadas incluyen: i) las proteínas de antígeno leucocitario humano clásicas (HLA) que son altamente polimórficas y pueden separarse en dos clases principales, clase I y clase II; ii) el grupo no clásico no que está codificado por los subloci HLA E, F y G (Braud VM, Curr Opin Immunol. 1999 Feb;11(1):100-8), y iii) la familia de CD1 de moléculas presentadoras de antígeno (Bendelac A, Science. 1995 Jul 14;269(5221):185-6). Las moléculas de clase I de HLA están codificadas por los loci HLA A, B y C y presentan 8-10 péptidos de aminoácido (AA) para linfocitos T citotóxicos CD8+ (Adams EJ, Immunol Rev. 2001 Oct;183:41-64). Las moléculas de clase II de HLA presentan 12-16 péptidos de AA para linfocitos T colaboradores CD4+ y están codificadas por los loci HLA DR, DP y DQ (Korman AJ, Immunol Rev. 1985 Jul;85:45-86). Los linfocitos T sólo reconocen antígenos en el contexto de moléculas presentadoras de antígeno, y sólo después del procesamiento y la presentación de antígeno apropiado. Para la presentación de antígeno dependiente de HLA, el procesamiento de antígeno normalmente consiste en la fragmentación proteolítica de la proteína, produciendo polipéptidos que se ajustan en la ranura de la molécula de HLA y este complejo de péptido/HLA se presenta posteriormente sobre la superficie celular de la célula presentadora de antígeno al linfocito 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 HLA E, F y G y se caracteriza por un bajo grado de polimorfismo y una capacidad para unirse y presentar un conjunto limitado de péptidos a células efectoras inmunitarias. Se ha demostrado que el reconocimiento de péptidos presentados por moléculas de HLA no clásicas es importante en la inducción de tolerancia inmunitaria en áreas tales como la interfase materno-fetal y/o inmunidad tumoral. El otro grupo importante entre estas moléculas especializadas es la familia de CD1, que participa en la presentación de lípidos tales como glucolípidos bacterianos a células efectoras especializadas en el sistema inmunitario.

20 Tres tipos principales de inmunidades de linfocitos T pueden seguir el 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 e inmunidad antitumoral y se caracteriza principalmente por la expresión de IFN gamma (IFN- γ). 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 y IL-13. El tipo T-regulador de inmunidad, mediado por citocinas tales como IL-10 o TGF-beta, es esencial para la generación y el mantenimiento de la auto-tolerancia. Estos tres tipos de respuesta no se limitan a los linfocitos T alfa/beta TCR+ CD8+ clásicos y también pueden estar mediados por linfocitos gamma/delta TCR+ CD8+, además de linfocitos citolíticos espontáneos (NK) y linfocitos T-NK. Por tanto, el reconocimiento de epítopes antigénicos específicos por cualquiera de estos tipos de células conduce a su activación y respuesta especializada distintiva. Por tanto, la calidad de una respuesta inmunitaria puede describirse observando la expresión coordinada de patrones de citocinas (tipo 1, tipo 2 y T-reguladoras).

25 La activación de la respuesta de linfocitos T apropiada durante el transcurso de una reacción inmunitaria implica frecuentemente el dominio de una repuesta especializada sobre las otras. Esta activación selectiva de una repuesta de linfocitos T especializada apropiada es un determinante crítico para el desenlace de enfermedad. Un ejemplo sorprendente de esto se demuestra en la respuesta de pacientes en lepra, en los que una repuesta de tipo 1 a infección se caracteriza por inmunidad protectora y una repuesta de tipo 2 conduce frecuentemente a enfermedad mortal. En otro ejemplo espectacular referente a la inmunidad tumoral se ha mostrado que los epítopes tolerogénicos que conducen a un desplazamiento inapropiado hacia una repuesta T-reguladora producen posterior progresión tumoral en seres humanos, mientras que la activación de respuestas de tipo 1 por epítopes de antígenos de tumor están asociadas a la inhibición de crecimiento tumoral. Además, un desplazamiento inapropiado lejos de una respuesta T-reguladora puede conducir al desarrollo de enfermedad autoinmunitaria si el propio antígeno se presenta. El cuadro clínico específico de enfermedad autoinmunitaria dependería de la respuesta dominante: tanto el tipo 1, como en el caso de diabetes de tipo 1, como el tipo 2, como en el caso de alergia.

Como la activación de estas respuestas de linfocitos T especializados depende de la presentación de epítopes específicos para ellos, por tanto, sería ventajoso identificar estos epítopes de péptido. Identificando estos epítopes de linfocitos T especializados temprano en el estado de enfermedad aumenta la oportunidad de potenciar respuestas de linfocitos T apropiadas o eliminar respuestas de linfocitos T inapropiadas, y así desplazar el equilibrio de la respuesta inmunitaria para mejorar el desenlace de enfermedad. Una metodología para la identificación cuantitativa y la caracterización cualitativa de estos epítopes de linfocitos T antigénicos es una base importante para el diseño de vacunas, además de enfoques de diagnóstico y terapéuticos para enfermedades infecciosas, autoinmunitarias y neoplásicas.

Kakinoki y col. (Journal of Immunology 51 (2), 2000: 202-208) se refiere a inmunoterapia para rinitis alérgica estacional que comprende cultivar PBMC de un paciente con alérgenos del polen y analizar el perfil de citocinas.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para predecir una respuesta inmunitaria en un sujeto a una terapia inmunitaria con un agente que comprende una proteína antigénica de interés que comprende las etapas de:

cultivar células inmunitarias aisladas del sujeto con una agrupación de varios péptidos de una biblioteca de péptidos superpuestos de la proteína antigénica de interés;

analizar simultáneamente un sobrenadante de medio de cultivo del sujeto para múltiples parámetros de reactividad inmunitaria que comprende la especificidad y respuesta de citocinas de citocinas y quimiocinas, que permiten la identificación de fenotipos de células de tipo 1, tipo 2 y T-reguladoras para la agrupación de varios péptidos superpuestos;

determinar el tipo de respuesta inmunitaria basándose en la expresión de citocinas coordinadas en respuesta a los péptidos individuales en el medio de cultivo como indicador del desenlace del tratamiento.

La terapia puede ser una inmunoterapia tal como vacunación, inmunoterapia pasiva y transferencia de células adoptivas.

Este procedimiento también se basa en desvelar procedimientos para identificar uno o más péptidos inmunomoduladores de un sujeto cultivando las células inmunitarias del sujeto en presencia de uno o más péptidos de una biblioteca de péptidos superpuestos tomada de una proteína antigénica de interés y analizando simultáneamente el cultivo para múltiples parámetros de reactividad inmunitaria tales como especificidad y respuesta de citocinas a epítopes sobre los péptidos, en el que un péptido inmunomodulador se identifica por la presencia de reactividad inmunitaria hacia el péptido que es independiente del tipo de HLA del sujeto. Por ejemplo, los epítopes reactivos pueden seleccionarse de los péptidos inmunomoduladores en un conjunto de péptidos. El procedimiento también incluye el aislamiento de células efectoras específicas para péptido de ese individuo específico.

Se desvela un procedimiento para identificar uno o más fragmentos inmunomoduladores: aislando células inmunitarias del sujeto; cultivando las células inmunitarias en presencia de uno o más fragmentos de la biblioteca de péptidos procesada; y simultáneamente analizando el cultivo para múltiples parámetros de especificidad inmunitaria y respuesta de citocinas a los fragmentos, en el que un fragmento inmunomodulador se identifica por la presencia de reactividad inmunitaria hacia el fragmento. Usando este procedimiento, múltiples células efectoras específicas para fragmentos de péptido pueden aislarse e incluso purificarse, por ejemplo, en una población mixta o clónica. También se desvela un procedimiento para identificar el tipo de reactividad inmunitaria expresada por un sujeto hacia un material antigénico aislando y cultivando una o más células inmunitarias de un sujeto en presencia de uno o más fragmentos antigénicos; identificando las citocinas producidas por las células inmunitarias; y determinando el tipo de reactividad inmunitaria basándose en la expresión de citocinas coordinadas 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 antigénica puede incluir péptidos con secuencias de aminoácidos conocidas o desconocidas, de proteínas y/o fragmentos de proteínas conocidos o desconocidos, o incluso una biblioteca de péptidos superpuestos tomada de una proteína conocida o péptidos fraccionados por tamaño antes de uso en el procedimiento y la posterior caracterización. En alguna realización, el material antigénico puede incluir múltiples materiales y/o péptidos antigénicos que se proporcionan en diferentes relaciones para accionar el tipo de respuesta inmunitaria, por ejemplo, Th1 frente a Th2 o Tc1 frente a Tc2, o mezclas y combinaciones de las mismas.

Se desvela un procedimiento para predecir una respuesta de un sujeto a terapia en el que células inmunitarias del sujeto se cultivan en presencia de una biblioteca de péptidos superpuestos tomada de una proteína antigénica de interés, el cultivo se analiza para múltiples parámetros de reactividad inmunitaria para identificar al menos una molécula inmunomoduladora para el linfocito T del sujeto y el repertorio de HLA y el cultivo se analiza para la producción de citocinas para determinar el tipo de reactividad inmunitaria para la molécula inmunomoduladora basándose en la identificación de las citocinas producidas para determinar el estado inmunitario específico para epítope del sujeto antes del tratamiento como indicador del desenlace del tratamiento. La terapia puede ser una inmunoterapia tal como vacunación, inmunoterapia pasiva y transferencia de células adoptivas. Otro ejemplo desvelado es un procedimiento para predecir una evolución de la enfermedad de un sujeto y el desenlace clínico cultivando una o más células inmunitarias del sujeto en presencia de una serie de péptidos de una biblioteca de

péptidos superpuestos tomada de una proteína antigénica de interés y analizando el cultivo para proliferación celular y el perfil de producción de citocinas para determinar el tipo de reactividad inmunitaria para la molécula inmunomoduladora, en el que el perfil de producción de citocinas es un marcador de gravedad de enfermedad y estado de progresión o regresión de enfermedad.

- 5 En operación, un procedimiento desvelado para el tratamiento de un sujeto en necesidad de inmunoterapia incluye: exponer células inmunitarias del sujeto a uno o más péptidos inmunomoduladores para determinar el tipo de respuesta inmunitaria desencadenada por el uno o más péptidos inmunomoduladores; tratar el sujeto con péptidos inmunomoduladores que afectan el tipo de respuesta inmunitaria; y evaluar el tipo de respuesta inmunitaria después de tratar el sujeto con uno o más péptidos inmunomoduladores y, si fuera necesario, modificar el uno o más péptidos
- 10 inmunomoduladores para cambiar el tipo de respuesta inmunitaria. La evaluación de la eficacia terapéutica puede usarse para monitorizar terapia con vacuna, terapia contra el cáncer, terapia antitumoral, trasplante de órganos, alergia, terapia de enfermedad autoinmunitaria y terapia de enfermedad infecciosa. Otro procedimiento de la presente invención incluye identificar y caracterizar nuevos agentes terapéuticos para inmunoterapia cultivando células inmunitarias aisladas en presencia y ausencia de un modulador inmunitario y uno o más péptidos de una
- 15 biblioteca de péptidos superpuestos tomada de una proteína antigénica de interés; simultáneamente, analizar los cultivos para múltiples parámetros de reactividad inmunitaria tal como especificidad y respuesta de citocinas a epítopes sobre los péptidos; y comparar la reactividad inmunitaria cuando el modulador inmunitario está presente con la reactividad inmunitaria cuando el modulador inmunitario está ausente, en el que la inhibición de la reactividad inmunitaria es indicativa de un agente terapéutico inmunosupresor y en el que el potenciamiento de la reactividad
- 20 inmunitaria es indicativo de un adyuvante y puede incluso impulsar el tipo de respuesta inmunitaria a Th1, a Th2, a Tc1, a Tc2, y combinaciones de las mismas

Breve descripción de los dibujos

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

- 25 La Figura 1 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un donante normal evaluado según la presente invención, en la que células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de sangre recientemente extraída de un voluntario sano HLA-A0201⁺, se sembraron a 2×10^5 células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 1 μ l de cualquiera de los péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) o MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ (FLWGPRALV), o diluyente de péptidos
- 30 (5% de DMSO en H₂O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex;

- la Figura 2 es un gráfico que representa otro ejemplo de respuesta inmunitaria a péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) en un donante normal según la presente invención. Se aislaron PBMC de sangre recientemente extraída de otro voluntario sano HLA-A0201⁺, se sembraron a 5×10^5 células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 10 μ g/ml de cualquiera de los péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) y MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron
- 35 cuantitativamente para la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex;

- la Figura 3A-3D son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de 2 pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 40

la Figura 4A-4C son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;

la Figura 5 es un gráfico que representa la cinética de la respuesta inmunitaria de un donante normal evaluado según la presente invención;

- 45 la Figura 6 representa el esquema de focalización de epítopes según la presente invención en el que bibliotecas de péptidos superpuestos se fraccionaron en agrupaciones de péptidos (5-10 péptidos/agrupación), se realizó un análisis de agrupaciones, seguido de focalización de epítopes;

la Figura 7 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;

- 50 la Figura 8 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;

la Figura 9 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;

- 55 la Figura 10 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;

- la Figura 11 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 5 las Figuras 12A y 12B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención en la que PBMC obtenidas antes de la vacunación con CD y después de 8 vacunaciones con CD de un paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se estimularon con el péptido 15-mero MART-1 individual o diluyente;
- la Figura 13 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 10 la Figura 14 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 15 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- las Figuras 16A-D son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 15 la Figura 17 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 18 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 20 la Figura 19 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 20 es un gráfico que representa la producción de IL-2 de linfocitos T CD4+ tras la estimulación con el péptido 15-mero identificado como se muestra en la Figura 19;
- 25 las Figuras 21A-B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención con PBMC obtenidas del mismo paciente con melanoma mostrado en la Figura 19;
- las Figuras 22 A-C son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 23 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 30 la Figura 24 es un gráfico que representa la producción de IL-5 de linfocitos T CD4+ tras la estimulación con el péptido 15-mero identificado como se muestra en la Figura 23;
- la Figura 25 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 35 la Figura 26 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de tres pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 27 representa un resumen de nuevos epítopes para linfocitos 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;
- 40 la Figura 28 representa la respuesta inmunitaria de tres pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- las Figuras 29A-D son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 30 incluye gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- 45 la Figura 31 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 32 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención;

- la Figura 33 incluye gráficos que representan la respuesta inmunitaria de tres voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 34 incluye gráficos que representan la respuesta inmunitaria de tres voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención;
- 5 la Figura 35 incluye gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención;
- la Figura 36 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención a partir de PBMC congeladas y descongeladas;
- 10 la Figura 37 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención a partir de PBMC congeladas y descongeladas;
- la Figura 38A y 38B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención;
- 15 la Figura 39A y 39B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX y demuestran que EPIMAX permite la identificación de epítope para linfocitos T CD4+ específicos para Flu-MP funcionales;
- la Figura 40 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un voluntario sano normal como se evalúa según la presente invención y muestra la identificación de novedosos epítopes para linfocitos T CD4+ específicos;
- 20 la Figura 41 A y B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX;
- la Figura 42 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención y los epítopes antigénicos para el paciente, ya que ambos péptidos contienen desapareamientos de aminoácidos y muestran la capacidad para identificar linfocitos T específicos para antígenos alogénicos en un ámbito de trasplante de órganos;
- 25 la Figura 43 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente diabético de tipo 1 como se evalúa según la presente invención;
- las Figuras 44A-44B representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias;
- 30 la Figura 45 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de cinco voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T;
- la Figura 46 incluye dos gráficos que representan la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T;
- 35 la Figura 47 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T;
- la Figura 48 incluye cuatro gráficos que representan la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T;
- 40 la Figura 49 incluye dos gráficos que representan la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención y demuestra la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T.

Descripción detallada de la invención

- 45 Para facilitar el entendimiento de la presente invención, varios términos se definen a continuación. Los términos definidos en este documento tienen significados que comúnmente son entendidos por una persona con conocimientos básicos en las áreas relevantes para la presente invención. Términos tales como “un”, “una”, “el” y “la” no pretenden referirse a sólo una entidad en singular, sino que incluyen la clase general de la cual un ejemplo específico puede usarse para ilustración. La terminología en este documento se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se explica resumidamente en las reivindicaciones.
- 50

La presente invención incluye composiciones y procedimientos que pueden evaluar las respuestas inmunitarias específicas para antígenos, sin respecto al tipo de respuesta inducida. Como se usa en este documento, el término “tipo de respuesta inmunitaria inducida” o “tipo de respuesta inmunitaria” se usan para describir la activación o regulación de una respuesta de células inmunitarias por Th1, Th2, Tc1, Tc2 y combinaciones de las mismas u otra inmunidad adaptativa basada en linfocitos T independientemente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que presenta el péptido o antígeno, por lo que el linfocito T reconoce y responde al péptido o antígeno específico en el contexto del MHC y su efecto sobre la misma célula, células adyacentes o célula que interactúa con ese linfocito T particular o su efecto sobre la célula que presenta el péptido o antígeno. El inmunólogo experto reconocerá que la terminología puede ser superpuesta, 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 epítipo, que se presenta en el contexto de una glucoproteína del MHC particular, es decir, clase I o clase II.

Será evidente como se usa en el contexto en este documento que los términos, “péptido,” “antígeno” o “epítipo” se usan en referencia a la presentación de la modulación inmunitaria por linfocitos T después de la presentación por una célula presentadora de antígeno. Como se usa en este documento, el término “péptido” se usa para describir una sucesión de aminoácidos.

Como se usa en este documento, los términos “antígeno,” “inmunogén” “epítipo” y “determinante antigénico” se usan indistintamente para describir aquellos péptidos que modulan una respuesta inmunitaria. Como se usa en este documento, el término, “modular” se usa para describir la activación, regulación, energización o incluso supresión de una respuesta inmunitaria como se mide, por ejemplo, por la proliferación de la secreción de células, citocinas o inmunocinas, interacciones entre células, apoptosis y similares. Por ejemplo, una respuesta de linfocitos T puede “modularse” en la que ciertas citocinas o inmunocinas son liberadas por el linfocito T que puede activar un cierto tipo de respuesta, por ejemplo, producción de anticuerpos; y reducir simultáneamente otro tipo de respuesta, por ejemplo, la activación de linfocitos T citotóxicos o linfocitos NK.

Como se usa en este documento, el término “inmunomodulador” se usa para describir el efecto que un antígeno, inmunogén, epítipo o determinante antigénico particular tiene sobre células efectoras, es decir, células que son activadas *in situ* o incluso en la dirección 3' en una cascada efectora.

Los presentes inventores reconocieron que previamente se habían desarrollado muchas herramientas para la predicción y caracterización de epítopes antigénicos. Por ejemplo, el modelado por ordenador de las interacciones péptido-complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), basado ampliamente en datos de estructuras de cristales por rayos X de complejos de MHC-péptido, se usa frecuentemente para predecir posibles epítopes dentro de proteínas. Aunque esta metodología se ha beneficiado enormemente de la introducción de nuevos algoritmos de predicción, sin embargo, depende del tamaño de la base de datos de estructuras y, por tanto, puede ser menos eficiente en la predicción de complejos de MHC 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 provocada por aquellos epítopes (Flower DR, Novartis Found Symp. 2003;254:102-20; discusión 120-5, 216-22, 250-2).

La elución de péptidos de MHC seguido de la secuenciación por espectrometría de masas se ha usado satisfactoriamente para identificar epítopes antigénicos (Hunt DF, Science. 1992 Mar 6;255(5049):1261-3). Aunque es una poderosa metodología para identificación, la elución de péptidos es cara, lenta y requiere un gran tamaño de muestra, haciendo 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 provocada por aquellos epítopes.

Se han usado bibliotecas de péptidos superpuestos para identificar epítopes antigénicos en proteínas asociadas a patógenos (Martin R, Methods. 2003 Mar;29(3):236-47). El cribado de bibliotecas de péptidos usa ensayos biológicos como lecturas para reactividad y, por tanto, pueden usarse para evaluar la magnitud de la respuesta a epítipo. Usando bibliotecas superpuestas pueden identificarse todos los epítopes de clase I y clase II. Hasta la fecha, los ensayos biológicos usados para evaluar posibles epítopes antigénicos usando bibliotecas de péptidos incluyen las siguientes metodologías: citocinas intracitoplásmicas, ELISA y proliferación celular (Martin R, Methods. 2003 Mar;29(3):236-47). La reactividad para un péptido dado dentro de la biblioteca en cualquiera de estos ensayos es una indicación de que un epítipo antigénico está presente; sin embargo, ninguno de estos procedimientos da una clara indicación en cuanto a la calidad de la respuesta a ese epítipo, por ejemplo, respuesta antigénica, alérgica, tolerogénica o cualquier otra específica.

También se han informado combinaciones de tecnologías conocidas útiles para la predicción y caracterización de epítopes antigénicos. Ejemplos de ensayos de combinación se facilitan a continuación.

Bibliotecas de péptidos y ELISPOT. La técnica ELISPOT usa un anticuerpo de captura unido a superficie para unir citocinas secretadas de células cultivadas en la placa. Un segundo anticuerpo marcado se usa para cuantificar el número de células secretoras de citocinas. Se han aislado epítopes antigénicos incubando células con bibliotecas de péptidos superpuestos y evaluando la producción de citocinas por ELISPOT (Geginat G, J Immunol. 2001 Feb 1;166(3):1877-84). Sin embargo, esta metodología está limitada porque para cualquier muestra dada sólo puede

medirse la producción de unas pocas citocinas. Esta incapacidad para medir el intervalo completo de citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al reconocimiento de epítopes hace que cualquier caracterización de la respuesta inmunitaria (es decir, tipo 1, tipo 2 o T-reguladora) sea extremadamente difícil.

5 Bibliotecas de péptidos y ELISA. La técnica de ELISA usa un anticuerpo de captura unido a superficie para unir citocinas solubles secretadas de células. Un segundo anticuerpo marcado se usa para cuantificar la concentración de citocina secretada cuando se compara con una curva patrón. Se han aislado epítopes antigénicos incubando células con bibliotecas de péptidos superpuestos y evaluando la producción de citocinas por ELISA. Sin embargo, esta metodología está limitada porque para cualquier muestra dada sólo puede medirse la producción de unas pocas citocinas. Esta incapacidad para medir el intervalo completo de citocinas y quimiocinas producidas en
10 respuesta al reconocimiento de epítopes hace que cualquier caracterización de la respuesta (es decir, tipo 1, tipo 2 o T-reguladora) sea extremadamente difícil. Además, la evaluación de una única citocina por ELISA requiere un volumen significativo de al menos 100 microlitros de líquido biológico y/o sobrenadante de cultivo.

15 Bibliotecas de péptidos y ensayos de proliferación celular. El ensayo de proliferación celular usa la incorporación de radionucleótidos o dilución de colorante fluorescente para monitorizar la división celular en respuesta a estímulo. Se han aislado epítopes antigénicos incubando células con bibliotecas de péptidos superpuestos y evaluando la división celular por el ensayo de proliferación celular (Mutch D, J Acquir Immune Defic Syndr. 1994 Sep;7(9):879-90). Sin embargo, esta metodología está limitada porque, aunque la división celular pueda ser una indicación de la magnitud de respuesta antigénica, este ensayo no da información en cuanto a la calidad de la respuesta (es decir, tipo 1, tipo 2 o T-reguladora). También debe observarse que algunas respuestas específicas para antígenos no están asociadas
20 a la rápida proliferación celular tal como respuestas T-reguladoras.

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 no se limita a, bibliotecas de expresión de ADNc, virus y fago, proteína completa, fragmentos de proteínas, péptido, péptido modificado y lípidos) como una medida del reconocimiento de epítopes y función de células citolíticas. Se
25 han aislado epítopes antigénicos incubando células con bibliotecas de péptidos superpuestos y evaluando la citotoxicidad celular por ensayo de linfocitos citotóxicos. Aunque la citotoxicidad celular puede ser una indicación de la magnitud de una respuesta antigénica de tipo 1, esta metodología es de uso limitado cuando se evalúan respuestas distintas de tipo 1 (es decir, tipo 2 o T-reguladoras). La caracterización de citotoxicidad específica para antígenos usando ensayos de CTL está frecuentemente plagada de baja sensibilidad debido a la liberación de
30 indicador de células diana. También debe observarse que esta metodología requiere la manipulación de cultivos celulares extensos y, por tanto, no puede considerarse de alto rendimiento.

Bibliotecas de péptidos y tinción de citocinas intracitoplásmicas. La técnica de tinción de citocina intracitoplásmicas usa procedimientos de tinción fluorescente convencionales y anticuerpos anti-citocina para medir el nivel de citocinas intracelulares producido en respuesta a un estímulo antigénico. Las mediciones de la producción de citocinas y la cuantificación de células productoras de citocinas pueden entonces llevarse a cabo por técnicas
35 citométricas, microscópicas o espectrofotométricas convencionales. Se han aislado epítopes antigénicos incubando células con bibliotecas de péptidos superpuestos y evaluando la producción de citocinas por tinción intracitoplásmica (Karlsson AC, J Immunol Methods. 2003 Dec;283(1-2):141-53). Sin embargo, esta metodología está limitada porque para cualquier muestra dada sólo puede medirse la producción de unas pocas citocinas. Esta incapacidad para
40 medir el intervalo completo de citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al reconocimiento de epítopes hace que cualquier caracterización de la respuesta (es decir, tipo 1, tipo 2 o T-reguladora) sea extremadamente difícil. Esta metodología está adicionalmente limitada porque requiere grandes números de células para el análisis y es destructiva para las células analizadas.

45 Elución de péptidos y secuenciación espectrométrica de masas. La elución de péptidos del MHC seguido de la secuenciación por espectrometría de masas se ha usado satisfactoriamente para identificar epítopes antigénicos (Hunt DF, Science. 1992 Mar 6;255(5049):1261-3). Aunque es una poderosa metodología para identificación, la elución de péptidos es cara, lenta y requiere un gran tamaño de muestra, haciendo que sea poco práctica para su uso en un entorno clínico. Este procedimiento proporciona un medio de identificación de epítopes antigénicos, pero
50 no puede usarse para caracterizar la respuesta específica (es decir, tipo 1, tipo 2 o T-reguladora) provocada por aquellos epítopes.

Modelado por ordenador de interacciones de péptido-MHC. El modelado por ordenador de interacciones de péptido-complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), basado ampliamente en datos de estructuras de cristales por rayos X de complejos de MHC-péptido, se usa frecuentemente para predecir posibles epítopes dentro de proteínas. Aunque
55 esta metodología se ha beneficiado enormemente de la introducción de nuevos algoritmos de predicción, sin embargo, depende del tamaño de la base de datos de estructuras y, por tanto, puede ser menos eficiente en la predicción de complejos de MHC no representados en ese conjunto de datos (Kuhara S. Pac Symp Biocomput. 1999;:182-9.). Este procedimiento proporciona un medio de identificación de epítopes antigénicos, pero no puede usarse para caracterizar la respuesta específica provocada por aquellos epítopes.

60 Identificación serológica de antígenos por clonación por expresión recombinante (SEREX). La tecnología SEREX implica la identificación de epítopes reconocidos por anticuerpos del suero mediante cribado de bibliotecas de

expresión combinatoria. Aunque la tecnología SEREX puede dar una indicación en cuanto a la especificidad de la respuesta inmunitaria humoral, no se da tal indicación en cuanto a tanto la magnitud como la naturaleza de la respuesta inmunitaria celular (Tureci O, Mol Med Today. 1997 Aug;3(8):342-9). Esta tecnología requiere tanto mucho tiempo como mucha mano de obra y, por tanto, no es práctica en un entorno clínico.

- 5 PCR en tiempo real para análisis de múltiples citocinas. La PCR en tiempo real puede usarse para medir de una manera cuantitativa la expresión de ARN que codifica múltiples citocinas (Giulietti A., Methods. 2001 Dec;25(4):386-401). Sin embargo, esta tecnología requiere tanto mucho tiempo como mucha mano de obra, requiere grandes números de células para aislar suficientes cantidades de ARN para el análisis y es destructiva para las células. Finalmente, la expresión de ARN no indica la secreción de una citocina biológicamente activa.
- 10 Como se indica anteriormente, se ha informado de tecnologías que pueden predecir y caracterizar epítopes antigénicos y, en algunos casos, se han combinado diversas tecnologías con el fin de maximizar la cantidad de información útil tal como ensayos de proliferación basados en fluorescencia y ensayos de citocinas intracelulares. Estos enfoques de ensayos combinados frecuentemente sufren las limitaciones de los ensayos de sus componentes individuales tales como las limitaciones asociadas a la tinción de citocinas intracelulares descrita anteriormente.
- 15 Por tanto, hay una necesidad urgente y lejos de sentirse realizada de tecnología multiparamétrica de alto rendimiento, susceptible a automatización, no destructiva y que requiere una muestra de pequeño tamaño que la hace aplicable a un entorno de diagnóstico clínico, permitiendo la evaluación de respuestas inmunitarias en seres humanos. Esta necesidad es particularmente importante en vista de patógenos emergentes y re-emergentes, además de agentes de amenaza biológica en los que se necesitan ensayos rápidos que proporcionan el cuadro de
- 20 respuesta inmunitaria y/o identifican la naturaleza de patógenos. Ninguna de las metodologías descritas anteriormente proporciona una clara caracterización de la respuesta inmunitaria cualitativa y cuantitativa a 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 de monitorización del diagnóstico o inmunitaria.

25 La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar respuestas inmunitarias específicas para antígenos, independientemente del tipo de respuesta inducida, permitiendo así la evaluación del tipo de respuesta inmunitaria inducida en individuos tanto sanos como enfermos. Esta metodología proporciona una medida tanto cualitativa como cuantitativa de la respuesta inmunitaria, mientras que simultáneamente identifica el epítope para el que se genera esa respuesta.

30 Los procedimientos de la presente invención son una combinación de tres tecnologías: cultivo celular de células inmunitarias de tanto seres humanos como animales, presentación de material antigénico que no se limita a MHC y análisis para la presencia de citocinas y/o quimiocinas que proporcionan la capacidad para observar todas las variedades de respuestas inmunitarias. En una realización, las tres tecnologías implican cultivo celular de células inmunitarias de tanto seres humanos como animales, bibliotecas de péptidos superpuestos que no se limitan a MHC y análisis múltiple para la presencia de citocinas y/o quimiocinas. Preferentemente, la presente invención es un

35 procedimiento multifásico para evaluar respuestas inmunitarias específicas para antígenos, en el que la primera fase es un cribado de alto rendimiento (fase I) y la segunda fase proporciona la identificación de epítopes antigénicos específicos (fase II).

40 Los procedimientos de la presente invención usan análisis de cultivos celulares con múltiples tipos de células presentes que pueden diversificar el procesamiento, presentación y reconocimiento de antígenos para epítopes tanto de péptido como de no péptido (por ejemplo, glucolípido). Células adecuadas para los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, monocitos, neutrófilos, mastocitos y glóbulos rojos. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas que incluyen linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK y linfocitos T-NK proporcionan una fuente fácilmente obtenible de múltiples tipos de células para su uso en la presente invención. Además, cualquier procedimiento normalizado conocido en la técnica para

45 cultivar células humanas o animales que también soporte la producción de citocinas es adecuado para su uso en la presente invención.

En los procedimientos de la presente invención, el material antigénico es una proteína.

50 En una realización, en la presente invención se usan bibliotecas de péptidos superpuestos para identificar epítopes antigénicos sobre una proteína de interés y para estimular respuestas inmunitarias. 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 linfocitos T tanto CD4 como CD8. Y la identificación de los epítopes no está limitada por el haplotipo de HLA.

55 La secuencia de aminoácidos de la proteína de interés se divide en pequeños péptidos superpuestos, por ejemplo, una serie de péptidos superpuestos 8- a 15-meros con, por ejemplo, 3 a 4 compensaciones de aminoácidos. Según la presente invención, una biblioteca de péptidos superpuestos puede tanto prepararse como comprarse de fuentes comercialmente disponibles. Por ejemplo, de la proteína de la matriz de la gripe que contiene 296 aminoácidos puede prepararse una biblioteca de péptidos superpuestos de 60 péptidos 15-meros superpuestos (con 4 compensaciones de aminoácidos).

De la biblioteca de péptidos superpuestos, un recipiente de cultivo celular se prepara con uno o más péptidos adheridos al recipiente del cultivo. En un procedimiento multifásico, placas de cultivo de fase I de múltiples pocillos se usan para fines de cribado, en el que cada pocillo contiene una agrupación de varios péptidos superpuestos. El número de péptidos superpuestos por agrupación y el número de agrupaciones requeridas para el cribado depende del tamaño de la propia proteína. Preferentemente, cada agrupación contiene aproximadamente 5-10 péptidos superpuestos; para una proteína más pequeña, aproximadamente 3-7 péptidos superpuestos. En un procedimiento multifásico, la biblioteca de péptidos superpuestos para una proteína de interés está distribuida por agrupaciones en placas de cultivo de fase I de 96 pocillos preacondicionadas codificadas, con 5-10 péptidos por agrupación por pocillo. Para fase II, los péptidos superpuestos en una agrupación reactiva están distribuidos como un único péptido por pocillo. Las placas de cultivo de fase I pueden prepararse por adelantado para maximizar el rendimiento y minimizar la variabilidad de ensayo a ensayo. Las placas preparadas por adelantado y guardadas a -80°C tienen una estabilidad en almacén de un mínimo de un año. Y hasta el punto que se encuentra que las agrupaciones de fase I específicas son repetidamente antigénicas, las placas de cultivo de fase II también puede prepararse por adelantado.

Para empezar el ensayo de respuesta inmunitaria de la presente invención, células inmunitarias de interés se añaden al recipiente de cultivo descrito anteriormente y se incuban durante un tiempo y en condiciones que soportan la producción de citocinas en respuesta al (a los) péptido(s) antigénico(s) adherido(s) al recipiente de cultivo. Las células inmunitarias que pueden evaluarse usando esta metodología incluyen, pero no se limitan a, PBMC, linfocitos T, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos NK, linfocitos T-NK, linfocitos T TCR $\alpha\beta$, linfocitos B, monocitos, células dendríticas y granulocitos. En un procedimiento se usan células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En el procedimiento multifásico, por ejemplo, PBMC se siembran a 2×10^5 por pocillo en una o más placas de cultivo de fase I de 96 pocillos preacondicionadas codificadas descritas anteriormente que contienen una biblioteca de péptidos superpuestos del antígeno de interés con 5-10 péptidos por agrupación por pocillo. Entonces, las células inmunitarias se incuban en condiciones que soportan la producción de citocinas, con medio de cultivo, condiciones de temperatura e incubación seleccionadas para el tipo de célula específica. Por ejemplo, las PBMC se incubaron preferentemente durante 18-48 horas a 37°C en medio completo como se describe en el Ejemplo 1. Tras la incubación, las células se sedimentan y los sobrenadantes se aíslan de cada pocillo y se analizan para la presencia de una amplia variedad de citocinas y quimiocinas. Con respecto a la presente invención como se describe en este documento, el término "citocinas" se usa para representar tanto citocinas como quimiocinas.

Según la presente invención, cualquier procedimiento conocido en la técnica que pueda analizar simultáneamente los sobrenadantes para la presencia de varias citocinas, preferentemente 20 o más citocinas, en la misma muestra puede usarse en la presente invención. Tales procedimientos incluyen espectroscopía de masas, matriz basada en anticuerpos y tecnología de perlas de análisis múltiple. El análisis múltiple de citocinas se usa debido a que: i) permite la medida simultánea de múltiples parámetros inmunitarios, ii) requiere muestras de pequeño volumen, iii) proporciona un ensayo sensible que no destruye la muestra; iv) soporta la expresión coordinada de citocinas específicas característica de respuestas inmunitarias especializadas, y v) proporciona una medida directa de efectores inmunitarios. Una analizador múltiple de citocinas comercialmente disponible adecuado es la estación de trabajo Luminex 100 Cytokine Multiplex (Luminex Corp., Austin, Texas) que puede medir simultáneamente hasta 100 analitos, requiere un 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 pequeño volumen (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 variedad de muestras biológicas. Analizando la expresión de citocinas coordinadas en respuesta a un estímulo o ataque patogénico, biodistintivos específicos para estado pueden describirse correspondientemente a respuestas inmunitarias específicas.

En un procedimiento, 50 microlitros de los sobrenadantes se transfieren en forma de 96 pocillos a una estación de trabajo Luminex 100 Cytokine Multiplex (Luminex Corp., Austin, Texas) y se analizan según instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes se criban rápidamente por duplicado para la presencia de una amplia variedad de citocinas usando una mezcla maestra de perlas múltiples y reactivos previamente preparados y validados.

En el procedimiento multifásico, las agrupaciones de antígenos que demuestran ser positivas para reactividad por análisis de citocinas de fase I se rompen en sus componentes de péptido constituyentes para la identificación de péptidos antigénicos en placas de cultivo de fase II basadas en epítipo como se ha descrito anteriormente. En un procedimiento, las placas de cultivo de fase II consisten en tiras de pocillos preacondicionadas codificadas que contienen los péptidos de componentes individuales para cada agrupación por duplicado. Las células inmunitarias de interés se añaden a las tiras de pocillos y se incuban durante un tiempo y en condiciones que soportan la producción de citocinas en respuesta al (a los) péptido(s) antigénico(s) adherido(s) a la tira de pocillos. Por ejemplo, PBMC descongeladas se añaden a 2×10^5 células por pocillo en las tiras de pocillos y se cultivan durante 18-48 horas a 37°C. Tras la incubación, las células se sedimentan, los sobrenadantes se aíslan y se analizan para la producción de citocinas. En un procedimiento, 50 microlitros de los sobrenadantes se transfieren a la estación de trabajo Luminex para el análisis. El cribado múltiple en fase II para una tira de péptidos dada consiste en la citocina o citocinas producidas en respuesta a su agrupación parental durante el análisis de fase I. Los péptidos identificados en un cribado de fase II representan epítopes antigénicos reconocidos por el individuo. El patrón característico de citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al péptido identificado es una indicación del tipo de respuesta

especializada provocada por ese epítope.

Los procedimientos son un procedimiento de alto rendimiento para la rápida identificación y caracterización de epítopes de linfocitos T específicos para péptido. Como se muestra en este documento, el desarrollo y la validación del ensayo ha 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 con respecto a la técnica existente que incluyen: a) alta sensibilidad: detección de picogramos por mililitro para todas las citocinas probadas; b) alto rendimiento: el ensayo puede completarse en el plazo de 48 h; c) análisis de múltiples analitos en un pequeño volumen de líquido biológico, por ejemplo, evaluación de al menos 30 citocinas y quimiocinas en un volumen de 50 microlitros; d) no destructivo: permitiendo la adición de ensayos basados en células para análisis multiparamétrico; y e) identificación de epítopes antigénicos de un modo independiente del haplotipo de HLA. Los procedimientos de la presente invención usan formación de múltiples citocinas para monitorizar múltiples parámetros inmunitarios y que, por tanto, pueden caracterizar la calidad de la respuesta inmunitaria que incluye, pero no se limita a, respuestas antigénicas, alérgicas y tolerogénicas. Monitorizando la respuesta coordinada de múltiples citocinas, la identificación y caracterización de epítopes antigénicos también es más sensible que el presente estado de las tecnologías de la materia. Ninguna de las presentes tecnologías de la materia tanto solas como en combinación puede 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 engloban las ventajas de una tecnología de alto rendimiento. También debe observarse que a diferencia del presente estado de las tecnologías de la materia, los procedimientos de la presente invención no son destructivos para las células que se analizan; por tanto, pueden combinarse con cualquier número de inmunoensayos convencionales o por encargo que incluyen, pero no se limitan a, proliferación, citocina intracelular y tinción de receptores superficiales, actividad de CTL y ELISPOT. Finalmente, los procedimientos de la presente invención requieren volúmenes mucho más pequeños de líquidos biológicos y/o sobrenadante de cultivo y números de células mucho más pequeños para el análisis que cualquier otra tecnología actualmente disponible. Por tanto, los procedimientos descritos son una tecnología de alto rendimiento, bajo volumen, no destructiva, susceptible a automatización y, por tanto, práctica para diagnóstico clínico, uso pronóstico y terapéutico. La invención se refiere específicamente a predecir una respuesta inmunitaria en un sujeto a una terapia inmunitaria.

En un aspecto se describe 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 inmunitario preexistente de pacientes. Identificando y caracterizando epítopes en una amplia variedad de antígenos puede determinarse un claro cuadro del repertorio completo de linfocitos T para ese individuo. Esta tecnología es de alto rendimiento, susceptible a automatización, no destructiva y requiere un pequeño tamaño de muestra, haciendo que sea aplicable a un entorno de diagnóstico clínico. Por tanto, puede usarse como una herramienta en el diagnóstico de varias enfermedades autorreactivas y respuestas hiperinmunitarias que incluyen, pero no se limitan a, alergia, diabetes, artritis, lupus y esclerosis múltiple. (b) Pronóstico: el estado inmunitario específico para epítope de un individuo antes del tratamiento como se evalúa por esta tecnología puede servir de indicador pronóstico del desenlace del tratamiento. Por tanto, la evolución de la intervención terapéutica puede confeccionarse a medida para potenciar o eliminar este estado inmunitario. Esta tecnología puede usarse para la evaluación pronóstica de inmunoterapia antitumoral, trasplante de órganos, alergia y tratamientos de enfermedades autoinmunitarias. (c) Terapéutico: los procedimientos de la presente invención pueden usarse durante la evolución del tratamiento como herramienta de inmunomonitorización. Un claro cuadro de la especificidad, magnitud y calidad de la respuesta inmunitaria específica para epítope durante la terapia puede servir para evaluar la eficacia del tratamiento en curso. Basándose en los datos de este enfoque, los tratamientos pueden adaptarse para potenciar, modular o inhibir respuestas inmunitarias específicas. Por tanto, esta tecnología puede usarse para guiar el tratamiento terapéutico en curso en el área del desarrollo de vacunas, inmunoterapia antitumoral, trasplante de órganos, alergia y enfermedades autoinmunitarias.

En otro aspecto, los procedimientos pueden ser útiles en el diseño de nuevos fármacos que incluyen, pero no se limitan a, vacunas, péptidos bioactivos y reactivos que eligen diana. (a) Vacunas: los procedimientos de la presente invención pueden facilitar enormemente el desarrollo de vacunas eficaces. Epítopes antigénicos identificados usando esta tecnología pueden servir por sí mismos de vacunas eficaces para potenciar la respuesta inmunitaria contra enfermedad infecciosa o cáncer, o para tolerar la respuesta inmunitaria contra proteínas para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, alergia o trasplante de órganos. (b) Péptidos bioactivos: se han descrito péptidos bioactivos generados por proteólisis de proteínas más grandes con funciones neuromoduladoras e inmunomoduladoras profundas. Con esta tecnología, los péptidos con estas propiedades pueden identificarse rápidamente. (c) Reactivos que eligen diana: péptidos bioactivos identificados usando esta tecnología que interactúan con receptor específico sobre células pueden usarse como reactivo que elige diana para administrar fármacos a poblaciones celulares específicas.

Los procedimientos de la presente invención son adecuados para su uso en varias aplicaciones médicas que incluyen, pero no se limitan a, infecciones crónicas, alergia, enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedad de Alzheimer, enfermedades infecciosas agudas, trasplante de órganos y aterosclerosis. Debe entenderse que estas aplicaciones son representativas, y que otras aplicaciones tal como se

conocen en la técnica se contemplan como parte de la presente invención.

Infección crónica. Un número y variedad sorprendente de enfermedades humanas se producen por infección patogénica crónica. Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede ser diferente, todas pueden caracterizarse por una incapacidad para organizar una respuesta eficaz, tanto de tipo 1 como de tipo 2, al patógeno. Una vez se organiza una respuesta, el mimetismo del propio epítipo en proteínas asociadas a patógeno también puede inducir respuestas autoinmunitarias que persisten mucho tiempo después de que la infección se haya eliminado, tal como artritis de Lyme y enfermedad desmielinizante asociada al herpes. La aparición de reacciones autoinmunitarias después del reconocimiento inmunitario del patógeno hace que la selección de epítipes específicos sea crítica para una terapia eficaz segura. Estudios han implicado una activación inapropiada de respuesta reguladora en algunas infecciones crónicas. Los procedimientos de la presente invención son adecuados para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas referentes a infecciones crónicas. (a) Diagnóstico: pruebas de diagnóstico no invasivas para algunos agentes crónicamente infecciosos tales como pruebas basadas en PCR para el VHB demuestran variabilidad extrema en el entorno clínico. Los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse al diagnóstico de infección crónica mediante la rápida detección y caracterización de respuestas específicas a péptidos asociados a patógenos. El diagnóstico de complicaciones autoinmunitarias asociadas a patógenos también puede facilitarse mediante el uso de esta tecnología. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención pueden usarse para detectar y caracterizar reactividad, tanto de tipo 1, tipo 2 como T-reguladora, para epítipes asociados a patógenos específicos que, a su vez, puede servir de indicador pronóstico de desenlace de enfermedad, guiando así la terapia con antibióticos. Los procedimientos de la presente invención son adecuados para detectar y caracterizar reactividad para epítipes asociados a patógenos específicos que también pueden servir de indicador pronóstico en cuanto a la aparición de enfermedad autoinmunitaria asociada a infección. (c) Terapéutico: la identificación y caracterización de epítipes antigénicos para proteínas asociadas a patógenos por medio de la presente invención puede facilitar el desarrollo de vacunas seguras, eficaces, profilácticas y terapéuticas. Estos incluirían la implementación de vacunas que evitan el mimetismo de los propios epítipes. Las vacunas también incluirían la identificación de epítipes variantes de pan, eligiendo como diana epítipes invariantes dentro del proteoma patógeno, proporcionando así protección contra múltiples cepas del mismo patógeno, además de variantes mutantes comunes de cada patógeno como en el caso del VIH y la malaria. La identificación y eliminación de epítipes T-reguladores y células respondedoras mediante la aplicación de esta tecnología puede desempeñar una función en iniciar una respuesta anti-patógeno protectora.

Alergia. Una alergia es una respuesta hiperinmunitaria a sustancias que generalmente no son perjudiciales. Se ha informado que un desplazamiento inapropiado a una respuesta de tipo 2 desempeña una función crítica en el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria alérgica. Se han identificado muchos alérgenos que incluyen alérgenos de inhalación tales como ácaros del polvo doméstico, polen y moho; alérgenos de los alimentos tales como huevo, trigo, soja y frutos secos; o algunos fármacos tales como penicilina. Puede resultar una reacción grave, frecuentemente potencialmente mortal, llamada anafilaxia. Por tanto, la activación de una respuesta T-reguladora en el contexto de alergia sería ventajosa. (a) Diagnóstico: una prueba de la piel y análisis de sangre tal como un nivel de IgE específica para alérgeno se usa comúnmente para identificar alérgenos. Sin embargo, una prueba de la piel puede ser peligrosa para algunos pacientes que pueden experimentar anafilaxia. Los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse como una herramienta de diagnóstico segura para identificar epítipes alérgicos específicos para paciente. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de epítipes de alérgeno para un paciente con alergia individual. Esto es útil para monitorizar la respuesta inmunitaria durante el tratamiento o para el seguimiento. Los epítipes estimulantes T-reguladores tolerogénicos también pueden identificarse después del tratamiento y pueden servir de indicador de pronóstico de terapia satisfactoria. (c) Terapéutico: la identificación de un epítipo de antígeno puede conducir a una nueva vacuna basada en péptidos que puede usarse para cambiar la respuesta inmunitaria a T-reguladora o para eliminar o suprimir selectivamente células de tipo 2 inapropiadas.

Enfermedades neoplásicas. La enfermedad neoplásica se define como crecimiento incontrolado de células anormales que han mutado de tejidos normales. Estas incluyen cáncer, tumores sólidos y tumores malignos del sistema linfo/hematopoyético, todos los cuales se denominan generalmente en lo sucesivo tumores. Se ha informado que el entorno del tumor induce tolerancia inmunitaria contra antígenos de tumor mediante varios mecanismos diferentes. Aunque el desarrollo de linfocitos T de tipo 1 contra células tumorales está relacionado con regresión o supresión del crecimiento tumoral, la respuesta inmunitaria desplazada a tolerancia inhibe el desarrollo de linfocitos T de tipo 1 específicos para cáncer. Sin embargo, en algunos cánceres, las respuestas T de tipo 1 específicas para antígenos inducen enfermedad autoinmunitaria por mimetismo antigénico. Por ejemplo, se ha informado que linfocitos T citotóxicos específicos para CDR2, un antígeno de tumor de mama y ovario, inducen degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP) en algunos pacientes.

La aparición de reacciones autoinmunitarias en el transcurso de la inmunidad antitumoral hace que la selección de epítipes críticos específicos sea crítica para una terapia eficaz segura. (a) Diagnóstico: el diagnóstico de complicaciones autoinmunitarias asociadas a tumores puede facilitarse mediante el uso de los procedimientos de la presente invención. (b) Pronóstico: la detección y caracterización de reactividad, tanto de tipo 1, tipo 2 como T-reguladora, para epítipes asociados a tumores específicos usando esta tecnología puede servir de indicador pronóstico de desenlace de enfermedad. Los procedimientos de la presente invención permiten la evaluación de cualquier tipo de tratamiento con vacuna comparando la calidad y magnitud de respuestas inmunitarias específicas

para tumor entre pre-vacuna y pos-vacuna. La detección y caracterización de la reactividad para epítopes asociados a tumores específicos usando esta tecnología puede servir de indicador pronóstico en cuanto a la aparición de enfermedad autoinmunitaria asociada a tumores (c) Terapéutico: la identificación y caracterización de epítopes antigénicos para proteínas asociadas a tumores por medio de la presente invención puede facilitar el desarrollo de vacunas terapéuticas eficaces seguras. Esto incluiría la implementación de vacunas, que evita el mimetismo del propio epítope.

Enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias pueden definirse como trastornos producidos por una respuesta inmunitaria contra los propios tejidos del cuerpo. Se cree que un desplazamiento inapropiado lejos de la función T-reguladora en el contexto de presentación de auto-antígenos es un factor crítico en la aparición y progresión de enfermedad autoinmunitaria. La naturaleza específica de la enfermedad resultante depende de la respuesta dominante. Por ejemplo, en el caso de diabetes de tipo 1, las células de tipo 1 que reconocen islotes pancreáticos han sido aisladas en pacientes (Arif S, J Clin Invest. 2004 113:451). Además, en pacientes con esclerosis múltiple hay pruebas que indican que los linfocitos T polarizados de tipo 1 reactivos contra la proteína básica de la mielina (MBP) se someten a activación *in vivo* y expansión clónica, que se ha informado que desempeña una función importante en la patogénesis. Una restauración de la función T-reguladora sería crítica para la reconstitución de homeostasis inmunitaria normal. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de auto-epítopes dominantes responsables de la expansión de un tipo dado de células inmunitarias autorreactivas. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de epítopes de auto-antígeno para un paciente autoinmunitario individual. Esto es útil para monitorizar respuesta inmunitaria durante el tratamiento o para seguimiento. Los epítopes estimulantes T-reguladores tolerogénicos también pueden identificarse después del tratamiento y pueden servir de indicador pronóstico de terapia satisfactoria. (c) Terapéutico: la identificación de un epítope de antígeno puede conducir a una nueva vacuna basada en péptidos que puede cambiar la respuesta inmunitaria a T-reguladora o para eliminar o suprimir selectivamente células de tipo 1 o de tipo 2 inapropiadas.

Enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (EA) es una forma lentamente progresiva de demencia, que es una alteración adquirida progresiva de las funciones intelectuales. La EA se caracteriza por la deposición progresiva de la beta-proteína amiloide de 42 residuos (Abeta) en regiones del cerebro. Los informes indican que una proporción significativamente mayor de sujetos ancianos sanos y pacientes con EA tuvo fuertes respuestas de linfocitos T reactivos contra Abeta de carácter tanto de tipo 1 como de tipo 2 cuando se compararon con adultos de la misma edad. (a) Diagnóstico: en muchos casos, el diagnóstico diferencial entre enfermedad de Alzheimer y demencia senil sólo puede determinarse concluyentemente después de la muerte. Pueden usarse procedimientos de la presente invención para identificar respuestas de linfocitos T reactivos contra Abeta que, por tanto, pueden servir de un indicador de diagnóstico de EA. (b) Pronóstico: la identificación de respuestas inmunitarias específicas por medio de la presente invención puede permitir la predicción del transcurso clínico de la enfermedad.

Infección aguda. La inducción de respuesta de tipo 1 contra patógenos es crítica para la recuperación de infección por microbios intracelulares tales como bacterias y virus. A diferencia, patógenos extracelulares tales como helmintos inducen el desarrollo de células de tipo 2, cuyas citocinas dirigen IgE y la destrucción mediada por eosinófilos de patógenos. Algunos virus, tales como el virus del Ébola o el virus del dengue, producen una grave enfermedad con alta tasa de mortalidad, para ambos de los cuales no se ha establecido una vacuna autorizada. En un modelo de ratón se han autorizado vacunas con partículas similares a virus (VLP) derivadas de la glucoproteína del virus del Ébola (GP) y proteína de la matriz (VP40) para activar tanto linfocitos T como linfocitos B, y proteger de la exposición vírica. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para la identificación de epítopes novedosos que diagnostican la presencia de patógenos emergentes y re-emergentes y agentes de amenaza biológica. (b) Terapéutico: los procedimientos de la presente invención pueden identificar epítopes de linfocitos T para antígenos víricos cribando pacientes recuperados de estas enfermedades. Por tanto, pueden prepararse nueva vacunas basadas en péptidos contra infecciones víricas mortales agudas.

Trasplante de órganos. El rechazo de un trasplante de órganos es una respuesta hiperinmunitaria generalmente accionada por una respuesta de tipo 1 dominante contra el órgano injertado o, como en el caso de enfermedad de injerto frente a huésped (EIFH), contra el receptor. La función reguladora puede desempeñar una función crítica en el desarrollo de tolerancia y aceptación del injerto a largo plazo. Por tanto, sería ventajosa la activación de respuestas T-reguladoras, o eliminación selectiva de respuestas de tipo 1 dominantes, en el contexto de trasplante de órganos. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para determinar un patrón de reactividad inmunitaria que puede ser predictivo del desarrollo de EIFH aguda y lo más particularmente EIFH crónica. (b) Pronóstico: antes del trasplante o la emergencia después, la existencia de epítopes de tipo 1 dominantes tanto en muestras de donante como de receptor puede ser un indicador pronóstico de rechazo de injerto y la presente invención es adecuada para determinar la presencia de epítopes de tipo 1 dominantes. Los epítopes estimulantes T-reguladores tolerogénicos también pueden identificarse por medio de la presente invención después del tratamiento y pueden servir de un indicador de pronóstico de la tolerancia del injerto. (c) Terapéutico: la identificación de epítopes de antígenos por medio de la presente invención puede conducir a una nueva vacuna basada en péptidos que puede cambiar la respuesta inmunitaria a T-reguladora o para 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 las respuestas inmunitarias mediadas por células inflamatorias crónicas participan en la patogénesis de aterosclerosis. Se informa que la activación de linfocitos T en placas ateroscleróticas se inicia por antígenos derivados de placas, tales como LDL oxidada (oxLDL). Otros informaron la detección de linfocitos T reactivos contra *Chlamydia pneumoniae* en placas ateroscleróticas humanas de la arteria carótida. (a) Diagnóstico: los procedimientos de la presente invención son adecuados para identificación de patrones tempranos de reactividad inmunitaria. (b) Pronóstico: los procedimientos de la presente invención permiten la medición cuantitativa de epítopes de antígenos relacionados con patogénesis de aterosclerosis tales como oxLDL o antígeno de *Chlamydia* de reactividad cruzada, que son reconocidos por linfocitos 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 aterosclerosis.

Debe entenderse que los ejemplos facilitados a continuación son representativos de la invención y pretenden ser ilustrativos de la invención, pero no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención de ningún modo. En particular, el procedimiento para medir la producción de citocinas presentada en los ejemplos es meramente representativo y cualquier procedimiento conocido en la técnica para medir concentraciones de citocina puede usarse en la presente invención.

Ejemplo 1: Respuestas inmunitarias específicas para antígenos ya se detectaron a las 48 horas por simple incubación de PBMC de donante normal con un péptido vírico. Para determinar si una respuesta inmunitaria específica para antígenos puede detectarse mediante los procedimientos de la presente invención usando PBMC y un único péptido, PBMC preparadas frescas de un voluntario normal HLA-A0201+ se incubaron con péptidos limitados a HLA-A0201. Se sabía que el donante tenía linfocitos T CD8+ específicos para Flu-MP, pero no linfocitos T CD8+ específicos para Mage 3, por otros procedimientos (datos no mostrados).

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de sangre recientemente extraída de un voluntario sano HLA-A0201+ por centrifugación en gradiente de densidad en placas Ficoll. Las PBMC se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI complementado con 10% suero AB humano inactivado por calor (Gemini Bio-Products), L-glutamina (2 mM), penicilina (200 UI/ml), estreptomycin (200 µg/ml), piruvato de sodio (1 mM), 1% de aminoácido no esencial, 2-β-mercaptoetanol (50 µM, Sigma) y HEPES pH 7,4 (25 mM, Gibco) (medio completo: MC). 2×10^5 células/pocillo se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 1 µl de cualquiera de los péptidos limitados a HLA-A0201 (concentración de mezcla madre 1 mg/ml, concentración de cultivo 10 µg/ml); Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) o MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ (FLWGPRLV, MultiPeptide Systems, San Diego, CA), o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 horas después, y las citocinas y quimiocinas se midieron con Luminex.

Las PBMC estimuladas con péptido Flu-MP indujeron una gran matriz de citocinas que incluía IFN-γ en el plazo de 48 horas (datos no mostrados). Los resultados demostraron que PBMC frescas de un donante normal responden al péptido Flu-MP y producen una gran matriz de citocinas y que las respuestas inmunitarias específicas para antígenos ya pueden detectarse a las 48 horas por la simple incubación de PBMC con un péptido.

Ejemplo 2: Respuestas inmunitarias específicas para antígenos ya se detectaron a las 48 horas para un amplio repertorio de células reactivas contra péptidos en PBMC que incluían antígenos de tumor. Los antígenos víricos pueden inducir frecuentemente repuestas de memoria más fuertes que los antígenos de tumor. Para determinar si las respuestas inmunitarias específicas para antígenos de tumor pueden detectarse mediante los procedimientos de la presente invención, PBMC criopreservadas en nitrógeno líquido de 2 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 de HLA-A2 de antígenos asociados a melanoma) se descongelaron con PBS frío. Después de un segundo lavado con PBS, las PBMC se incubaron en MC durante 15 min a 37°C y el residuo de células se eliminó con un filtro de células de nailon. Las células se lavaron de nuevo con MC y se resuspendieron en MC a 1×10^6 /ml. Entonces, 2×10^5 células/pocillo se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 1 µl de cada uno de los péptidos limitados a HLA-A0201: (concentración de mezcla madre 1 mg/ml, concentración de cultivo 10 µg/ml); Flu-MP₅₈₋₆₆, CMV PP65 (NLVPMVATV, Biosynthesis, Lewisville, TX), MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉, MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), gp100_{g209-2} M (IMDQVPFSV), tirosinasa 368-376 (YMDGTMSQV, NCI) o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 horas después, y las citocinas producidas se midieron con tecnología Luminex. Adicionalmente se realizó el ensayo ELISPOT para la detección de linfocitos T productores de IFN-γ específicos para antígenos según el protocolo del fabricante (Mabtech). Brevemente, PBMC (2×10^5 células/pocillo) se añadieron a placas previamente recubiertas con 10 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ primario (Mabtech, Estocolmo, Suecia) en presencia o ausencia de 10 µg/ml de péptidos.

El paciente 1, que se sabía que tenía linfocitos T CD8+ para Flu-MP y CMV por ELISPOT directo de IFN-γ (datos no mostrados) demostró inducción de IL-1α, IFN-γ, TNF-α y IP-10 en respuesta al péptido Flu-MP o CMV, pero no con 4 péptidos de melanoma (datos no mostrados). Esto muestra que los péptidos de melanoma no modulan respuesta inmunitaria no específicamente. El paciente 2, que se demostró que tenía linfocitos T CD8+ específicos para MART-1, además de Flu-MP o CMV (datos no mostrados), mostró un ligero aumento de IL-1α y un notorio aumento de IP-10 en respuesta al péptido MART-1, pero no con otros péptidos de melanoma (datos no mostrados). Los resultados

indican que PBMC frescas del donante normal responden al péptido Flu-MP y producen IL-1 α y IP-10. Los perfiles de producción de citocinas/quimiocinas son diferentes entre dos donantes normales diferentes, sugiriendo que diferentes tipos de linfocitos T CD8+ que reconocen el mismo péptido Flu-MP pueden identificarse con el ensayo EPIMAX. Dado el hecho de que IP-10 puede regularse por incremento en respuesta a IFN, las interacciones CD-T pueden inducir la producción de IFN- γ a partir de linfocitos T, que conduce a la producción de IP-10 a partir de CD. Por tanto, IP-10 podría ser un marcador útil para la respuesta de linfocitos T de tipo 1.

Ejemplo 3: La inducción de IP-10 en respuesta al péptido Mart-1 en un paciente con melanoma vacunado con CD34-CD cargadas con péptidos depende de IFN- γ . Para examinar si la producción de IP-10 depende de IFN- γ , PBMC obtenidas de un paciente con melanoma, que se vacunó con CD34-CD autólogas cargadas con péptidos del melanoma HLA-A2, se estimularon con tanto el péptido MART-1 n^o 6 (10 μ M) como el péptido de HLA-A2 Flu-MP (10 μ g/ml) en presencia de mAb anti-IFN- γ R1 bloqueante. La producción de IP-10 se suprimió completamente por el bloqueo de IFN- γ R1 (datos no mostrados). Por tanto, la producción de IP-10 dependía de la producción de IFN- γ , que indica que IP-10 puede ser un marcador sustituto para la producción de IFN- γ .

PBMC criopreservadas descongeladas en nitrógeno líquido de 2 pacientes con melanoma que recibieron al menos 8 inyecciones de vacuna de CD (CD derivadas de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ autólogas cargadas con cuatro (4) péptidos de HLA-A2 de antígenos asociados a melanoma) se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 10 μ g/ml de cada uno de los péptidos limitados a HLA-A0201: Flu-MP₅₈₋₆₆, CMV PP65 (NLVPMVATV), MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ (FLWGPRALV), MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), gp100_{q209-2} M (IMDQVPFSV), tirosinasa₃₆₈₋₃₇₆ (YMDGTMSQV) o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. Se realizó el ensayo ELISPOT para la detección de linfocitos T productores de IFN- γ específicos para antígenos, en el que PBMC (2 x 10⁵ células/pocillo) se añadieron a placas previamente recubiertas con 10 μ g/ml de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ primario en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de péptidos. Los resultados demostraron que un amplio repertorio de células reactivas contra péptidos en PBMC fue identificado por el procedimiento de la presente invención.

Ejemplo 4: Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de secuencia de péptidos específica reconocida por linfocitos T. Para determinar si epítoto(s) de antígeno(s) reconocido(s) por linfocitos T y una respuesta inmunitaria inducida por ese epítoto pueden identificarse con los procedimientos de la presente invención, 5 agrupaciones de péptidos que consisten en 4-7 péptidos de la biblioteca de péptidos 15-meros MART-1 se incubaron con PBMC obtenidas de un paciente con melanoma HLA-A0201+ que recibió vacuna de CD34-CD. Los péptidos 15-meros superpuestos con cuatro (4) compensaciones de aminoácidos se diseñaron para cubrir la secuencia de aminoácidos completa de MART-1 (Mimotopes, San Diego, CA). Cada péptido se reconstituyó con 50% de acetonitrilo a 2 mM y se mantuvo a -80°C hasta uso. Las PBMC se obtuvieron de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. 4-6 péptidos agrupados (1 μ l por péptido), o un único péptido (1 μ l), se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos y se secaron a temperatura ambiente. Entonces, 2 x 10⁵ PBMC en 200 μ l de MC se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 48 horas a 37°C en una estufa de incubación humidificada con 5% de CO₂. Los niveles de citocinas o quimiocinas en sobrenadante de cultivo se midieron con Luminex.

Se encontró que se detectó una cantidad significativamente mayor de IP-10 en el cultivo de la agrupación n^o 1. A continuación, un segundo cultivo de PBMC con un único péptido de la biblioteca de MART-1 se preparó para identificar el péptido responsable dentro de la agrupación n^o 1. El péptido n^o 6 indujo IP-10 marcadas, que indica que este péptido es el epítoto para el paciente con linfocitos T de melanoma. Interesantemente, este péptido contiene la secuencia del epítoto dominante HLA-A0201 (MART-1₂₇₋₃₅; AAGIGILTV). Se obtuvieron PBMC de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Este paciente es HLA-A*0201^{POS}, y se mostró que tenía linfocitos T CD8+ específicos para MART-1 que reconocen el epítoto dominante limitado a HLA-A*0201 (MART-1₂₆₋₃₅) con el ensayo de unión a tetrámero (datos no mostrados). Cuando las PBMC se cultivaron con este péptido MART-1 dominante de HLA-A*0201, dos citocinas, IL-1 α y IP-10, se indujeron específicamente, pero no se observó regulación por incremento de IFN- γ (datos no mostrados). Dado que IP-10 es secretada por muchos tipos de células en respuesta a interferones de tipo I o tipo II, los inventores supusieron que IP-10 se produjo en respuesta a IFN- γ secretado de linfocitos T específicos para MART-1. Por consiguiente, la producción de IP-10 se suprimió completamente bloqueando la función de IFN- γ (Figura 4C). Los resultados indican que la inducción de IP-10 en respuesta al péptido MART-1 en el paciente con melanoma vacunado con CD34-CD cargadas con péptido depende de IFN- γ .

Para comprobar si estas PBMC de paciente contienen linfocitos T CD8+ que reconocen este epítoto dominante, PBMC se cultivaron con CD derivadas de monocitos autólogos cargadas con MART-1₂₇₋₃₅ u otros péptidos de HLA-0201 (por ejemplo, Mage-3, tirosinasa y Flu-MP) y se examinaron para la inducción de la población de linfocitos T CD8+ específicos para antígenos con tetrámeros específicos. Como se muestra en la Figura 4B-4E, los linfocitos T CD8+ específicos para MART-1 se expandieron fácilmente en el plazo de 7 días, que indica que este paciente tiene linfocitos T CD8+ para MART-1 de memoria o efectores y que esta población de linfocitos T CD8+ fue reconocida según procedimientos de la presente invención con la biblioteca de MART-1.

Ejemplo 5: Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias. Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación simultánea de epítopes para

respuesta inmunitaria, además del tipo de respuesta inducida. Según procedimientos generales facilitados en el Ejemplo 4, PBMC de pacientes con melanoma tanto pre-vacuna o pos-vacuna se incubaron con 5-6 agrupaciones de péptidos de las bibliotecas de péptidos MART-1 o NY-ESO1 durante 48 horas (MART-1 con 5 agrupaciones; NY-ESO1 con 8 agrupaciones). Se mostró que resultados típicos representaban distintivos de perfiles de citocinas correspondientes a diferentes respuestas inmunitarias (datos no mostrados). Las agrupaciones de péptidos que mostraron el patrón de cada respuesta inmunitaria se mostraron en barras grises. En una respuesta de tipo 1, la producción de IL-10 es suprimida y se induce IP-10. Por el contrario, en una respuesta T-reguladora, se induce más IL-10 y la producción de IP-10 es suprimida debido a la inhibición de respuestas de tipo 1. IL-13 y eotaxina se detectan en respuestas de tipo 2 sin afectar el nivel de IP-10. Por tanto, la presente invención identifica diversos tipos de respuestas inmunitarias inducidas por cualquier tipo de antígenos en tan rápido como 48 horas. 2×10^5 PBMC frescas de un donante HLA-A0201+ se estimularon con Flu-MP₅₈₋₆₆, MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ o diluyente restringido a HLA-A0201 por triplicado durante los periodos indicados. Las citocinas en el sobrenadante de cultivo se midieron con el ensayo múltiple de citocinas basado en perlas. Se muestra la media \pm DE de datos por triplicado. Este resultado muestra que la producción específica para péptidos de IL-1a y IP-10 alcanzó la meseta a las 48 h de la estimulación de péptidos.

Ejemplo 6: Los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de otros tipos de respuestas inmunitarias inducidas por linfocitos no T. Se muestra que péptidos 15-meros son reconocidos por otras células inmunitarias tales como linfocitos B, linfocitos NK o linfocitos NK-T, y que algunos péptidos se unen a un receptor no identificado, conduciendo a la modulación de respuestas inmunitarias. Otro ejemplo de la presente invención se usó para identificar una respuesta inmunitaria inducida por linfocitos no T con un péptido que presentó un distintivo regulador en un no limitado a MHC. PBMC de un paciente con melanoma se incubaron con agrupaciones de péptidos de la biblioteca de survivina. Como se muestra en la Figura 6A-6H, el péptido nº 15 de la agrupación nº 3 de survivina indujo un fuerte patrón regulador de producción de citocinas. Concretamente, IL-10 y IL-1 β fueron fuertemente inducidas, y IL-1 α y IP-10, que son marcadores para respuestas de tipo 1, fueron gravemente suprimidas.

Para determinar si esta respuesta está limitada a un cierto tipo de molécula de MHC, PBMC derivadas de sangre fresca tomada de 5 voluntarios sanos normales se incubaron con el péptido nº 15 survivina durante 48 horas, y las concentraciones de citocina se midieron según los procedimientos de la presente invención. El péptido nº 15 inhibió la producción de IP-10 en los cinco voluntarios normales (datos no mostrados), que indica que este péptido no está limitado a un cierto subtipo de HLA. Se mostró que el péptido nº 15 survivina tenía una fuerte capacidad para modificar la respuesta inmunitaria debido a que PBMC de un paciente con melanoma estimuladas con el virus de la gripe vivo en presencia del péptido nº 15 presentaron una fuerte supresión de la inducción de IP-10, aparentemente debido a la producción de IL-10 (datos no mostrados). Además, el péptido nº 15 inhibió parcialmente la proliferación de linfocitos T inducida por TSST-1 (datos no mostrados). Los estudios de agotamiento mostraron que las células CD56+ eran responsables de la producción de IL-10 y el bloqueo de IP-10 (datos no mostrados), que indica que el péptido nº 15 survivina actúa sobre la población de linfocitos NK, linfocitos NK-T o linfocitos T gamma/delta. También se mostró que el péptido nº 15 mantenía la supervivencia de linfocitos NK CD3-CD56+ (datos no mostrados). Por tanto, los procedimientos de la presente invención son útiles para la identificación de cualquier tipo de modulación inmunitaria inducida por ciertos tipos de péptidos.

Ejemplo 7: Los procedimientos de la presente invención permiten la inmunomonitorización de pacientes con melanoma durante la vacunación. Se sembraron células a 2×10^5 por pocillo en placas de cultivo de fase I de 96 pocillos previamente acondicionadas codificadas. Las placas de cultivo de fase I contienen 5 agrupaciones de péptidos cada una, de los antígenos de tumor GP100, MAGE3, NY-ESO y MART-1, por cuadruplicado, con 12 péptidos superpuestos, cada uno de 15 aminoácidos de longitud, por agrupación, además de controles de células KLH y Colo asesinadas. Las placas pueden prepararse por adelantado para maximizar el rendimiento y minimizar la variabilidad de ensayo a ensayo. Las células se incuban durante 5 días a 37°C. En paralelo, las células diseñadas para la reestimulación se cultivan durante 7 días en presencia de CD maduras autólogas cargadas con el espectro completo de agrupaciones de péptidos antigénicos a una relación de 30:1 de PBMC con respecto a CD. En el séptimo día, estas células se lavan exhaustivamente y se transfieren a una placa de cultivo de fase I durante 24 horas. Tras la incubación, estas células reestimuladas sedimentarán, y 150 microlitros de cada sobrenadante se transferirán en formato de 96 pocillos a una estación de trabajo Luminex 100 Cytokine Multiplex completamente automatizada equipada con un procesador de muestras robótico TECAN Genesis RPS (TECAN).

Puede usarse una estación de trabajo que puede procesar muestras independientemente del operador con identificación de código de barras y análisis de microplacas al azar. Los sobrenadantes se criban rápidamente por duplicado para la presencia de IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-10 y Granzyme-B, usando una mezcla maestra de múltiples perlas y reactivos previamente preparados y validados. El resto de las muestras de sobrenadante se congela para el posterior análisis. Se tiene previsto que las CD del co-cultivo puedan contribuir a la producción de citocinas de referencia durante la incubación de 24 horas en la placa de fase I. Los sobrenadantes de CD maduras sirven, por tanto, de control en el análisis múltiple de citocinas. Células del ensayo de estimulación primaria se centrifugan y se resuspenden en medio que contiene H³-timidina y se incuban a 37°C. Después de 5 días, la proliferación específica para antígenos se evalúa por cuadruplicado por un ensayo de incorporación de timidina. Los sobrenadantes del ensayo de estimulación primaria se congelan a -80°C para el análisis en una fecha posterior. Aquellas agrupaciones

de péptidos que son positivas para la producción de citocinas después de la reestimulación se criban para la producción de citocinas durante la estimulación primaria.

Las agrupaciones de antígenos de tumor que demuestran ser positivas para reactividad por matriz 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 cultivo de fase II incluyen tiras de pocillos que contienen los 12 péptidos componentes para cada agrupación por duplicado. Las tiras de pocillos de péptidos de fase II se preparan por adelantado y se fijan en marcos marcados con código de barras. Las PBMC descongeladas se cocultivan durante 7 días a 37°C con CD maduras autólogas cargadas con la agrupación de péptidos específica identificada en la fase I, se lavan y se transfieren a una placa de cultivo de fase II durante 24 horas a 2×10^5 por pocillo. Tras la incubación, las células se sedimentan, y 150 microlitros de sobrenadantes se transfieren a la estación de trabajo Luminex para análisis. El cribado múltiple en fase II para una tira de péptidos dada consiste en la citocina o citocinas producidas en respuesta a su agrupación parental durante el análisis de fase I. Las CD maduras solas sirven de control de referencia para el análisis de fase II. Una vez se ha identificado el péptido o péptidos antigénicos de una agrupación dada, se usan para aislar las poblaciones efectoras específicas para antígenos.

La monitorización de la fase III consiste en la identificación y caracterización de células efectoras específicas para péptido. En este procedimiento, 2×10^6 PBMC se descongelan y se incuban durante 7 días a 37°C con CD maduras autólogas cargadas con cada péptido antigénico aislado en la fase II. Entonces, las células se lavan y se someten a una reestimulación de 24 horas. Tras 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 para antígenos se lleva a cabo por análisis de citometría de flujo multicolor usando un citómetro/clasificador de flujo FACSaria (Becton-Dickinson) que puede analizar y clasificar 9 colores. La función de CTL de linfocitos T estimulados se determina *in vitro* por un ensayo de liberación de Cr51 usando péptido cargado, EBV transformado, B-LCL autólogas como dianas. Tras la identificación, las poblaciones de células efectoras específicas para antígenos se subclonan por cocultivo durante 7 días con CD maduras autólogas cargadas con péptidos antigénicos en presencia de IL-2 y IL-6, seguido de reestimulaciones semanales con CD maduras cargadas con péptido en presencia de IL-2 y IL-7. Una vez se establecen poblaciones de células efectoras clónicas se realiza una amplia caracterización de patrones de expresión génica y función citotóxica.

Ejemplo 8: Los procedimientos de la presente invención permiten la selección de epítopes de vacuna en cáncer. La detección y caracterización de la reactividad, tanto de tipo 1, tipo 2 como T-reguladora, para epítopes asociados a tumores específicos usando esta tecnología puede servir de herramienta para la identificación y caracterización de epítopes antigénicos para proteínas asociadas a tumores que provocan un tipo deseado de respuesta inmunitaria cuando se usan para vacunación.

Para seleccionar epítopes de vacuna, PBMC de un paciente se exponen a una serie de bibliotecas de péptidos que representan epítopes antigénicos de proteínas asociadas a tumores. Después de 48 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogen y las citocinas secretadas se analizan según la enseñanza de la presente invención. Se identifican agrupaciones de péptidos que inducen una respuesta de linfocitos T de tipo 1, por ejemplo, producción de IFN- γ , pero no producción de IL-10 (respuesta T-reguladora) o citocinas de tipo 2. En la siguiente etapa, péptidos correspondientes a un tipo de HLA de paciente dado pueden seleccionarse adicionalmente y usarse para la vacunación de este paciente particular. Por tanto, con la presente invención pueden determinarse agentes para vacunación confeccionados a medida para producir un tipo de respuesta inmunitaria deseada en un paciente.

Ejemplo 9: Los procedimientos de la presente invención permiten la selección de epítopes de vacuna en enfermedades infecciosas. Se sabe que muchas de las vacunas actualmente disponibles contra agentes microbianos no confieren inmunidad protectora, por ejemplo, la vacuna contra el virus del dengue. La falta de inmunidad protectora puede ser debida a la inducción de una respuesta inmunitaria inapropiada, por ejemplo, algunos de los presentes epítopes de vacuna pueden inducir linfocitos T de tipo 2, o reguladores, en vez de linfocitos T de tipo 1, desviando y/o inhibiendo así la respuesta inmunitaria hacia una no protectora. En este ejemplo, la tecnología de la presente invención puede servir de herramienta para la identificación y caracterización de epítopes antigénicos de antígenos asociados a microbios que provocan un tipo deseado de respuesta inmunitaria cuando se usan para vacunación.

Para seleccionar epítopes de vacuna, las PBMC de un paciente se exponen a una serie de bibliotecas de péptidos que representan epítopes antigénicos de un microbio, por ejemplo, el virus del dengue. Después de 48 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogen y las citocinas secretadas se analizan según la enseñanza de la presente invención. Se identifican agrupaciones de péptidos que inducen una respuesta de linfocitos T de tipo 1, por ejemplo, producción de IFN- γ , pero no producción de IL-10 (respuesta T-reguladora) o citocinas de tipo 2. En la siguiente etapa, los péptidos se seleccionan adicionalmente y se usan para vacunación. Por tanto, los procedimientos de la presente invención permiten la selección de epítopes que permite la inducción de inmunidad antimicrobiana protectora tras la vacunación.

La Figura 1 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un donante normal evaluado según la presente invención, en la que células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de sangre recientemente

extraída de un voluntario sano HLA-A0201⁺, se sembraron a 2×10^5 células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 1 μ l de cualquiera de los péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) o MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ (FLWGPRLV), o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. Los resultados indican que PBMC frescas del donante normal responden al péptido Flu-MP y producen una gran matriz de citocinas.

La Figura 2 es un gráfico que representa otro ejemplo de respuesta inmunitaria a péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) en un donante normal según la presente invención. Se aislaron PBMC de sangre recientemente extraída de otro voluntario sano HLA-A0201⁺, se sembraron a 5×10^5 células/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 10 μ g/ml de cualquiera de los péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) o MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. Los resultados indican que PBMC frescas del donante normal responden al péptido Flu-MP y producen IL-1 α e IP-10. Los perfiles de producción de citocinas/quimiocinas son diferentes entre dos donantes normales diferentes, sugiriendo que con el ensayo EPIMAX pueden identificarse diferentes tipos de linfocitos T CD8⁺ que reconocen el mismo péptido Flu-MP.

Las Figuras 3A-3D son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de 2 pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. En las Figuras 3A y 3C, para el paciente 1 y 2, respectivamente, PBMC criopreservadas descongeladas en nitrógeno líquido de 2 pacientes con melanoma que recibieron al menos 8 inyecciones de vacuna de CD (CD derivadas de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ autólogas cargadas con cuatro péptidos de HLA-A2 de antígenos asociados a melanoma) se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 10 μ g/ml de cada uno de los péptidos limitados a HLA-A0201: Flu-MP₅₈₋₆₆, CMV PP65 (NLVPMVATV), MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ (FLWGPRLV), MART-1₂₇₋₃₅ (AAGIGILTV), gp100g₂₀₉₋₂ M (IMDQVPFSV), tirosinasa₃₆₈₋₃₇₆ (YMDGTMSQV), o diluyente de péptidos (5% de DMSO en H₂O); y los sobrenadantes de cultivo se recogieron 48 h después y se evaluaron cuantitativamente para la presencia de citocinas y quimiocinas usando tecnología Luminex. En las Figuras 3B y 3D para el paciente 1 y 2, respectivamente, el ensayo ELISPOT se realizó para la detección de linfocitos T productores de IFN- γ específicos para antígenos, en el que PBMC (2×10^5 células/pocillo) se añadieron a placas previamente recubiertas con 10 μ g/ml de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ primario en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de péptidos. Los resultados indican que mediante el procedimiento de la presente invención se identificó un amplio repertorio de células reactivas contra péptidos en PBMC.

Las Figuras 4A-4C son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Para la Figura 4A, PBMC se obtuvieron de un paciente con melanoma HLA-A*0201^{Pos} que recibió vacunas de CD y se estimularon con CD autólogas cargadas con péptido MART-1 dominante limitado a HLA-A*0201 (MART-1₂₆₋₃₅). Se mostró que el paciente tenía linfocitos T CD8⁺ específicos para MART-1 que reconocían el epítipo dominante limitado a HLA-A*0201 (MART-1₂₆₋₃₅) con el ensayo de unión a tetrámero (Figura 4A). Cuando las PBMC se cultivaron directamente con este péptido MART-1 dominante para HLA-A*0201, dos citocinas, IL-1 α e IP-10, se indujeron específicamente, pero no se observó regulación por incremento de IFN- γ (Figura 4B). Dado que IP-10 es secretada por muchos tipos de células en respuesta a interferones de tipo I o tipo II, los inventores supusieron que IP-10 se produjo en respuesta a IFN- γ secretado de linfocitos T específicos para MART-1. Por consiguiente, la producción de IP-10 se suprimió completamente bloqueando la función de IFN- γ usando mAb de bloqueo para IFN γ R (Figura 4C). Los resultados indican que la inducción de IP-10 en respuesta al péptido MART-1 en el paciente con melanoma vacunado con CD34-CD cargadas con péptido depende de IFN- γ .

La Figura 5 es un gráfico que representa la cinética de la respuesta inmunitaria de un donante normal evaluada según la presente invención. 2×10^5 PBMC frescas de un donante HLA-A0201⁺ se estimularon con los péptidos limitados a HLA-A0201 Flu-MP₅₈₋₆₆ o MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ o diluyente por triplicado durante los periodos indicados. Las citocinas en el sobrenadante de cultivo se midieron con el ensayo múltiple de citocinas basado en perlas. Se muestra la media \pm DE de datos por triplicado. Este resultado muestra que la producción específica para péptidos de IL-1 α e IP-10 en el ensayo EPIMAX alcanzó la meseta a las 48 h de la estimulación de péptidos.

La Figura 6 representa el esquema de focalización de epítopes según la presente invención. Primero, bibliotecas de péptidos superpuestos 15-meros que codifican proteínas antigénicas se fraccionan en agrupaciones de péptidos (5-10 péptidos/agrupación) por duplicado. Cinco $\times 10^5$ PBMC se estimulan primero con cada agrupación de péptidos (análisis de agrupaciones). Se miden múltiples citocinas en el sobrenadante de cultivo con un ensayo múltiple de citocinas basado en perlas, y se determinó una agrupación "diana". En el segundo cultivo, focalización de epítopes, PBMC se cultivaron con péptidos individuales de la agrupación "diana" durante 48 h, y el péptido antigénico se determinó posteriormente con análisis múltiple de citocinas.

La Figura 7 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de epítipo reconocido por linfocitos T específicos. Las PBMC se obtuvieron de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Este paciente es HLA-A*0201^{Pos} y se mostró que tenía linfocitos T CD8⁺ específicos para MART-1 que reconocían epítipo dominante limitado a HLA-

A*0201 (MART-1₂₆₋₃₅) con el ensayo de unión a tetrámero (Figura 4A). Los péptidos superpuestos 15-meros con 4 compensaciones de aminoácidos que cubren la secuencia de aminoácidos completa de MART-1 como tanto 4-6 péptidos agrupados (10 µM por péptido) como un único péptido (10 µM) se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos; y 2 x 10⁵ células PBMC en 200 µl de MC se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 48 horas a 37 grados C en una estufa de incubación humidificada con 5% de CO₂; 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 nº 6 MART-1 induce una fuerte producción de IP-10 en PBMC obtenidas de un paciente con melanoma vacunado. El péptido nº 6 MART-1 contiene el epítipo dominante de HLA-A2 10-mero, como se representa en la Figura 4A. Por tanto, los procedimientos de la presente invención permiten la identificación de respuestas de linfocitos T específicas para péptido.

La Figura 8 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Se obtuvieron PBMC de un paciente con melanoma que recibió vacunas de CD. Este paciente es HLA-A*0201^{POS} y se mostró que tenía linfocitos T CD8+ específicos para MART-1 que reconocían el epítipo dominante limitado a HLA-A*0201 (MART-1₂₆₋₃₅) con ensayo de unión a tetrámero (Figura 4A). Las PBMC se estimularon durante 48 h con péptido A2-MART-1 o el péptido 15-mero nº 6 MART-1 en presencia de anticuerpo de bloqueo para IFN-γR (20 µg/ml) o mAAb de control. El péptido A2-HIVpol y el péptido 15-mero nº 15 MART-1 se usaron como péptidos de control. Se muestran los niveles de IL-1a y IP-10 en el sobrenadante de cultivo. Este resultado indica que tanto la producción de IL-1a como de IP-10 depende de la producción de IFN-γ de linfocitos T específicos para péptido, demostrando que IL-1a y IP-10 son marcadores sustitutos para respuestas de linfocitos T de tipo 1, es decir, células Th1 y Tc1.

La Figura 9 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas de pacientes con melanoma se estimularon durante 48 h con tanto agrupaciones de péptidos superpuestos como péptidos individuales que codificaban 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 cualquier citocina en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 10 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas de un paciente con melanoma que recibió series de vacunación con CD se estimularon con tanto agrupaciones de péptidos superpuestos como péptidos individuales que codificaban MART-1, un antígeno de diferenciación de melanoma. Se muestran los niveles de IL-1a y IP-10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 h de cultivo. Con el análisis de agrupaciones (arriba), la agrupación nº 2 y nº 3 indujo regulación por incremento de IL-1a y IP-10. Con la focalización de epítopes (abajo), el péptido nº 6 de la agrupación nº 2 y el péptido nº 13 de la agrupación nº 3 se identificaron como epítopes para linfocitos T específicos. Este resultado indica que el procedimiento de la presente invención permite identificar epítopes para linfocitos T específicos que pueden producir IFN-γ.

La Figura 11 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Se obtuvieron PBMC del mismo paciente que en la Figura 10 con una leucoferesis, se prepararon alícuotas en criotubos y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta uso. Las PBMC descongeladas se estimularon con el péptido 15-mero nº 6 MART-1, el péptido nº 13, o diluyente. Este experimento se repitió tres veces por separado. Se muestran los niveles de IL-1a y IP-10 en los sobrenadantes de cultivo a las 48 h de cultivo. Tres de los 3 experimentos revelaron regulación por incremento de IL-1a y IP-10 tras la estimulación con el péptido nº 6 o nº 13, demostrando una alta reproducibilidad de este ensayo EPIMAX.

La Figura 12A es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas antes de la vacunación con CD y después de 8 vacunaciones con CD de un paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se estimularon con péptidos 15-meros MART-1 individuales o diluyente. Se muestran los niveles de IL-1a y IP-10 en los sobrenadantes de cultivo a las 48 h de cultivo. Mientras que pos-PBMC mostraron la regulación por incremento de IL-1a y IP-10 en respuesta a dos (2) péptidos 15-meros identificados, péptido nº 6 y nº 13, pre-PBMC previas fracasaron en la regulación por incremento de IL-1a y IP-10 en respuesta al péptido nº 13. La producción de IL-1a y IP-10 de pre-PBMC en respuesta al péptido nº 6 fue inferior a la de pos-PBMC. Estos resultados sugieren que la vacunación con CD indujo respuestas de linfocitos T específicas para el péptido nº 13 y potenció las respuestas de linfocitos T específicas para el péptido nº 6. Para examinar esta hipótesis, los inventores usaron una metodología establecida de pocillos diferente, el ensayo de detección de citocinas intracelulares. Las mismas PBMC se estimularon durante 8 h con péptidos 15-meros MART-1 individuales en presencia de mAAb anti-CD28/CD49d y monensina. Después de la permeabilización de la membrana celular, las células se tñieron con mAAb anti-IFN-γ y las poblaciones de IFN-γ+ se analizaron con un citómetro de flujo (Figura 12B). Aunque aproximadamente el 0,15% de los linfocitos T CD8+ produjeron IFN-γ en respuesta a tanto el péptido nº 6 como el nº 13 en pos-PBMC, no se detectó producción de IFN-γ en PBMC previas. Estos resultados demuestran que EPIMAX puede usarse para monitorizar respuestas de linfocitos T específicos para antígenos en pacientes con cáncer y sugieren que la magnitud de cada respuesta de linfocitos T específicos es predecible mirando la magnitud de modulación de citocinas/quimiocinas en EPIMAX.

La Figura 13 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente

invención. CFSE (éster succinimidílico de diacetato de 5,6-carboxifluoresceína) es un colorante trazador que permite identificar la magnitud de división celular con un citómetro de flujo. Como EPIMAX es un ensayo no destructivo, los inventores combinaron tecnología EPIMAX y CFSE para determinar la capacidad proliferativa de linfocitos T específicos para antígenos. Se confirmó que la tinción con CFSE no altera la producción de citocinas en EPIMAX.

5 Las PBMC obtenidas del mismo paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se tiñeron primero con 1 μ M de CFSE y se estimularon con tanto agrupaciones de péptidos superpuestos como péptidos individuales que codificaban MART-1. En el día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de linfocitos T en respuesta a la estimulación de péptidos. La figura muestra el análisis de proliferación de linfocitos T CD8+.

10 La agrupación nº 2 y nº 3 de MART-1, y el péptido nº 6 y nº 13, indujeron la dilución de la intensidad de CFSE en algunas poblaciones de linfocitos T CD8+, demostrando que la estimulación de péptidos indujo la proliferación de linfocitos T CD8+ específicos para antígenos. Este resultado indica que la combinación con otra metodología permite obtener caracterización más fenotípica y/o funcional de linfocitos T específicos para antígenos.

La Figura 14 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas del mismo paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se tiñeron primero con 1 μ M de CFSE y se estimularon con péptidos individuales que codificaban MART-1 por triplicado. En el día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de linfocitos T en respuesta a la estimulación de péptidos. La figura muestra el % de poblaciones de linfocitos T CD8+ diluidas con CFSE dentro de las poblaciones de linfocitos T CD8+.

15 El péptido nº 6 y nº 13 MART-1 indujo la dilución de la intensidad de CFSE en algunas poblaciones de linfocitos T CD8+, demostrando que la estimulación de péptidos indujo la proliferación de linfocitos T CD8+ específicos para antígenos.

La Figura 15 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Linfocitos T CD8+ reconocen péptido 8-10-mero en el contexto de moléculas de clase I del MHC expresadas sobre células presentadoras de antígeno. Para determinar el epítipo preciso para linfocitos T

25 identificados para CD8+, péptidos 10-meros superpuestos se generaron con 1 aminoácido que quedaba atrás dentro del péptido 15-mero nº 13 MART-1 y se usaron para estimular las PBMC del mismo paciente. Se muestran los niveles de IL-1 α y IP-10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 h, y el ensayo de dilución de CFSE en el día 8 de cultivo. Estos resultados demuestran que MART-1₅₄₋₆₂ es el epítipo para los linfocitos T CD8+, que permite la producción de IFN- γ y la proliferación de linfocitos T CD8+ específicos. Por tanto, EPIMAX permite identificar epítopes precisos para linfocitos T CD8+.

Las Figuras 16A-D representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas de un paciente con melanoma HLA-A2^{neg} se estimularon con tanto agrupaciones de péptidos superpuestos como péptidos individuales que codificaban NY-ESO1, un antígeno de

35 cáncer de testículo ampliamente expresado en la mayoría de las células de melanoma. El péptido nº 24 NY-ESO1 dentro de la agrupación nº 5 indujo regulación por incremento de IP-10 a las 48 h (Figura 16A). Estos resultados indican que NY-ESO1₉₃₋₁₀₇ es reconocido como un epítipo por linfocitos T específicos. Para examinar que los subconjuntos de linfocitos T reconocen este epítipo, PBMC del paciente se estimularon con el péptido nº 24 NY-ESO1 en presencia de mAb de bloqueo de anti-clase I de MHC (W6/32) o mAb de control de isotipo. Como se muestra en la Figura 16B, la producción de IP-10 en respuesta al péptido nº 24 se suprimió completamente por W6/32, que indica que la producción de IP-10 depende de la molécula de clase I de MHC, por tanto, que los linfocitos T CD8+ reconocen el péptido nº 24.

Para identificar el epítipo preciso para linfocitos T CD8+, el péptido superpuesto 9-mero dentro del péptido nº 24 se generó y se usó para estimular PBMC del paciente. Como se muestra en la Figura 16C, NY-ESO1₉₄₋₁₀₂ indujo una fuerte regulación por incremento de IP-10, que indica que éste es el epítipo para linfocitos T CD8+.

45 Para identificar el elemento de restricción de HLA, las PBMC se estimularon con CD derivadas de monocitos autólogas pulsadas con el péptido nº 24 NY-ESO1 en presencia de IL-2 (10 UI/ml). En el día 9 de cultivo, las células se re-estimularon con LCL que carecían de molécula de clase I de MHC transfectadas con plásmidos de expresión que codificaban cada HLA, pulsado o sin pulsar con el péptido NY-ESO1₉₄₋₁₀₂. La secreción de IFN- γ durante 8 h de estimulación se midió con ELISA. Como se muestra en la Figura 16D, el transfectante HLA-B*3501 pulsado con el péptido NY-ESO1₉₄₋₁₀₂ indujo la producción de IFN- γ de linfocitos T, que indica que este novedoso péptido es presentado por la molécula HLA-B*3501. Estos resultados indican que EPIMAX permite identificar novedosos epítopes para linfocitos T CD8+ en pacientes HLA-A2^{neg}, y la combinación con otras metodologías permite que los inventores identifiquen sus elementos de restricción de HLA.

La Figura 17 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Las PBMC obtenidas de un paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se estimularon con péptidos superpuestos 10-meros dentro de los péptidos 15-meros nº 6 y nº 13 MART-1 durante 48 h. La Figura 17 muestra los niveles de IP-10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas. MART-1₂₆₋₃₅ (epítipo conocido) y MART-1₅₃₋₆₂ (epítipo novedoso) son los epítopes.

La Figura 18 representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. Las PBMC obtenidas de dos pacientes con melanoma HLA-A2^{neg} se estimularon con péptidos superpuestos 10-meros dentro de los péptidos 15-meros nº 6 MART-1 durante 48 horas. Se muestran niveles de IP-

10 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas. MART-1₂₆₋₃₅ (epítoto conocido) es el epítoto para ambos pacientes. Este epítoto se conoce como limitado a HLA-A2. Como estos pacientes son HLA-A2^{neg}, y los subtipos de clase I de HLA son completamente diferentes entre estos dos pacientes, este epítoto es presentado por al menos tres moléculas de la clase I de MHC diferentes. Este es otro ejemplo de identificación de epítotos para linfocitos T CD8+ con EPIMAX.

La Figura 19 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Las PBMC obtenidas de un paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se estimularon por triplicado con péptidos 15-meros MART-1 individuales de nº 6 a nº 15 durante 48 h. Se muestran los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas. Los péptidos nº 10 y nº 11 MART-1 indujeron regulación por incremento de IL-2. Este resultado demuestra otro ejemplo de identificación de epítotos con EPIMAX.

La Figura 20 representa la producción de IL-2 de linfocitos T CD4+ tras la estimulación con el péptido 15-mero identificado como se muestra en la Figura 19. Las PBMC del mismo paciente se estimularon durante 8 horas con el péptido 15-mero nº 10 MART-1 en presencia de mAb anti-CD28/CD49d y monensina. La producción de IL-2 se analizó por tinción con mAb específicos. La figura demuestra que las poblaciones de linfocitos T CD4+ producen IL-2 en respuesta al péptido nº 10 MART-1. Estos resultados indican que EPIMAX también puede identificar epítotos para linfocitos T CD4+.

Las Figuras 21A-B representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas del mismo paciente con melanoma (mismo que la Figura 19) se tiñeron primero con 1 µM de CFSE y se estimularon con péptidos individuales que codificaban MART-1 por triplicado. En el día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó proliferación de linfocitos T en respuesta a la estimulación de péptidos. La figura 21A muestra el % de poblaciones de linfocitos T CD4+ diluidas con CFSE dentro de las poblaciones de linfocitos T CD4+. El péptido nº 10 y nº 11 MART-1 indujo más poblaciones de linfocitos T CD4+ diluidas con CFSE que no péptido, demostrando que estos péptidos indujeron la proliferación de linfocitos T CD4+ específicos para antígenos. La Figura 21B representa las poblaciones de linfocitos T CD4+ diluidas con CFSE en respuesta a cada péptido 15-mero MART-1 dentro de la población de linfocitos T CD4+. El péptido nº 10 y nº 11 MART-1 indujo significativamente más proliferación de linfocitos T CD4+ que los otros péptidos 15-meros. Estos resultados indican fuertemente que EPIMAX permite la identificación de epítotos para linfocitos T CD4+ y permite determinar la capacidad proliferativa de linfocitos T CD4+ específicos combinando con la tecnología de CFSE.

Las Figuras 22 A-C representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas de un paciente con melanoma HLA-A2^{neg} que recibió vacunaciones con CD se tiñeron primero con 1 µM de CFSE y se estimularon con agrupaciones de péptidos que codificaban NY-ESO1. En el día 8 de cultivo, las células se tiñeron con CD8-PE, CD3-PerCP y CD4-APC y se analizó la proliferación de linfocitos T en respuesta a la estimulación de péptidos basándose en la dilución de CFSE con un citómetro de flujo. La Figura 22A muestra el porcentaje (%) de poblaciones de linfocitos T CD4+ diluidas con CFSE dentro de las poblaciones de linfocitos T CD4+. La agrupación nº 8 de NY-ESO1 indujo más poblaciones de linfocitos T CD4+ diluidas con CFSE que las otras agrupaciones, demostrando que estos péptidos indujeron la proliferación de linfocitos T CD4+ específicos para antígenos. La Figura 22B representa los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas de cultivo. La IL-2 se produjo en el cultivo con la agrupación nº 8 de NY-ESO1. Para identificar el epítoto para linfocitos T CD4+, PBMC teñidas con CFSE se estimularon con péptidos individuales dentro de la agrupación nº 8 de NY-ESO1. Los linfocitos T CD4+ proliferantes se analizaron basándose en la dilución de CFSE con un citómetro de flujo en el día 8. Como se muestra en la Figura 22C, NY-ESO1₁₄₉₋₁₆₇ y NY-ESO1₁₆₅₋₁₈₀ indujeron más proliferación de linfocitos T CD4+, demostrando que estos son los epítotos. Este resultado indica otro ejemplo de identificación de epítotos de linfocitos T CD4+ en antígenos de melanoma.

La Figura 23 representa la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Las PBMC obtenidas de un paciente con melanoma (mismo que la Figura 10) se estimularon por triplicado con péptidos 15-meros MART-1 individuales de nº 6 a nº 15 durante 48 h. Se muestran los niveles de IL-5 en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas. Los péptidos nº 10 y nº 11 MART-1 indujeron la regulación por incremento de IL-5. Este resultado demuestra otro ejemplo de identificación de epítotos con EPIMAX.

La Figura 24 representa la producción de IL-5 a partir de linfocitos T CD4+ tras la estimulación con el péptido 15-mero identificado como se muestra en la Figura 23. Las PBMC del mismo paciente se estimularon durante 8 horas con el péptido 15-mero nº 11 MART-1 en presencia de mAb anti-CD28/CD49d y monensina. La producción de IL-5 se analizó por tinción con mAb específicos. La figura demuestra las poblaciones de linfocitos T CD4+ que producen IL-5 en respuesta al péptido nº 11 MART-1. Este resultado indica que EPIMAX puede identificar epítotos, además de tipos de citocinas producidas por linfocitos T CD4+ específicos.

La Figura 25 representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. Las PBMC teñidas con CFSE obtenidas de dos pacientes con melanoma se estimularon con péptidos 15-meros individuales tanto de la agrupación nº 25 de TRP-1 como de la agrupación nº 15 de gp100. Las citocinas en los sobrenadantes de cultivo se midieron a las 48 h y se analizó la proliferación de linfocitos T en el día 8 de cultivo basándose en el ensayo de dilución de CFSE. Los resultados indican que el péptido nº 124 TRP-1 y el péptido nº

5 152 gp100 son epítopes para linfocitos T CD4+, siendo ambos epítopes novedosos para linfocitos T CD4+. La estimulación de péptidos indujo la producción de diversas citocinas efectoras tales como IL-2, IL-5, IL-13 y IP-10 (IFN- γ) y la proliferación de linfocitos T CD4+ específicos. Estos resultados indican otro ejemplo de identificación de epítopes de linfocitos T CD4+ en antígenos de melanoma, y sugieren que EPIMAX puede usarse para identificar diferentes tipos de respuestas de linfocitos T.

10 La Figura 26 representa la respuesta inmunitaria de tres pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. EPIMAX permite identificar diferentes subconjuntos de linfocitos T tales como células de tipo 1 (Th1 y Tc1), tipo 2 (Th2 y Tc2). PBMC obtenidas de pacientes con melanoma metastásico se estimularon con péptidos de melanoma recientemente identificados (15-meros) durante 48 h, y las citocinas en los sobrenadantes de cultivo se midieron con un ensayo múltiple basado en perlas. Las columnas coloreadas representan los niveles de citocinas con péptidos indicados (abajo) y las columnas abiertas representan aquellos con diluyente. Se muestra la representativa producción de citocinas para tres subconjuntos de linfocitos T diferentes, tipo 1, 2 y de tipo IL-10. La respuesta de tipo 1 se identifica por la regulación por incremento de IL-1a y IP-10, mientras que la respuesta de tipo 2 se identifica por la regulación por incremento de citocinas de tipo 2, tales como IL-4, IL-5 y IL-13, sin regulación por incremento de IP-10. EPIMAX se usó para identificar una novedosa respuesta de linfocitos T caracterizada por la regulación por incremento de IL-10 (tipo IL-10).

15 La Figura 27 representa un resumen de nuevos epítopes para linfocitos 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 cribando 13 pacientes con PBMC de melanoma con EPIMAX.

20 La Tabla 1 representa el resumen de epítopes para linfocitos T CD8+ identificados con EPIMAX. Se muestran los péptidos 15-meros identificados y su número de secuencia de aminoácidos. Algunos péptidos 15-meros se focalizaron tanto con péptidos superpuestos 9-meros como 10-meros, y se muestran en la tabla.

| Paciente | Pre o pro | biblioteca de péptidos | epítopes identificados | secuencia del epítope | Epítope preciso | Tipo de respuesta |
|----------|-----------|------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------|
| 094-001 | Pre | MART-1 | p6 | MART-1 ₂₁₋₃₅ | MART-1 ₂₆₋₃₅ | 1 |
| | Pos | MART-1 | p6 | MART-1 ₂₁₋₃₅ | MART-1 ₂₆₋₃₅ | 1 |
| | Pre | NY-ESO1 | p24 | NY-ESO1 ₉₃₋₁₀₇ | NY-ESO1 ₉₄₋₁₀₂ | 1 |
| | Pos | NY-ESO1 | p24 | NY-ESO1 ₉₃₋₁₀₇ | NY-ESO1 ₉₄₋₁₀₂ | 1 |
| | Pre | gp100 | p60 | gp100 ₂₃₇₋₂₅₁ | NY-ESO1 ₉₄₋₁₀₂ | 1 |
| 094-004 | Pre | MART-1 | p6 | MART-1 ₂₁₋₃₅ | MART-1 ₂₆₋₃₅ | 1 |
| | Pos | MART-1 | p6 | MART-1 ₂₁₋₃₅ | MART-1 ₂₆₋₃₅ | 1 |
| 094-007 | Pre | NY-ESO1 | p39 | NY-ESO1 ₁₅₃₋₁₆₇ | | 1 |
| | Pos | NY-ESO1 | p39 | NY-ESO1 ₁₅₃₋₁₆₇ | | 1 |
| 094-009 | Pos | MART-1 | p6p ₁₃ | MART-1 ₂₁₋₃₅ | MART-1 ₂₆₋₃₅ | 1 |
| | Pos | MART-1 | p ₅₂ | MART-1 ₄₉₋₆₃ | MART-1 _{53-62, 54-62} | 1 |
| | Pos | gp100 | | gp100 ₂₀₅₋₂₁₉ | gp100 ₂₀₈₋₂₁₇ | 1 |
| 094-010 | Pos | NY-ESO1 | p21 | NY-ESO1 ₈₁₋₉₅ | | 10 |
| | Pos | gp100 | p140 | gp100 ₅₅₇₋₅₇₁ | | 1 |
| 094-012 | Pos | NY-ESO1 | p31 | NY-ESO1 ₁₅₃₋₁₆₇ | | 1 |
| 094-015 | Pos | NY-ESO1 | p38 | NY-ESO1 ₁₄₉₋₁₆₃ | | 0 |
| | Pos | NY-ESO1 | p40 | NY-ESO1 ₁₅₇₋₁₇₁ | NY-ESO1 ₁₆₀₋₁₆₉ | 0 |
| | Pos | NY-ESO1 | p41 | NY-ESO1 ₁₆₁₋₁₇₅ | NY-ESO1 ₁₆₁₋₁₇₀ | 1/10 |
| | Pos | gp100 | p73 | gp100 ₂₈₉₋₃₀₃ | NY-ESO1 ₁₆₁₋₁₇₀ | 10 |

ES 2 390 248 T3

La Tabla 2 representa el resumen de epítopes para células Th0, Th1 y Th2 identificadas con EPIMAX. Se muestran los péptidos 15-meros 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 | Pos | NY-ESO1 | p38/p39 | NY-ESO1 ₁₄₉₋₁₆₇ | 0 | Sí |
| | | NY-ESO1 | p42/p43 | NY-ESO1 ₁₆₅₋₁₈₃ | 0 | Sí |
| | | TRP-1 | p118 | TRP-1 ₄₆₉₋₄₈₃ | 1 | Sí |
| | | TRP-1 | p124 | TRP-1 ₄₉₃₋₅₀₇ | 1 | Sí |
| 094-009 | Pos | MART-1 | p10/p11 | MART-1 ₃₇₋₅₅ | 2 | Sí |
| | | gp100 | p152 | gp100 ₆₀₅₋₆₁₉ | 0 | Sí |
| | | TRP-1 | p48 | TRP-1 ₁₈₉₋₂₀₃ | 0 | Sí |
| 094-012 | Pos | gp100 | p32 | gp100 ₁₂₅₋₁₃₉ | 2 | Sí |
| | | gp100 | p40 | gyp100 ₁₅₇₋₁₇₁ | 2 | Sí |
| | | gp100 | p71 | gp100 ₂₈₁₋₂₉₅ | 2 | Sí |
| | | gp100 | p78 | gp100 ₃₀₉₋₃₂₃ | 2 | Sí |
| | | gp100 | p152 | gp100 ₆₀₅₋₆₁₉ | 2 | Sí |
| 094-015 | Pos | gp100 | p1/p2 | gp100 ₁₋₁₈ | 0 | Sí |
| | | gp100 | p152 | gp100 ₆₀₅₋₆₁₉ | 0 | Sí |
| | | MART-1 | p11 | MART-1 ₄₁₋₅₅ | 0 | Sí (CD4/CD8) |

5 La Tabla 3 representa el resumen de epítopes para linfocitos T CD4+ de tipo IL-10 identificados con EPIMAX. Se muestran los péptidos 15-meros 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 ₃₇₋₅₁ | 10 | No |
| | Pos | MART-1 | p10 | MART-1 ₃₇₋₅₁ | 10 | No |
| | Pre | TRP-1 | p113 | TRP-1 ₄₄₉₋₄₆₃ | 10 | No |
| 094-005 | Pre | gp100 | p93 | gp100 ₃₆₉₋₃₈₄ | 10 | No |
| 094-006 | Pre | MART-1 | p8 | MART-1 ₃₇₋₅₁ | 10 | No |
| 094-007 | Pre | NY-ESO1 | p43 | NY-ESO ₁₆₉₋₁₈₃ | 10 | No |
| | Pre | NY-ESO1 | p39/p40 | NY-ESO1 ₁₆₉₋₁₈₃ | 10 | Marginal |
| | Pre | TRP-1 | p50 | TRP-1 ₁₉₇₋₂₁₁ | 10 | Marginal |
| 094-010 | Pos | NY-ESO1 | p23 | NY-ESO1 ₈₉₋₁₀₃ | 10 | Sí |
| 094- *013 | Pos | NY-ESO1 | p23 | NY-ESO1 ₈₉₋₁₀₃ | 10 | |

10 La Figura 28 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de tres pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. El análisis EPIMAX de PBMC obtenidas de pacientes con melanoma metastásico (13 pacientes) con péptidos superpuestos MART-1, gp100, NY-ESO1 y TRP-1 dio 16 péptidos que indujeron respuestas de tipo 1, 15 péptidos que indujeron respuestas de tipo 0/2 y 9 péptidos que indujeron de tipo IL-10. Las citocinas se midieron en el día 2 de los cultivos. Se muestran los niveles de IL-1 α y IP-10 en cada subconjunto de linfocitos T, respectivamente. Cada punto representa niveles de citocinas en cada pocillo separado de este cultivo de PBMC de

estos pacientes estimulados con péptidos individuales identificados. Este resultado indica que IL-1 α y IP-10 establecen completamente una correlación con la respuesta de tipo 1.

Las Figuras 29A-D son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas de un paciente con melanoma se estimularon con agrupaciones 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). El péptido n° 39 y n° 40 NY-ESO1 son los epítopes. Para explorar el origen de la producción de IL-10, las PBMC se estimularon con péptido n° 39 en presencia de mAb anti-CD28/CD49d y monensina durante 8 horas, y se tiñeron con mAb específico para IL-10. Como se muestra en la Figura 29B, aproximadamente el 0,11% de los linfocitos T CD4+ produjeron IL-10 en respuesta al péptido n° 39 NY-ESO1. Este resultado indica que EPIMAX permite que IL-10 produzca linfocitos T CD4+ específicos para antígenos de melanoma en pacientes con melanoma. A continuación, para evaluar si estos linfocitos T productores de IL-10 tenían propiedades reguladoras, las PBMC se estimularon con el péptido n° 39 o se añadió péptido 15-mero irrelevante en Transwells a una MLR de "un tercero" para probar la supresión de la expansión de linfocitos T por la liberación de mediadores solubles. La MLR usó linfocitos T CD4⁺ marcados con FSE y CD maduras alogénicas, ambas de voluntarios sanos, con el fin de prevenir el efecto de la respuesta de linfocitos T específicos para péptido. Las PBMC del paciente estimuladas con el péptido n° 39 NY-ESO1, pero no con péptido de control, suprimieron significativamente la proliferación en la MLR (Figuras 29C, 29D). Estos resultados indican que el enfoque de EPIMAX puede identificar linfocitos T reguladores específicos para antígenos tumorales.

La Figura 30 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. PBMC obtenidas del mismo paciente con melanoma que en las Figuras 29A-D en dos momentos de tiempo diferentes, es decir, antes de la vacunación con CD y después de las 8 vacunaciones con 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 del tipo IL-10 desapareció después de la vacuna, sugiriendo que la función de linfocitos T CD4+ productores de IL-10 se había perdido después de la vacuna. Estos resultados demuestran otro ejemplo de modulación de respuestas de linfocitos T por vacuna de CD con el ensayo EPIMAX.

La Figura 31 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. Los inventores han identificado 9 epítopes diferentes en antígenos de melanoma que indujeron respuestas de tipo IL-10 en 7 pacientes con melanoma. PBMC obtenidas de pacientes con melanoma se incubaron con cada péptido 15-mero identificado específico para 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. Esta es otra demostración de la función supresora de linfocitos T CD4+ productores de IL-10 identificados con EPIMAX.

La Figura 32 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de pacientes con melanoma como se evalúa según la presente invención. Se muestran niveles de IL-1 β y IP-10 en cada cultivo de PBMC con IL-10 identificada que indujeron péptidos 15-meros. Cada punto representa niveles de citocinas en cada pocillo separado en cultivo de PBMC con los péptidos 15-meros individuales únicos identificados. Este resultado muestra que IL-1 β y IL-10 establecen una correlación con respuestas de tipo IL-10 identificada, por tanto, ambas citocinas pueden ser un buen marcador para identificar células de tipo IL-10 en EPIMAX.

La Figura 33 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención. Las PBMC frescas obtenidas de tres voluntarios sanos normales se fraccionaron en 3 lotes. Las PBMC de cada lote se estimularon con agrupaciones de péptidos 15-meros superpuestos que codificaban la proteína de la matriz del virus de la gripe (Flu-MP) por duplicado (2 x 10⁵ células/pocillo, 10 μ M por péptido), por tanto, crearon 6-plicados de muestras. Se muestran niveles de IP-10 a las 48 h de cultivo. Las barras negras y las sombras representan el valor medio \pm 3DE de IP-10 en los cultivos sin péptidos. Los niveles de IP-10 se determinaron por encima de la media+3DE de esta referencia son inducción positiva de IP-10 en respuesta a agrupaciones de péptidos. En el donante normal n° 1, 9 de las 12 agrupaciones de péptidos puntuaron positivas para más de 4 de los 6-plicados de muestras, que indica que este donante tuvo un repertorio muy ancho de linfocitos T específicos para Flu-MP. A diferencia, el donante normal n° 3, ninguna agrupación indujo regulación por incremento de IP-10. EPIMAX permite la identificación de la anchura completa de respuestas de linfocitos T contra una proteína antigénica dada. Además, este estudio muestra que EPIMAX es un ensayo altamente reproducible.

La Figura 34 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención. Se mostraron los niveles de IL-6 y IP-10 en los mismos estudios mostrados en la Figura 33. Sorprendentemente, en el donante normal n° 3, no se identificaron dianas con la producción de IP-10, pero muchas agrupaciones de péptidos puntuaron positivas 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 linfocitos T en EPIMAX.

La Figura 35 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención. Se mostraron los niveles de IL-1 α y IP-10 en los estudios mostrados en la Figura 33. Cada punto representa niveles de citocinas en cada pocillo separado en cultivo de PBMC con las agrupaciones de péptidos. En todos los donantes, los niveles de IL-1 α y IP-10 establecen una correlación muy buena en EPIMAX,

confirmando que estos dos marcadores establecen completamente una correlación con repuestas de tipo 1.

La Figura 36 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención. Las PBMC congeladas obtenidas del donante nº 1 se descongelaron y se estimularon con tanto agrupaciones de péptidos 15-meros como péptidos individuales que codificaban Flu-MP. Se muestran los niveles de IL-1a y IP-10. Cada punto representa niveles de citocinas en cada pocillo separado en cultivo de PBMC con las agrupaciones de péptidos o péptidos individuales. Incluso con las PBMC congeladas, los niveles de IL-1a y IP-10 establecen una correlación muy buena ($P < 0,0001$, $r = 0,9121$), que indica que estos dos marcadores pueden usarse para identificar repuestas de tipo 1 en EPIMAX, independientemente de que las PBMC se obtengan frescas o congeladas.

La Figura 37 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención. Las PBMC frescas o congeladas obtenidas del donante nº 1 se estimularon con agrupaciones de péptidos 15-meros que codificaban Flu-MP. Se muestran los niveles de IL-1a y IP-10. Como se muestra en la Figura 37, ambas agrupaciones nº 6 y nº 12 indujeron la regulación por incremento de IL-1a y IP-10 en PBMC frescas y congeladas. Este estudio demuestra que pueden usarse PBMC congeladas para monitorizar repuestas de linfocitos T específicas para antígenos con EPIMAX.

La Figura 38A, 38B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención. Las PBMC congeladas obtenidas del donante nº 1 se descongelaron y se estimularon con una agrupación de péptidos o péptidos individuales que codificaban Flu-MP en 6-plicados (2×10^5 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 PBMC (2×10^6 células/pocillo) se estimuló con la misma concentración de péptido 15-mero por triplicado. Como se muestra en la Figura 37B, aunque el péptido nº 58 y nº 59 pusieron en marcha la producción de IP-10 en ambos estudios, el contraste entre muestras y el cultivo de control es mayor cuando se usaron más PBMC/pocillo en EPIMAX. Por tanto, el mayor número de PBMC por pocillo ayuda a reducir la variabilidad y sensibilidad en el ensayo EPIMAX. Considerando la baja frecuencia de linfocitos T específicos para antígenos en PBMC (normalmente 1 de las 10^5 PBMC), es plausible que las repuestas de linfocitos T puedan no detectarse con EPIMAX (o prácticamente ningún tipo de ensayo) cuando pocas células respondieron a la estimulación de péptidos. Por tanto, en el ensayo EPIMAX regular los inventores están usando 5×10^5 PBMC/pocillo.

La Figura 39A y 39B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX. PBMC se resuspendieron en MC a 1×10^6 células/ml, y 1 ml de suspensiones de células se pusieron en tubos de cultivo y se estimularon con péptidos individuales indicados de la biblioteca de Flu-MP durante 7 días. Las PBMC cultivadas se recogieron y se reestimularon con CD pulsadas con el péptido indicado durante 5 h en presencia de monensina. Las citocinas citoplásmicas se examinaron con mAb específicos después de la permeabilización de células. Se mostraron los porcentajes de células productoras de citocinas en la población de linfocitos T $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ (Figura 39A). La estimulación con péptidos dominantes indujo la proliferación de linfocitos T CD4^+ específicos. Las PBMC del donante se tiñeron primero con 1 mM de CFSE. Las PBMC se resuspendieron en MC a 1×10^6 células/ml y 1 ml de suspensiones de células se pusieron en tubos de cultivo y se estimularon con los péptidos individuales indicados de la biblioteca de Flu-MP durante 6 días. Las células estimuladas se tiñeron con mAb anti-CD3 y CD4, y los linfocitos T CD4^+ proliferantes se analizaron con un citómetro de flujo basado en dilución con CFSE. Se mostraron los porcentajes de células de CFSE en la población de linfocitos T $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ (Figura 39B). Estos resultados demuestran que la prueba de EPIMAX permitió la identificación de epítipo para linfocitos T CD4^+ específicos para Flu-MP funcionales.

La Figura 40 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un voluntario sano normal como se evalúa según la presente invención. Se obtuvieron PBMC del donante nº 2 en la Figura 33. Las PBMC congeladas se descongelaron y se estimularon con tanto la agrupación Flu-MP nº 11 como los péptidos 15-meros individuales dentro de la agrupación nº 11 (5×10^5 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 nº 52 y nº 53 son epítopes para linfocitos T específicos para Flu-MP, que muestran otro ejemplo de identificación de novedosos epítopes para linfocitos T CD4^+ específicos.

La Figura 41A, 41B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales contra los péptidos identificados en el ensayo EPIMAX. Las PBMC usadas en el estudio en la Figura 40 se marcaron con CFSE y se estimularon con péptidos individuales dentro de la agrupación Flu-MP nº 11. Los linfocitos T CD4^+ diluidos con CFSE se analizaron en el día 8 de cultivo (Figura 41A). En otro estudio, las poblaciones de linfocitos T CD4^+ diluidas con CFSE se analizaron en el día 6, 7, 8 y 10 de cultivo (Figura 41B). Estos estudios demuestran que el péptido identificado (péptido Flu-MP nº 52 y nº 53) con EPIMAX indujo la proliferación de linfocitos T CD4^+ específicos para péptido y la población de linfocitos T CD4^+ proliferante alcanzó un pico en el día 7 u 8 de la estimulación de péptidos. Este estudio muestra otro ejemplo de identificación de novedosos epítopes para linfocitos T CD4^+ específicos, y justifica la realización de un análisis de población de linfocitos T CD4^+ proliferantes en el día 8 de cultivo.

La Figura 42 son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención. Se obtuvieron PBMC de un paciente con melanoma que se sometió a vacunaciones con CD. El paciente recibió vacuna de CD autólogas cargadas con líneas de células de melanoma alogénicas

asesinadas. Es posible que la vacuna de CD indujera linfocitos T en este paciente específicos para antígenos alogénicos expresados en líneas de células de melanoma alogénicas usadas para vacunas de CD. Para examinar esta posibilidad, las PBMC de pacientes se estimularon con péptidos 15-meros superpuestos que codificaban HLA-B*4001, que se expresa en la línea de células de melanoma, pero no en las células de paciente. Como se muestra en la Figura 42, el péptido nº 5 y el péptido nº 7 dentro de la agrupación nº 1 indujeron la producción de IP-10 en cultivo de PBMC. Como es de esperar, estos dos epítopes pueden ser epítope antigénico para el paciente, ya que ambos de los péptidos contienen desapareamientos de aminoácidos. Estos resultados demuestran que EPIMAX puede identificar respuestas de linfocitos T específicos para antígenos alogénicos. Por tanto, esta metodología puede ser útil para identificar linfocitos T específicos para antígenos alogénicos en un ámbito de trasplante de órganos.

La Figura 43 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de un paciente diabético de tipo 1 como se evalúa según la presente invención. Se obtuvieron PBMC de un paciente con diabetes de tipo 1 que tomaba fármacos inmunodepresores tales como Cellcept y prednisolona. Las PBMC frescas (5×10^5 células/pocillo) se estimularon con péptidos individuales 15-meros que codificaban IA-2, uno de los auto-antígenos específicamente expresados sobre células β de los islotes pancreáticos. Se muestran los niveles de IP-10 a las 48 h de cultivo. El péptido 15-mero nº 47, 60, 61, 62, 64 y 66 indujo regulación por incremento de la producción de IP-10 en cultivo de PBMC.

Este estudio demuestra que este paciente tiene un amplio repertorio de células de tipo 1 específicas para IA-2. Además, 5 de los 6 (péptido nº 47, 60, 61, 62 y 66, las secuencias se muestran en la Tabla 4) son epítopes novedosos para linfocitos T. Por tanto, este estudio indica que EPIMAX permite a los inventores identificar epítopes y tipo de respuesta de linfocitos T en un modelo de enfermedad autoinmunitaria incluso bajo medicación de fármacos inmunodepresores.

| | |
|---------------|-------------------------|
| péptido nº 47 | IA-2 ₇₈₉₋₈₀₃ |
| péptido nº 60 | IA-2 ₈₄₁₋₈₅₅ |
| péptido nº 61 | IA-2 ₈₄₅₋₈₅₉ |
| péptido nº 62 | IA-2 ₈₄₉₋₈₆₃ |
| péptido nº 64 | IA-2 ₈₅₇₋₈₇₁ |
| péptido nº 66 | IA-2 ₈₆₅₋₈₇₉ |

La Figura 44A y 44B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria de un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias. PBMC obtenidas de un paciente con melanoma pre-vacuna se incubaron con 5 agrupaciones de péptidos (7-8 péptidos/agrupación) de la biblioteca de péptidos de survivina. La agrupación nº 3 de survivina indujo la regulación por disminución de IP-10 y la regulación por incremento de IL-10. Entonces, las PBMC se incubaron con péptido individual de la agrupación nº 3 para identificar el péptido responsable, el péptido nº 15. La regulación por incremento de IL-10 guardó relación con IL-1b. Los datos se muestran en la Figura 44A y 44C para IP-10, Figura 44B y 44D para IL-10, Figura 44E y 44G para IL-1 α y Figura 44F y 44H para IL-1 β .

La Figura 45 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria de voluntarios sanos normales como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T. Las PBMC se aislaron de sangre fresca de 5 voluntarios sanos, se incubaron con el péptido nº 15 survivina durante 48 horas y se evaluaron según los procedimientos de la presente invención. La IP-10 producida en el sobrenadante de cultivo se midió, y los datos en la Figura 45 se facilitan en valores relativos (%) para los cultivos en los que no se añadió péptido. Se mostró que el péptido nº 15 survivina inhibió la producción de IP-10 en los cinco voluntarios en un modo no restringido a MHC.

La Figura 46A y 46B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T. Las PBMC de un paciente con melanoma se cultivaron durante 18 horas en presencia o ausencia del péptido nº 15 survivina y/o virus de la gripe vivo (Charles River Laboratories, CT). Las concentraciones de IP-10 (Figura 46A) y IL-10 (Figura 46B) se midieron con Luminex. Se mostró que el péptido nº 15 survivina inhibió la producción de IP-10 de PBMC estimuladas con virus de la gripe vivo.

La Figura 47 es un gráfico que representa la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T. Las PBMC de un paciente con melanoma se estimularon durante 5 días con TSST-1 a concentraciones valoradas en presencia del péptido nº 15 survivina, o péptido nº 16 (11 aminoácidos son idénticos al péptido nº 15). Después de 5 días se añadió timidina valorada (1 μ Ci/pocillo). Las placas se recogieron 16 horas después y la radiactividad incorporada se midió por un contador de centelleo Wallac. Se mostró que el péptido nº 15 survivina

inhibió la proliferación de linfocitos T estimulados con Test-1.

La Figura 48A-48D son gráficos que representan la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T. Los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD56⁺, BDCA-4⁺, o BDCA-1 ó 3⁺ se agotaron de un paciente con

- 5 PBMC de melanoma usando microperlas conjugadas con cada mAb (Miltenyi). Como control negativo, PBMC se pasaron por una columna sin ninguna perla (sin agotamiento). Las células agotadas se resuspendieron en MC a 1 M/ml y se estimularon con virus de la gripe vivo en presencia o ausencia del péptido nº 15 survivina. Los sobrenadantes se recogieron a las 48 horas y los niveles de IL-10 y IP-10 se analizaron con Luminex. Los datos muestran que los linfocitos CD14⁺ o CD56⁺ son necesarios para que el péptido nº 15 induzca la secreción de IL-10.
- 10 La Figura 49A y 49B son gráficos que representan la respuesta inmunitaria en un paciente con melanoma como se evalúa según la presente invención, que permite la identificación de diversos tipos de respuestas inmunitarias por linfocitos no T. Las PBMC de pacientes con melanoma se tiñeron con CFSE 5 µM y se cultivaron durante 4 días con 10 µM del péptido nº 15 survivina (Figura 49B) o el péptido nº 6 de control (Figura 49A). La población NK se analizó con FACS. Aquellas células CD56⁺ no disminuyeron la intensidad de CFSE, que muestra que no son proliferantes
- 15 (no mostrado). Por tanto, se mostró que el péptido nº 15 mantenía la supervivencia de linfocitos NK CD3-CD56⁺.

Se entenderá que las realizaciones particulares mostradas en este documento se describen a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir una respuesta inmunitaria en un sujeto a una terapia inmunitaria con un agente que comprende una proteína antigénica de interés que comprende las etapas de:

- 5 cultivar células inmunitarias aisladas del sujeto con una agrupación de varios péptidos de una biblioteca de péptidos superpuestos de la proteína antigénica de interés;
analizar simultáneamente un sobrenadante de medio de cultivo del sujeto para múltiples parámetros de reactividad inmunitaria que comprende la especificidad y respuesta de citocinas de citocinas y quimiocinas, que permiten la identificación de fenotipos de células de tipo 1, tipo 2 y T-reguladoras para la agrupación de varios péptidos superpuestos;
- 10 determinar el tipo de respuesta inmunitaria basándose en la expresión de citocinas coordinadas en respuesta a los péptidos individuales en el medio de cultivo como indicador del desenlace del tratamiento.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la terapia es inmunoterapia tal como vacunación, inmunoterapia pasiva y transferencia de células adoptivas.

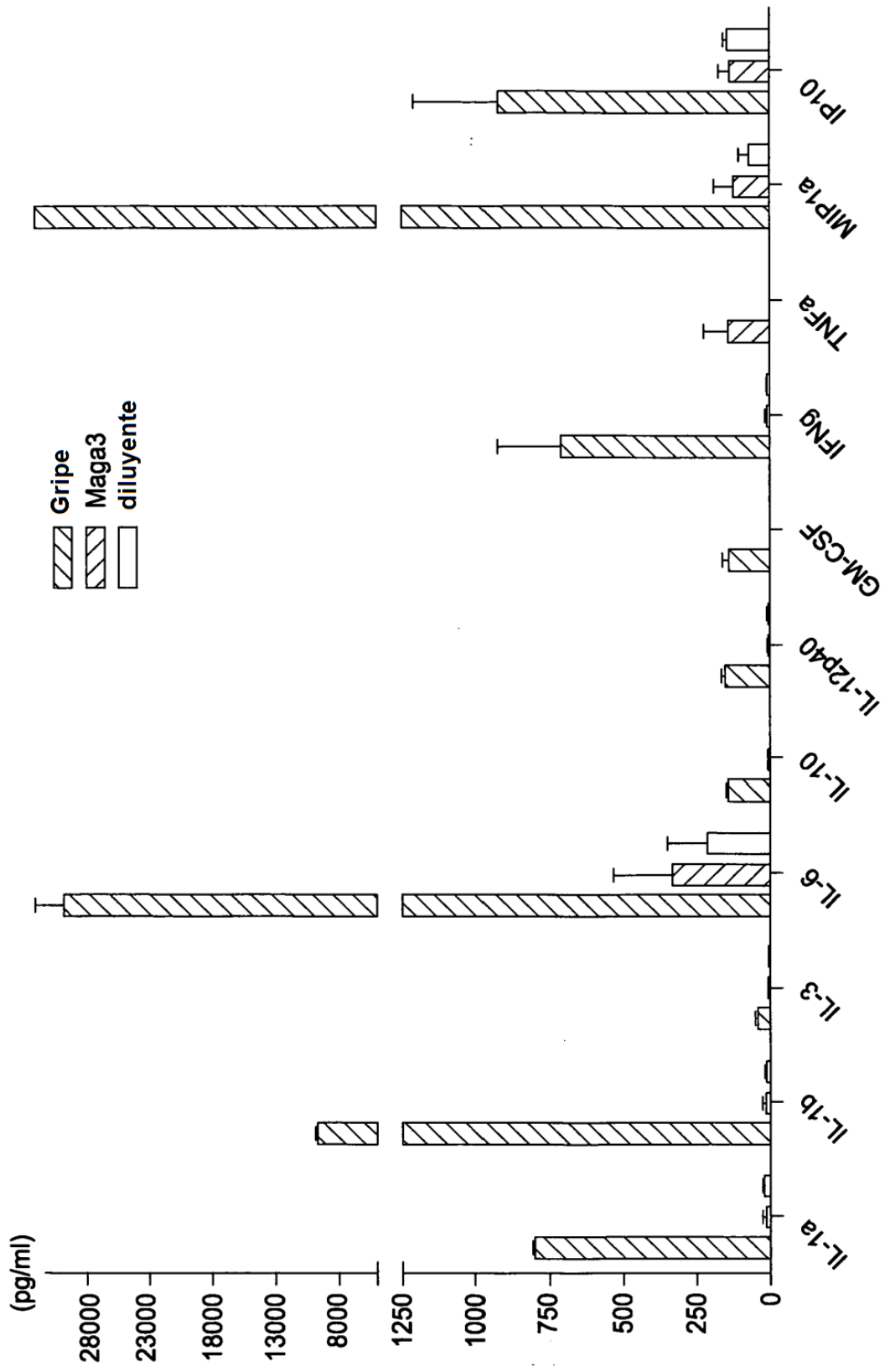


FIG. 1

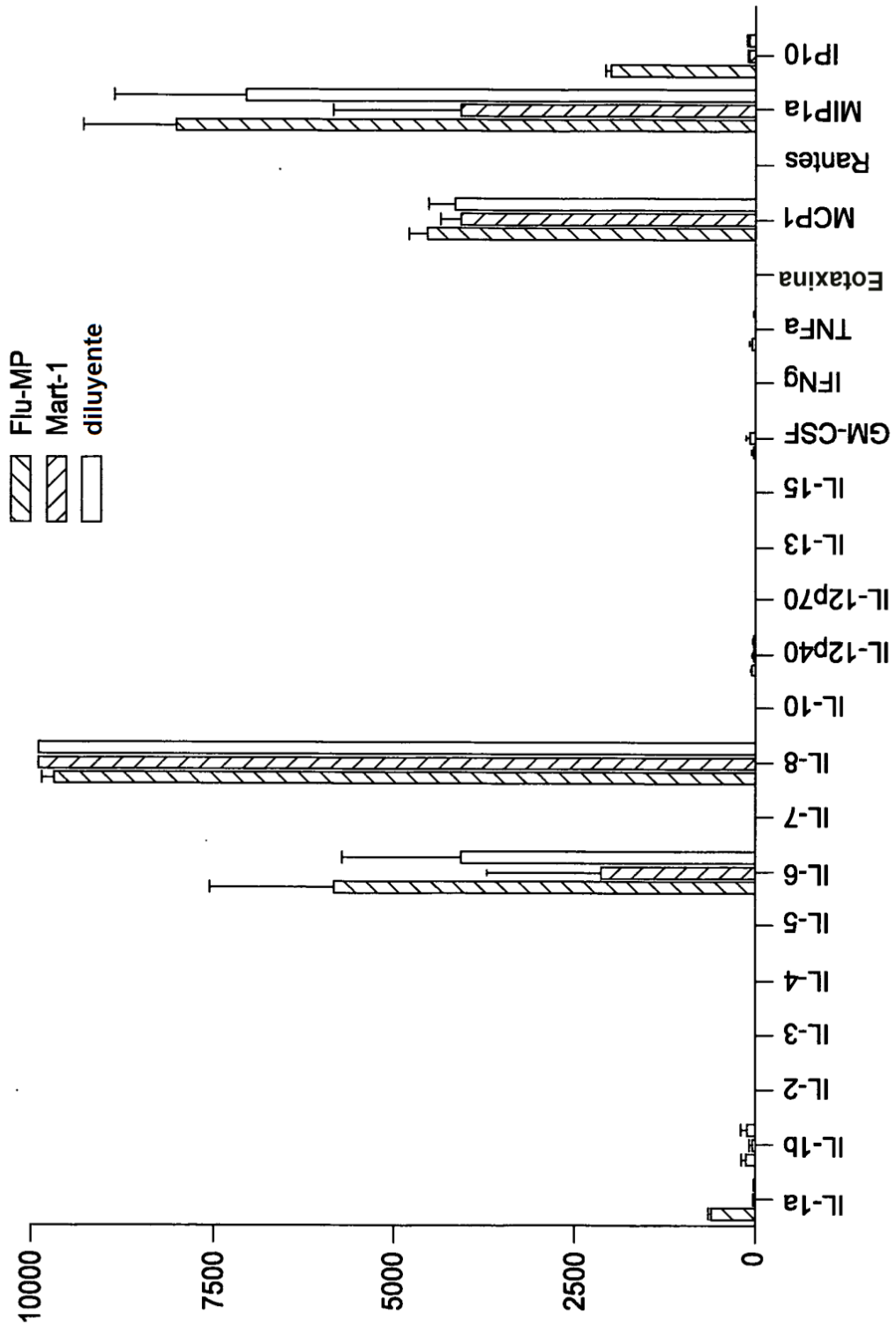


FIG. 2

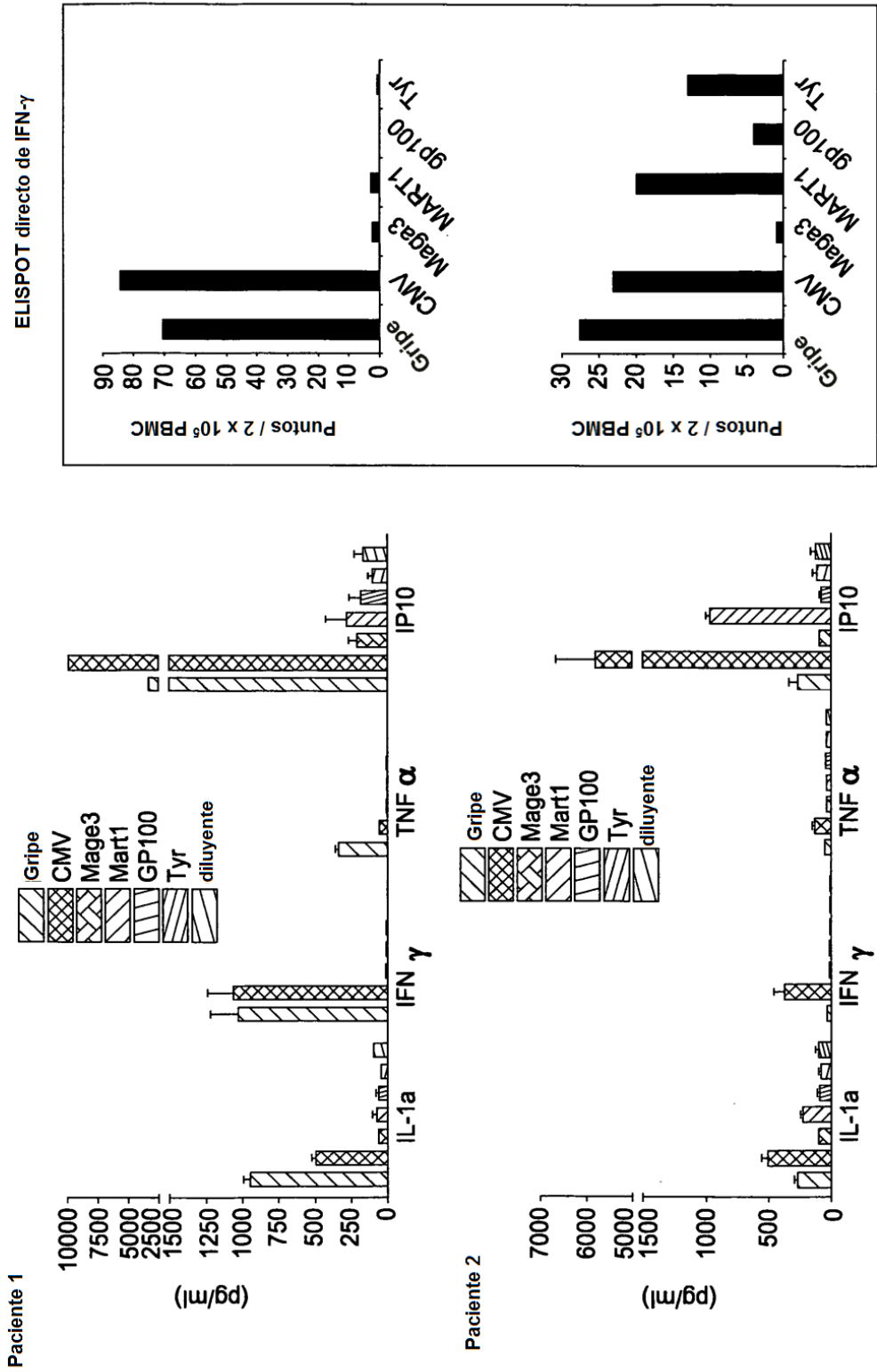


FIG. 3

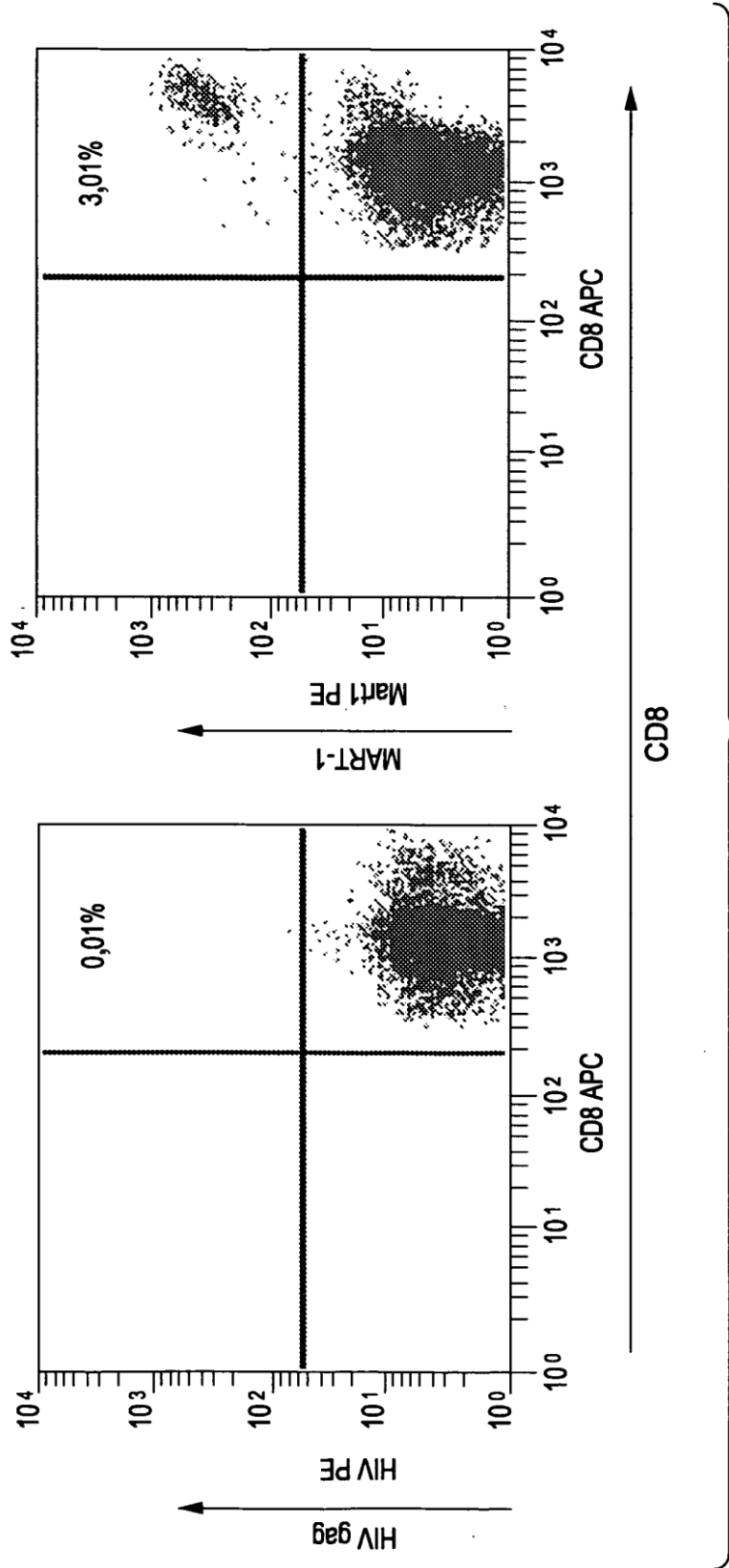


FIG. 4A

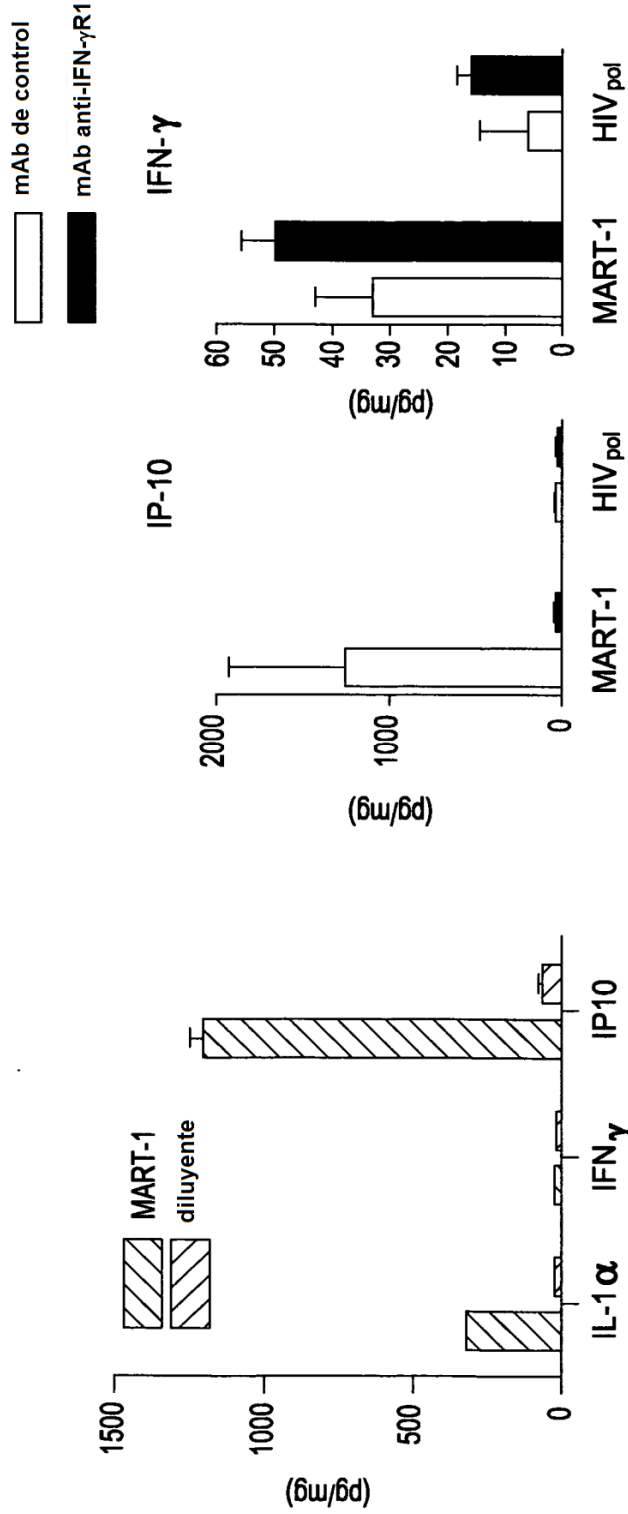


FIG. 4C

FIG. 4B

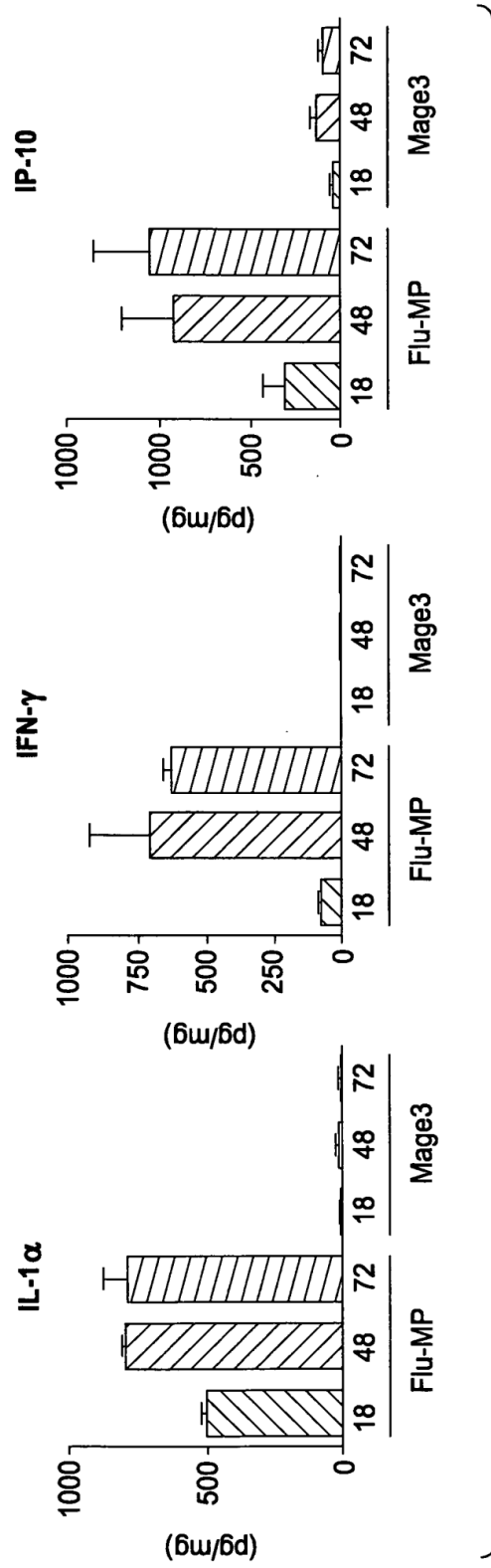
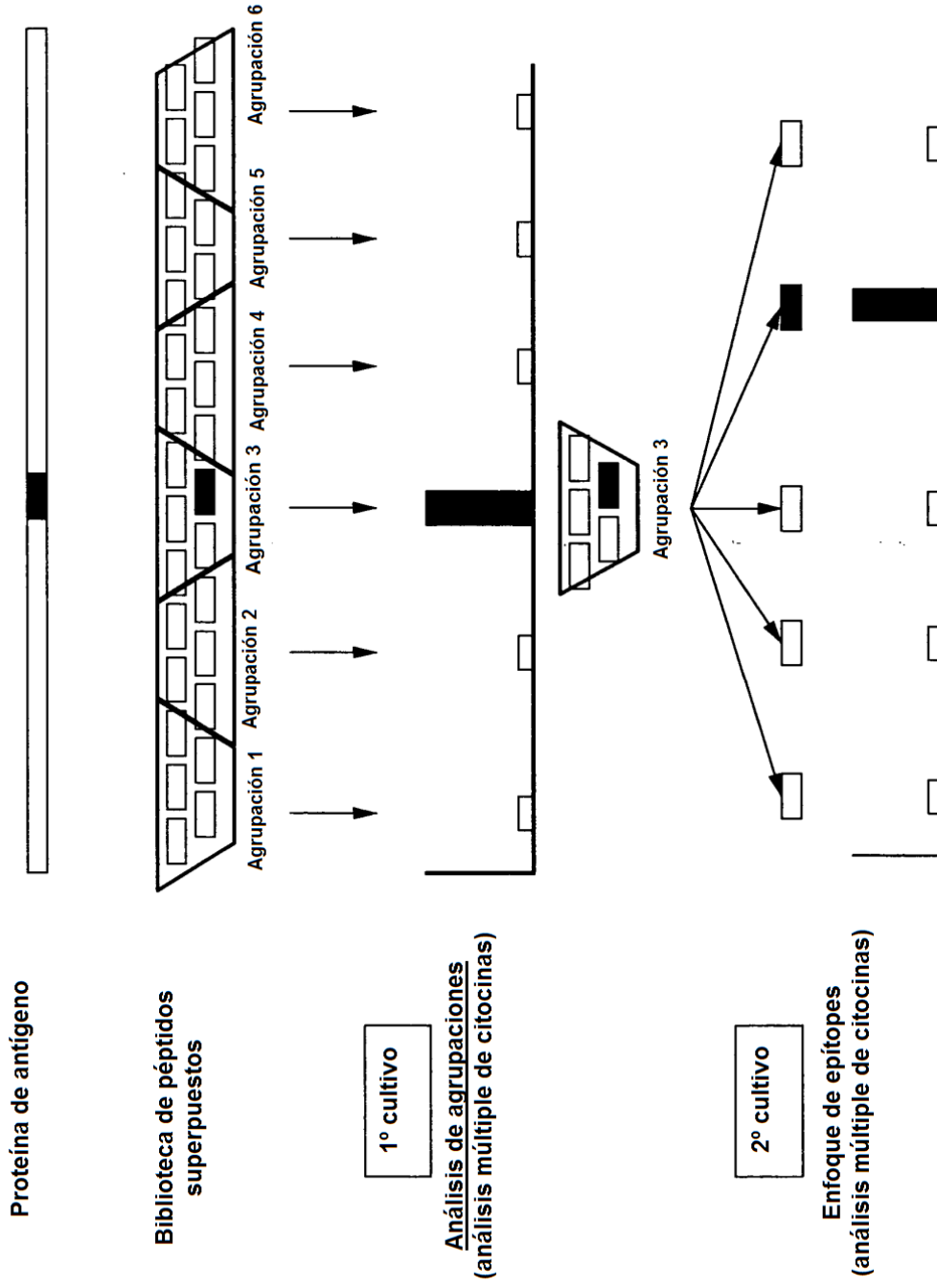


FIG. 5



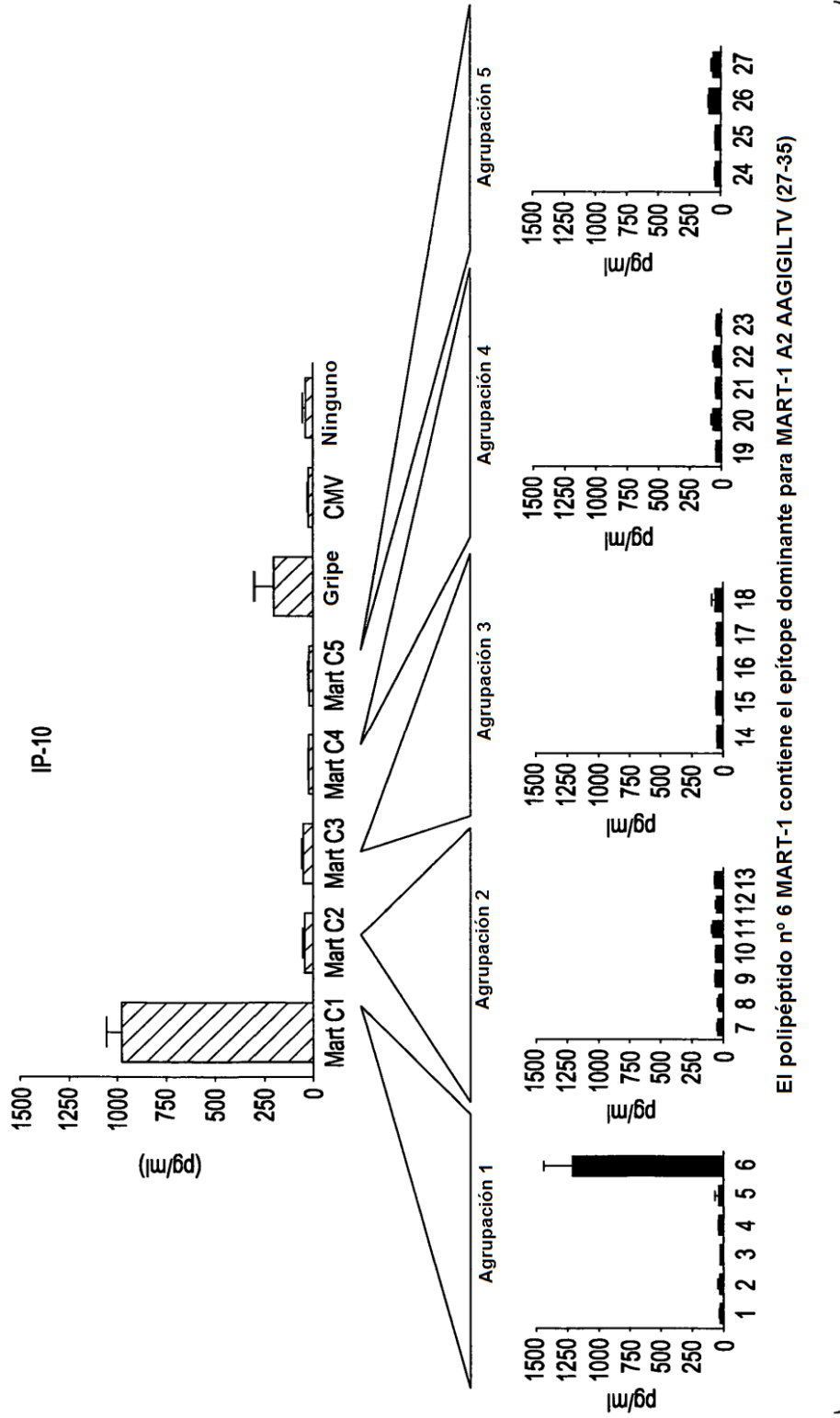


FIG. 7

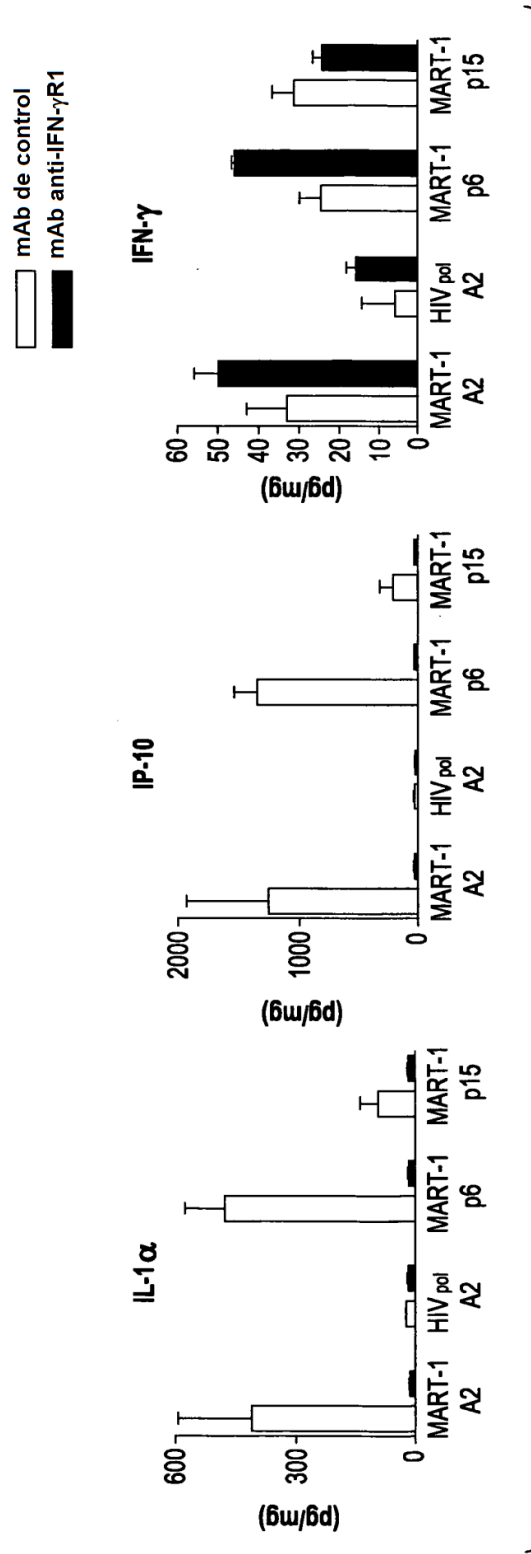


FIG. 8

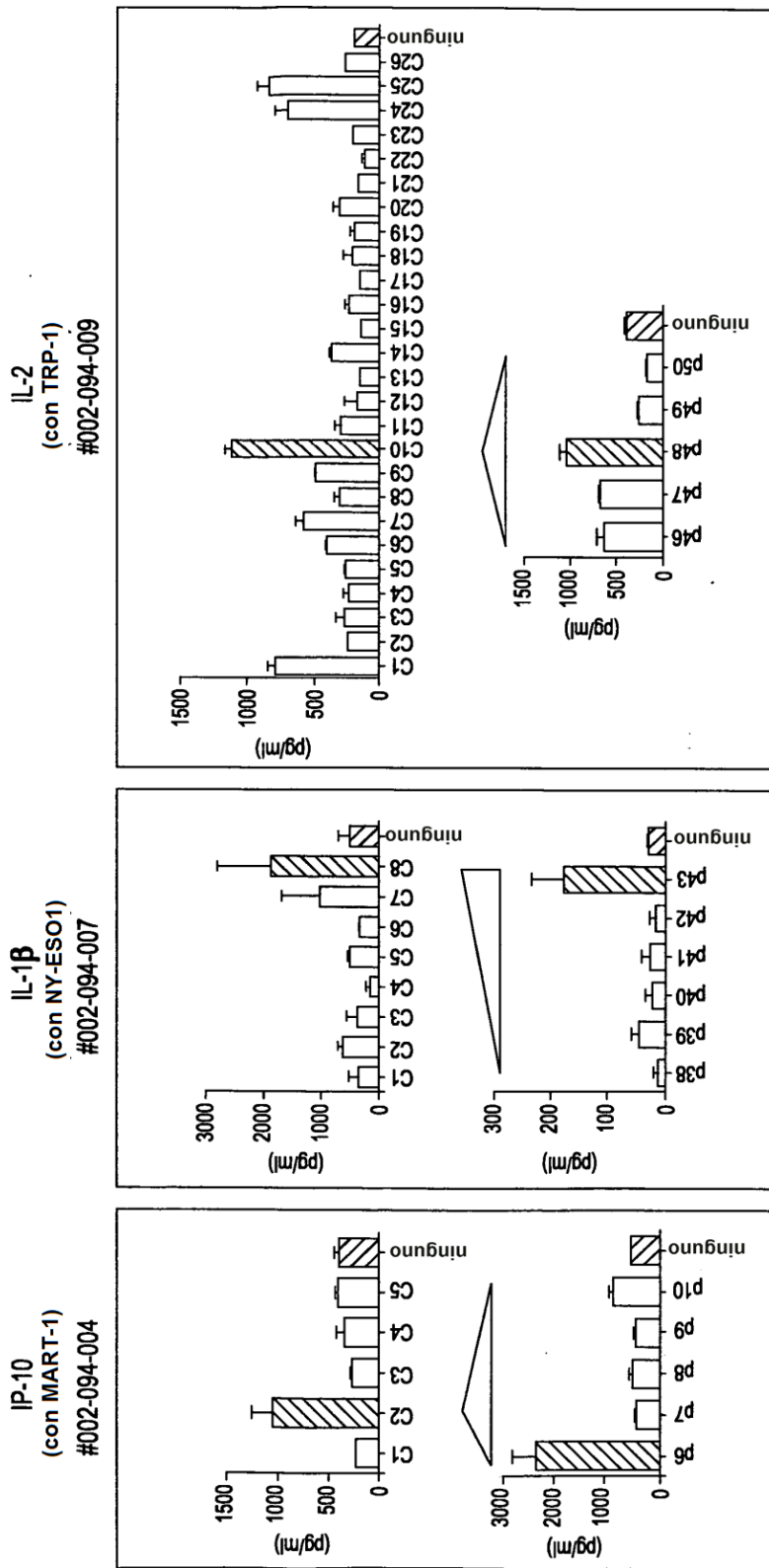


FIG. 9

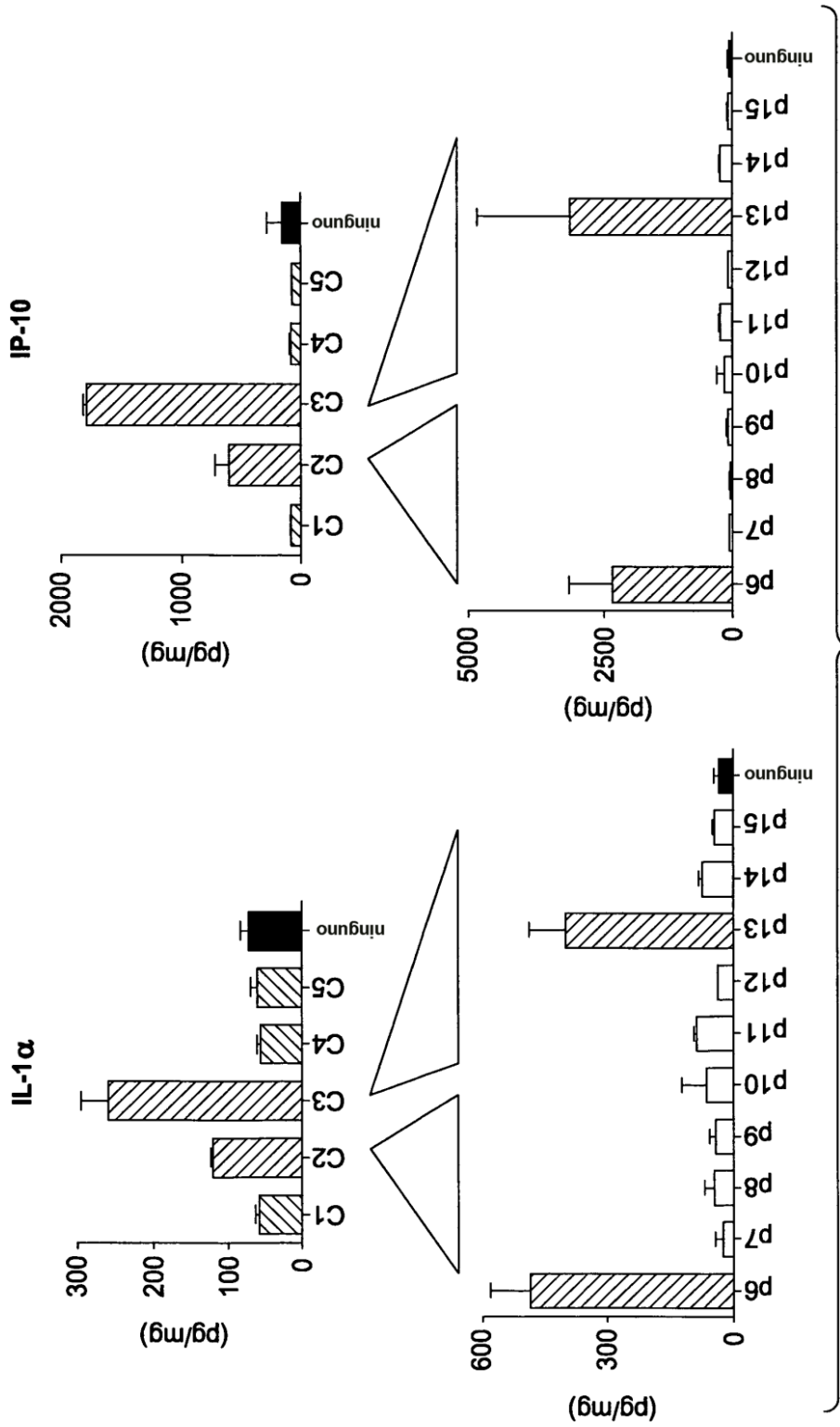
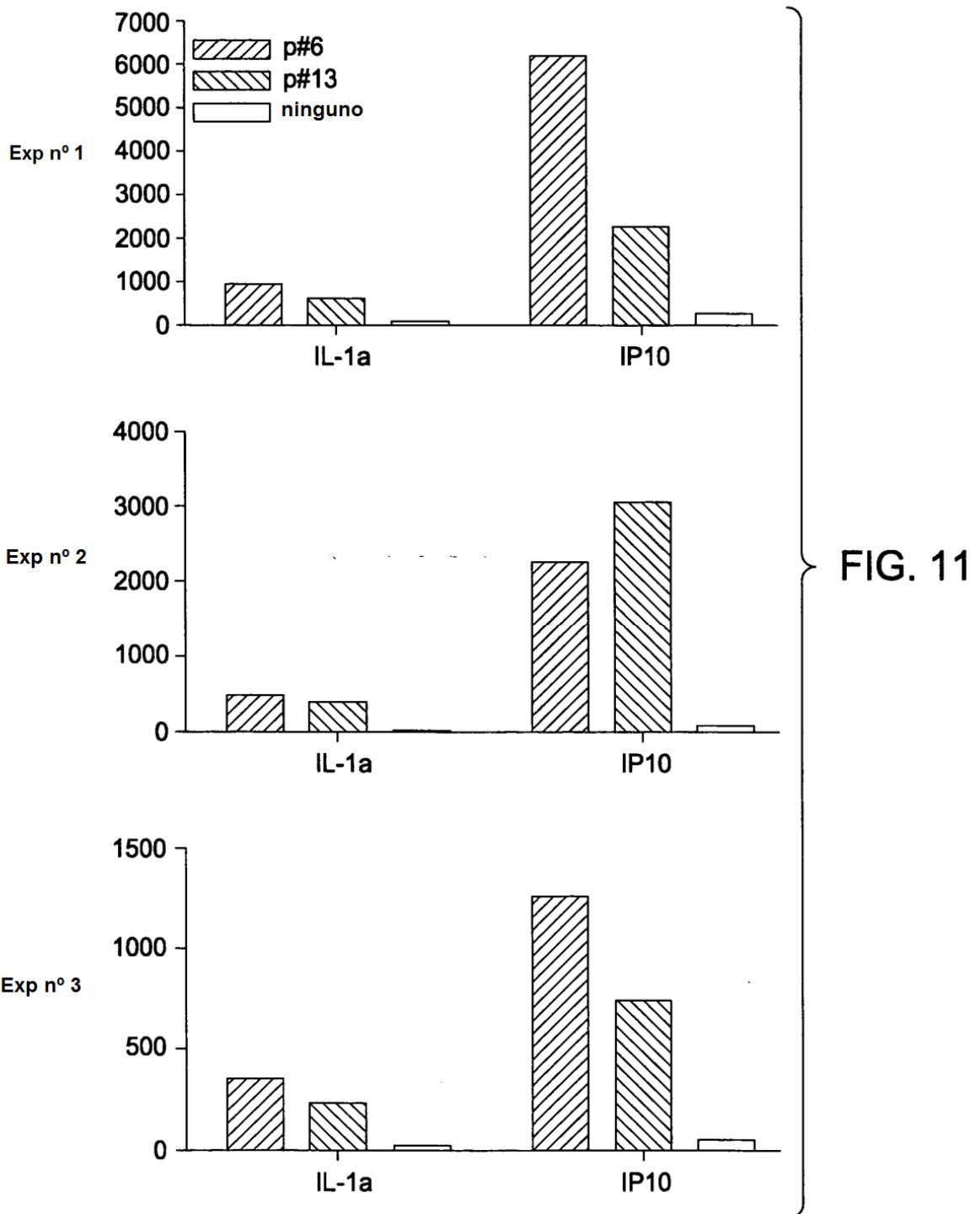


FIG. 10



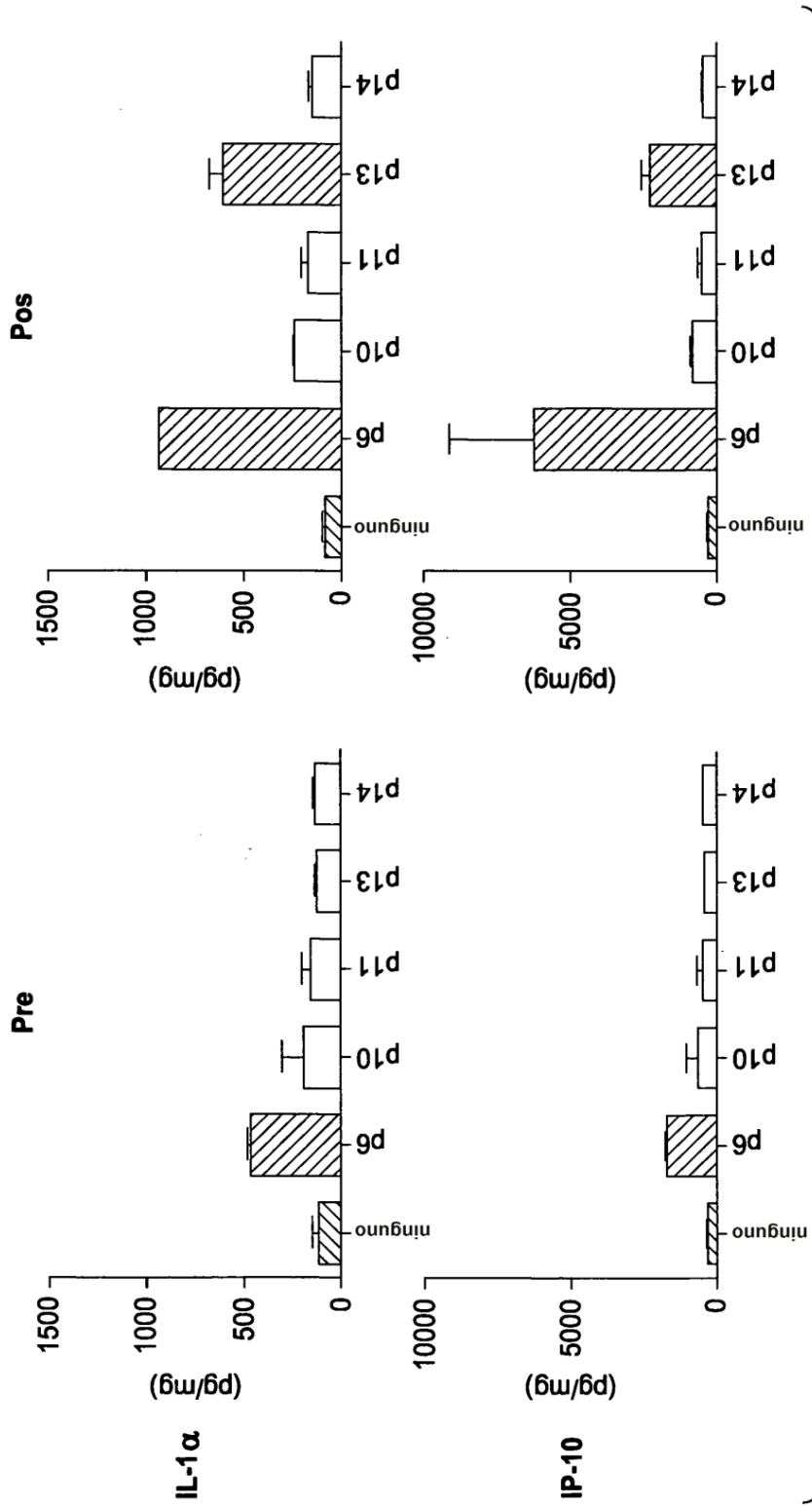


FIG. 12A

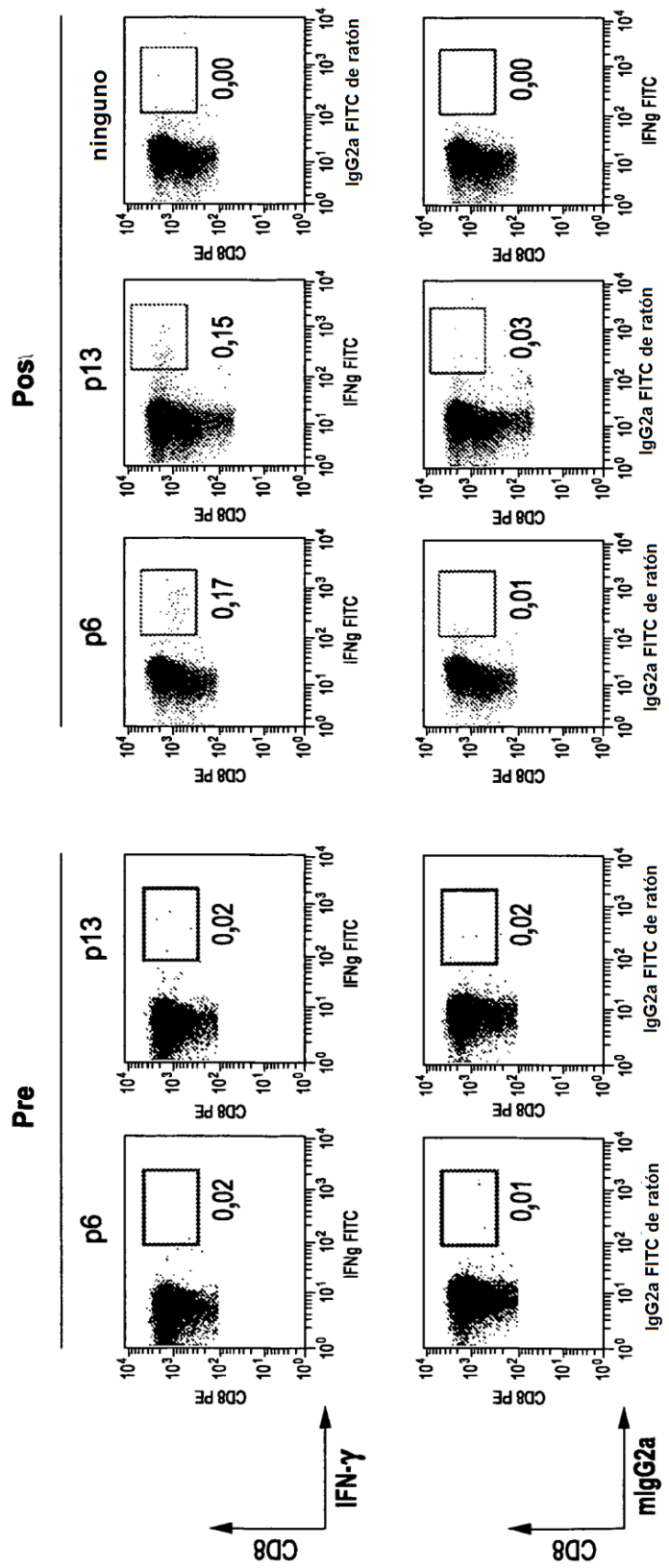


FIG. 12B

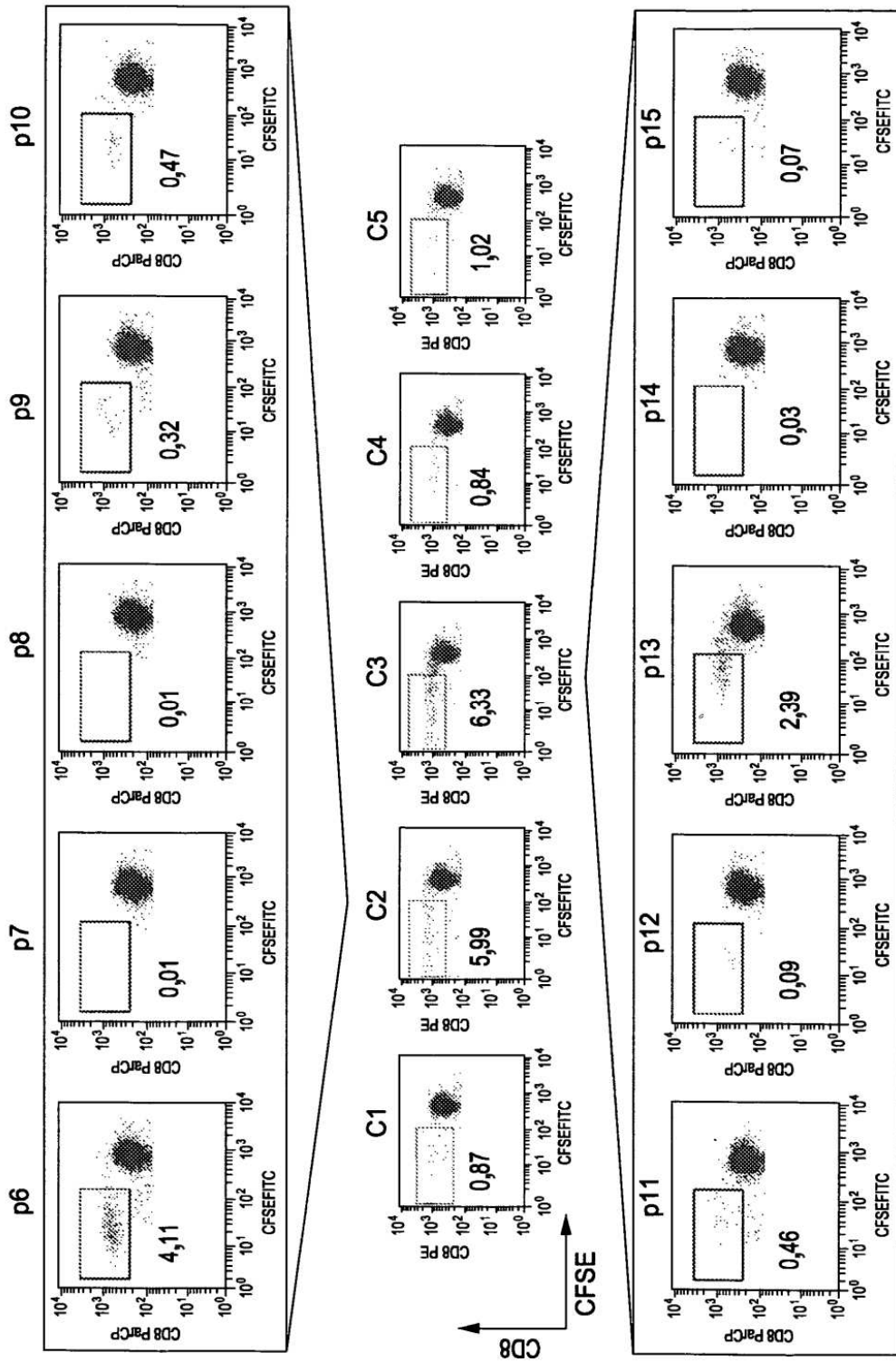


FIG. 13

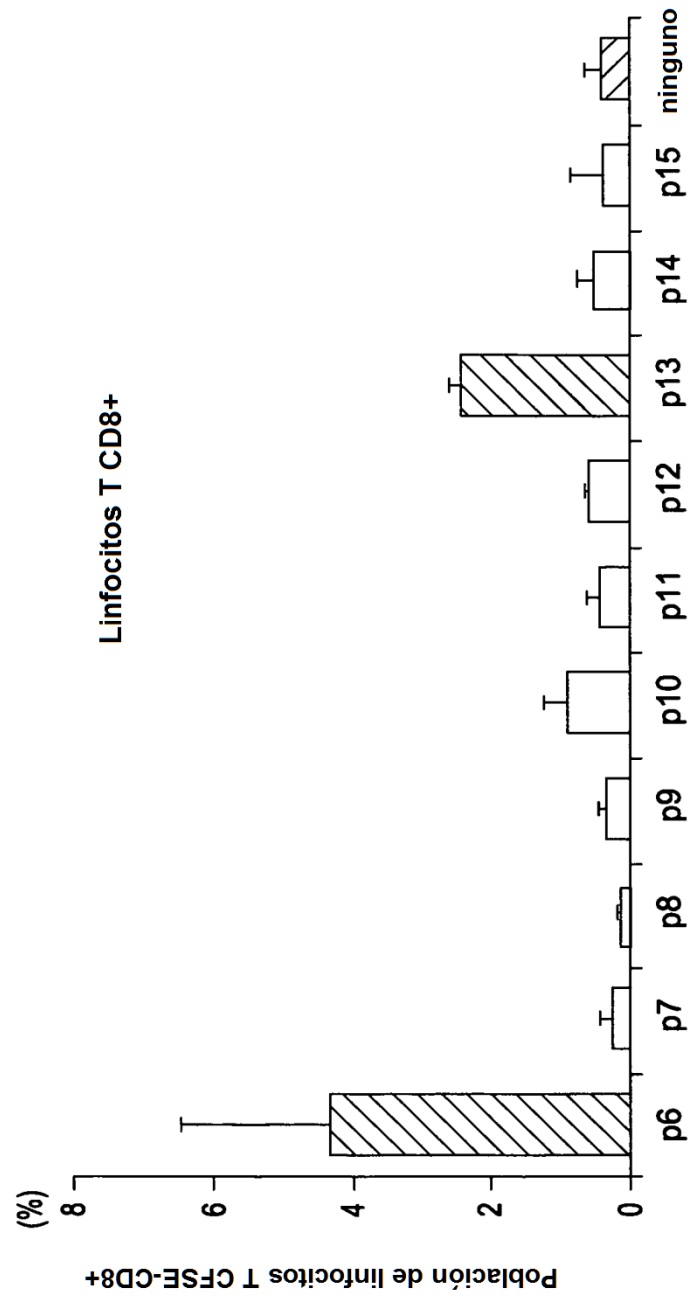


FIG. 14

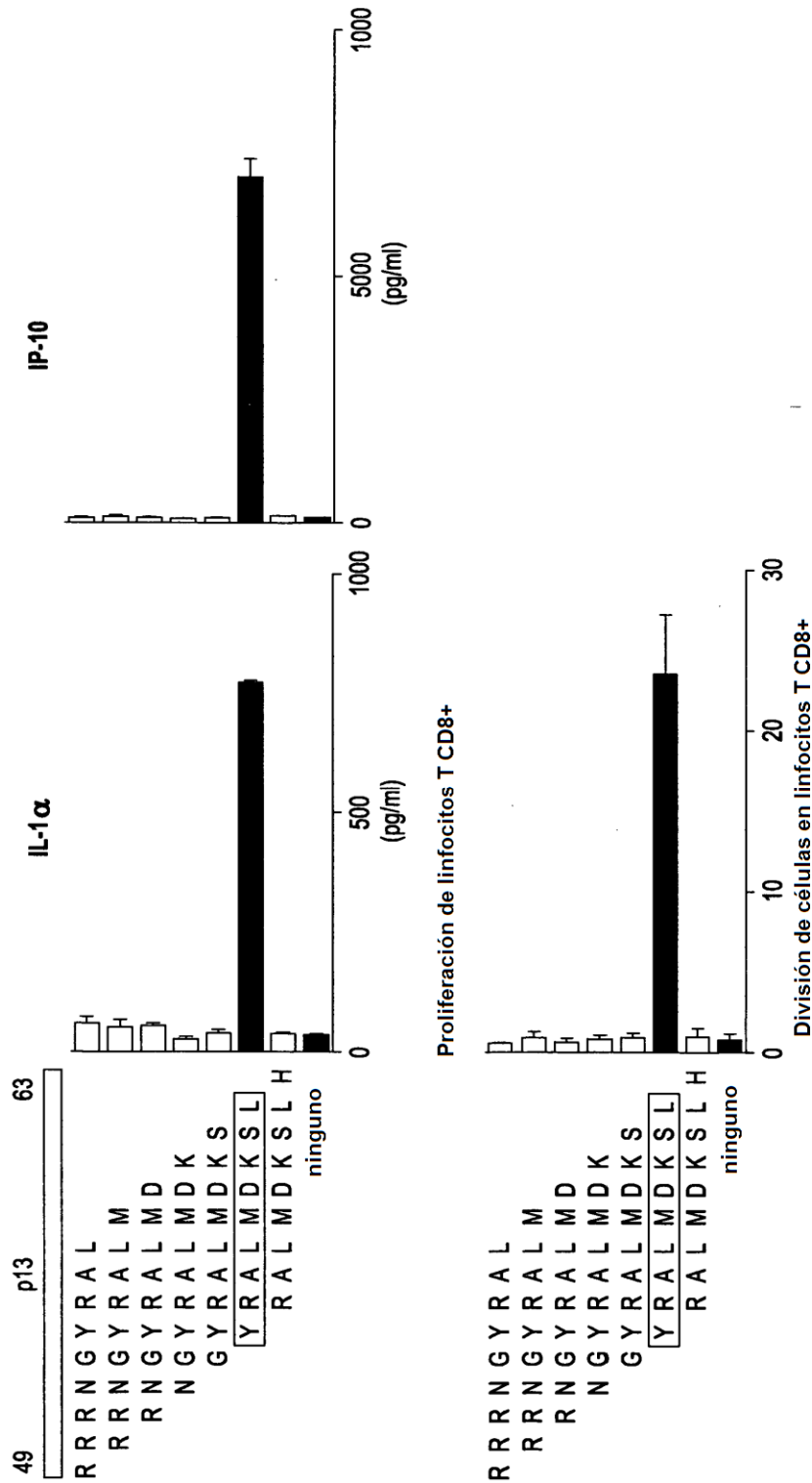


FIG. 15

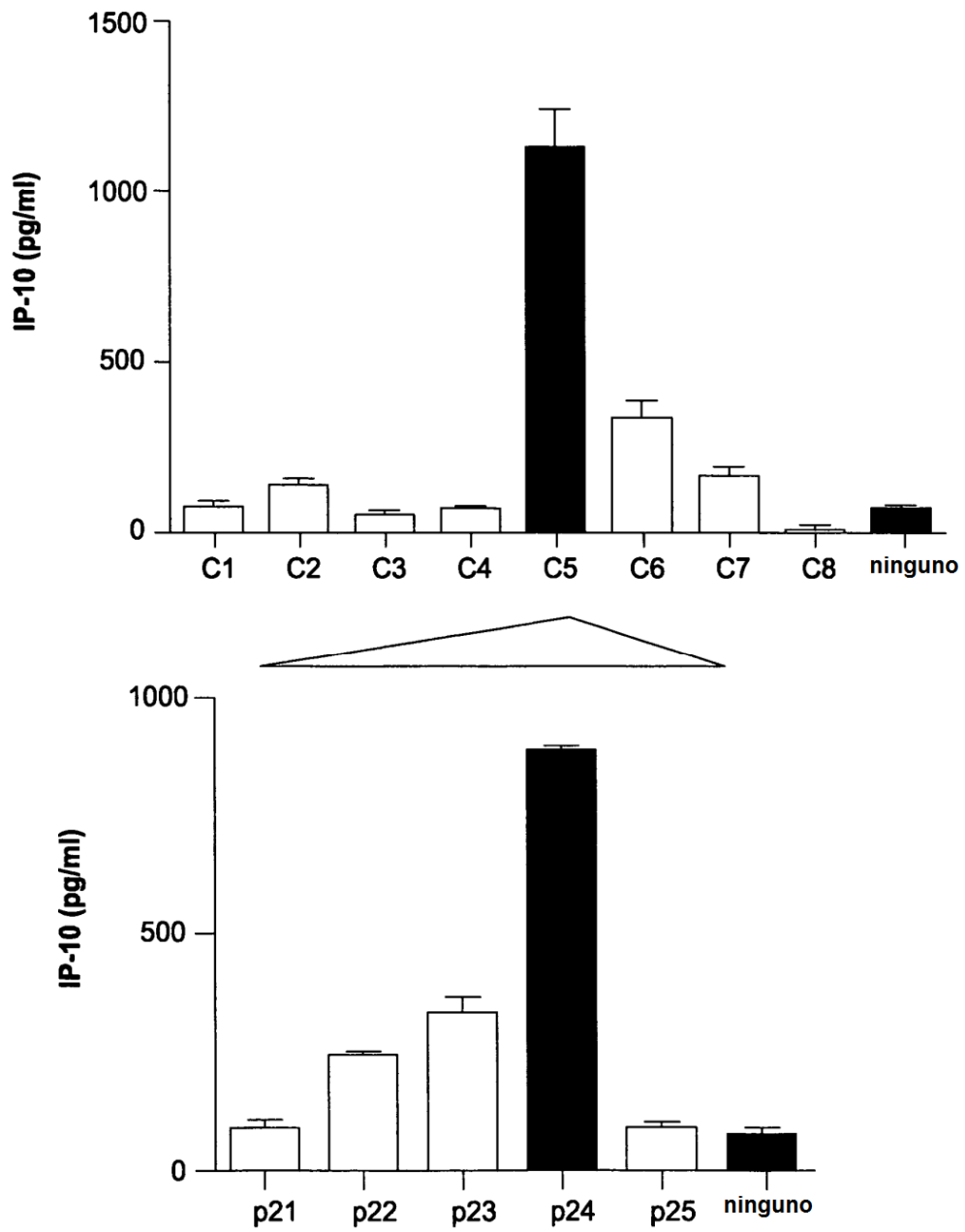


FIG. 16A

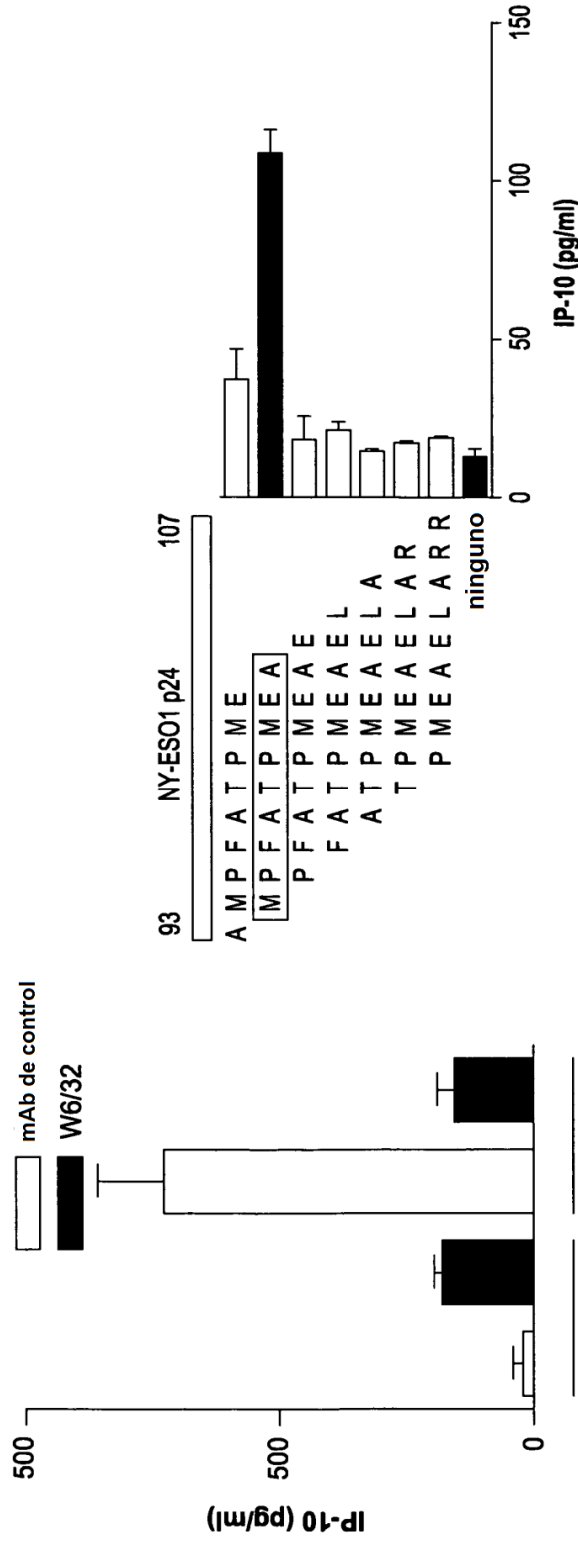


FIG. 16B

FIG. 16C

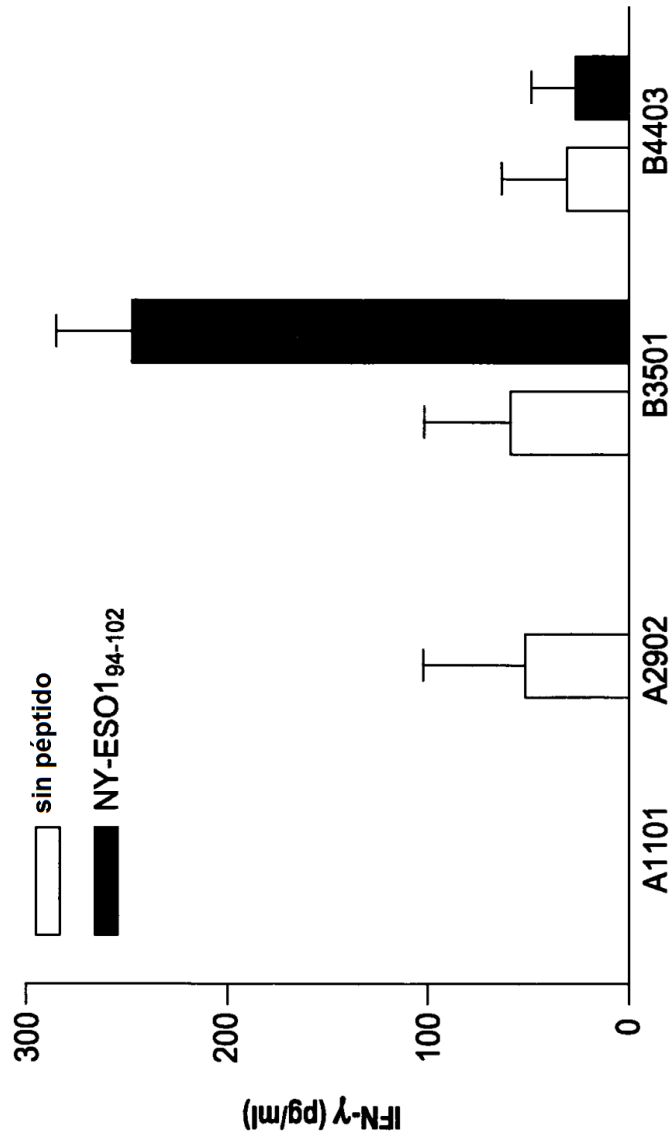


FIG. 16D

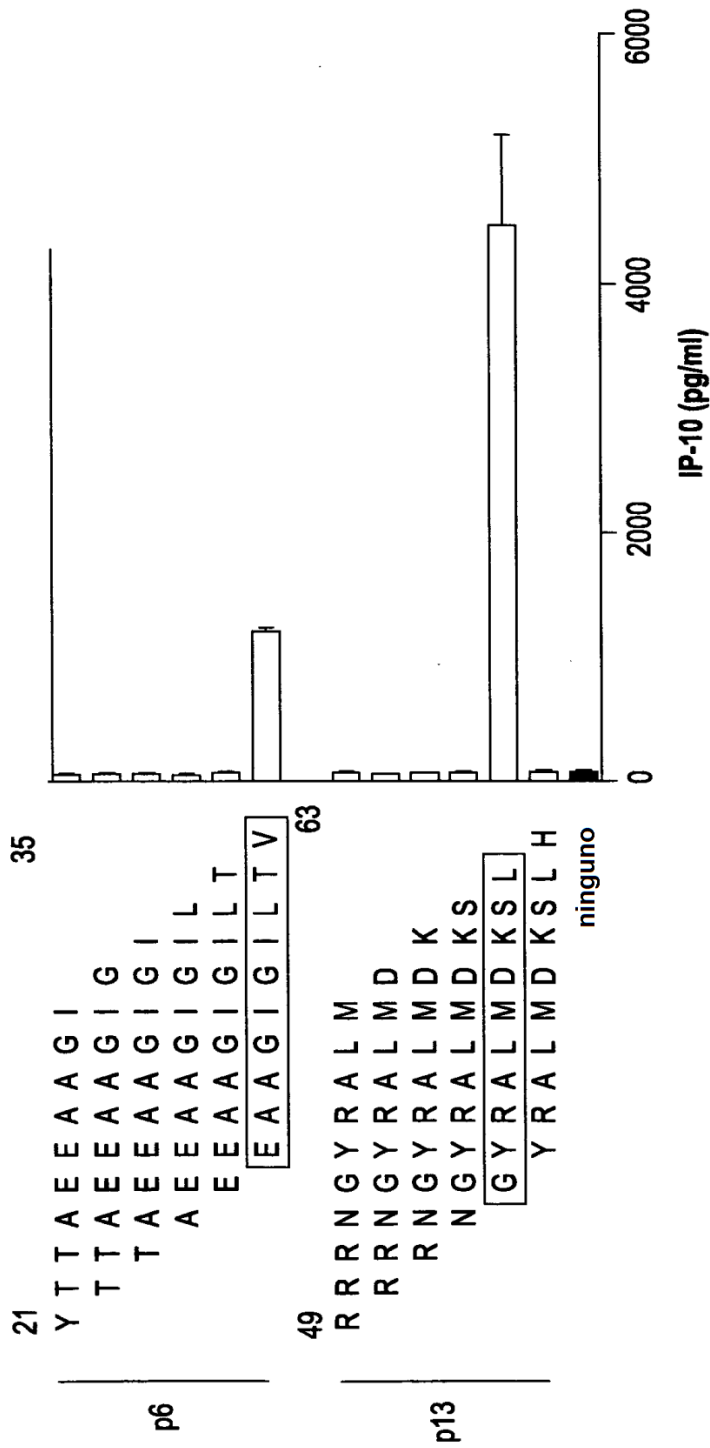


FIG. 17

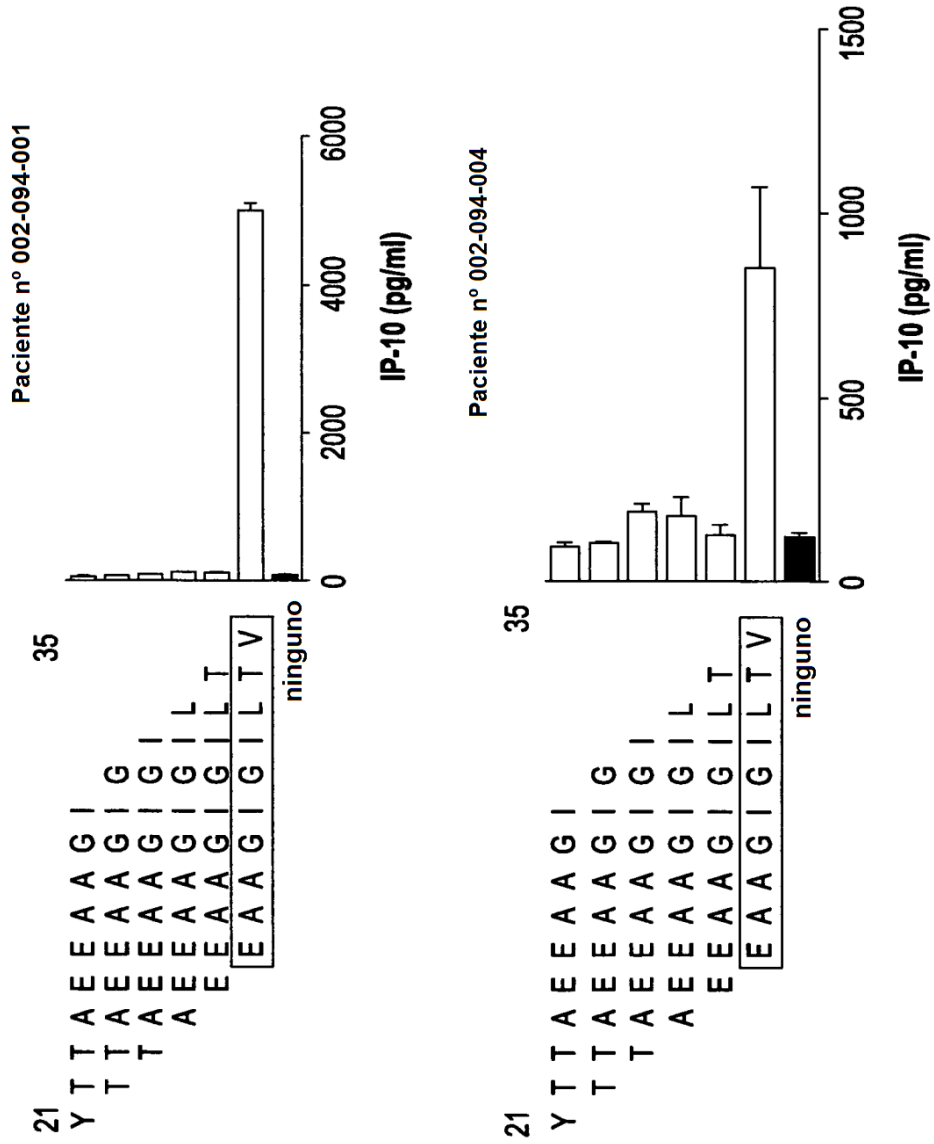


FIG. 18

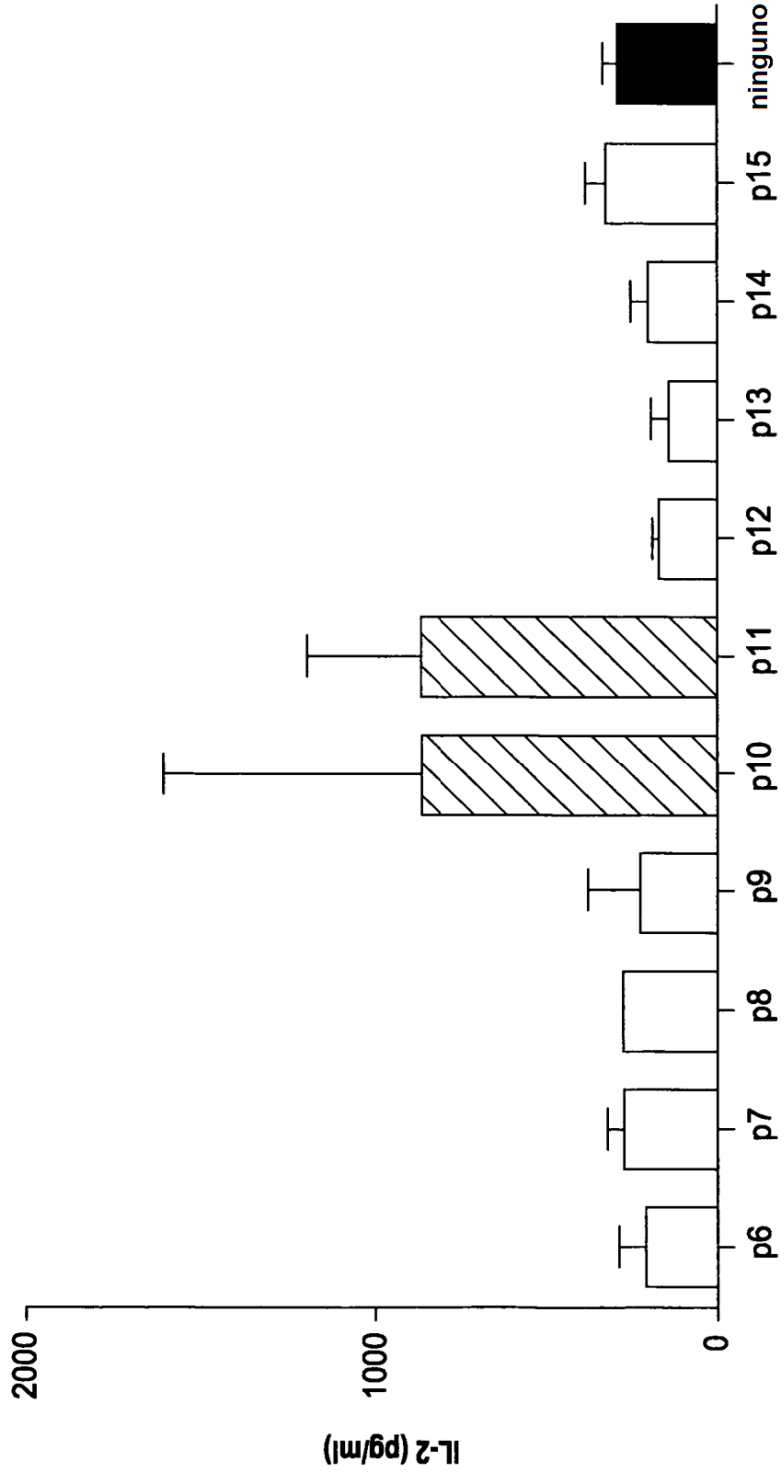


FIG. 19

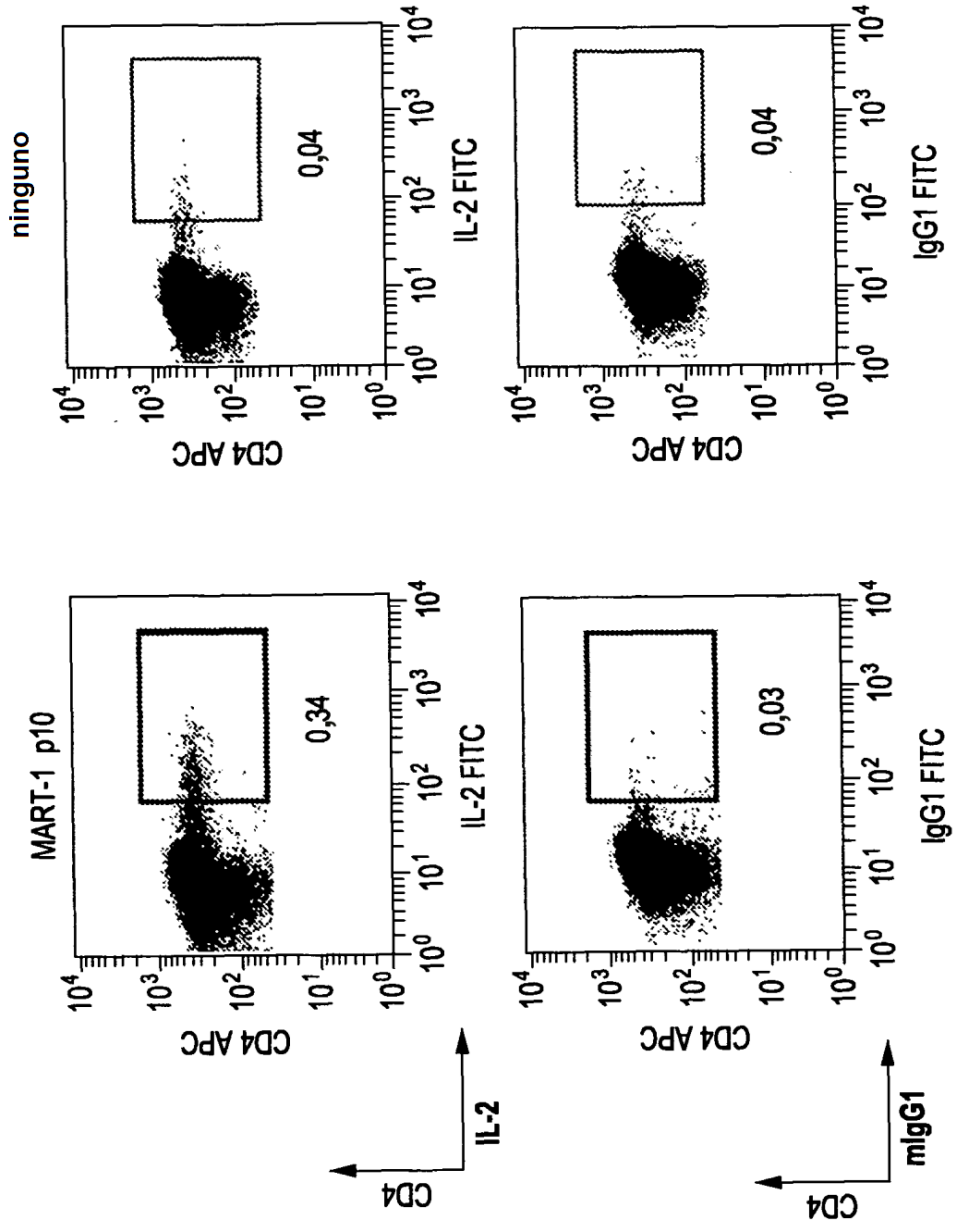


FIG. 20

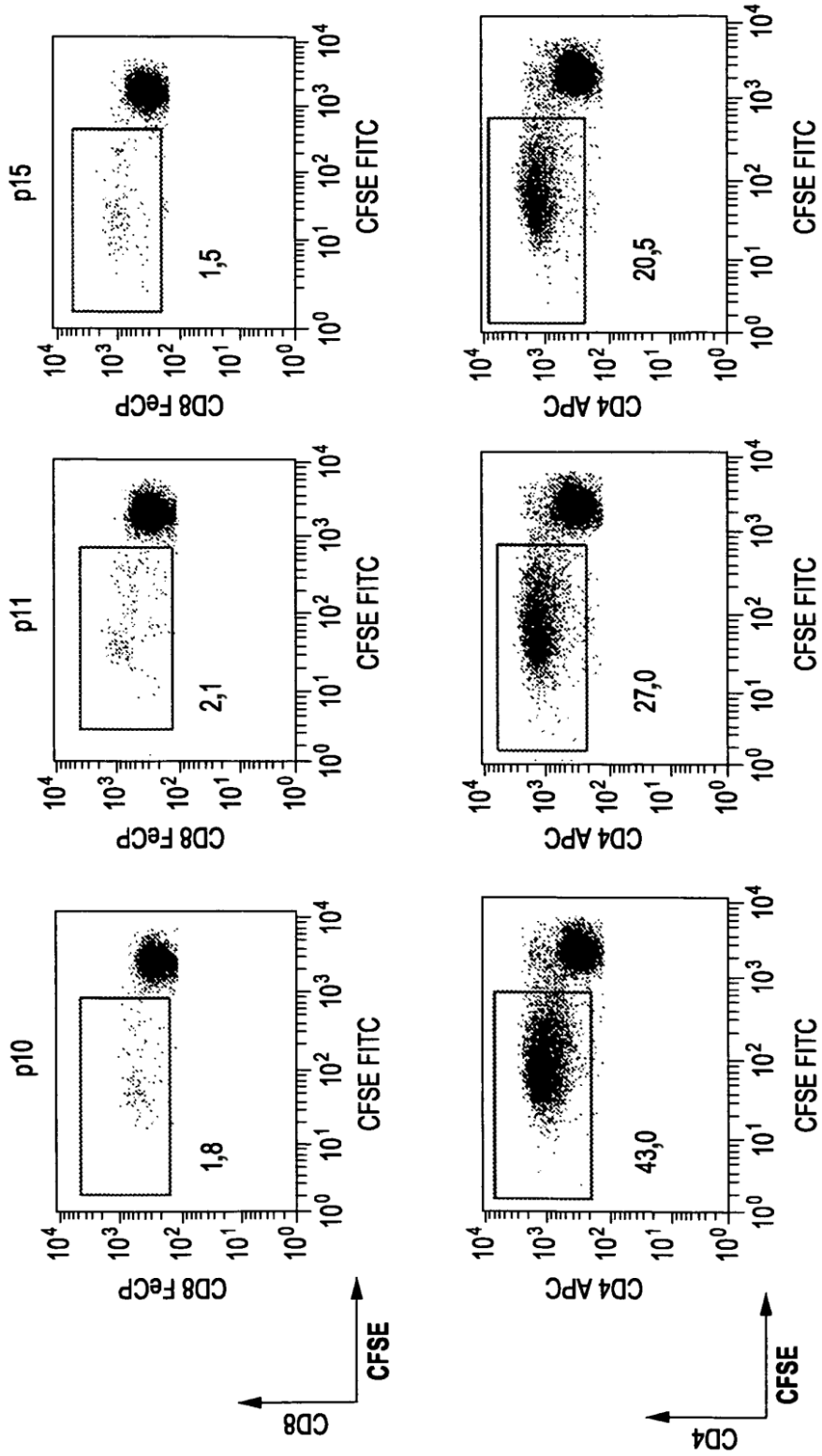


FIG. 21A

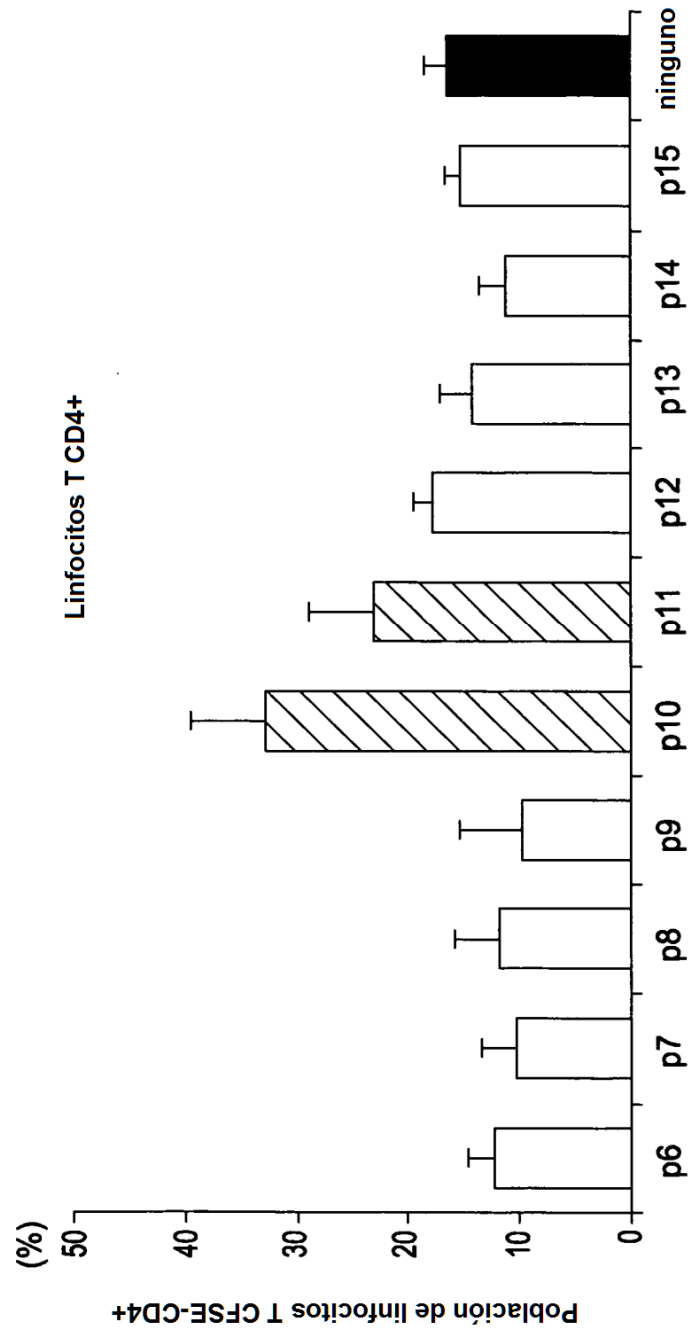


FIG. 21B

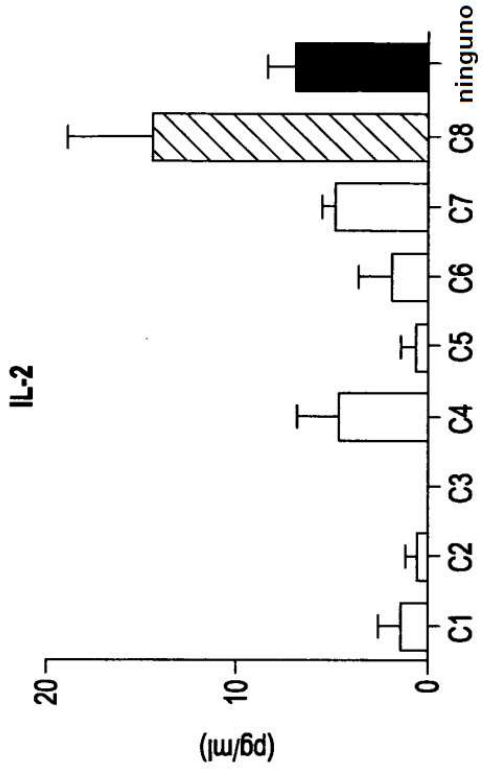
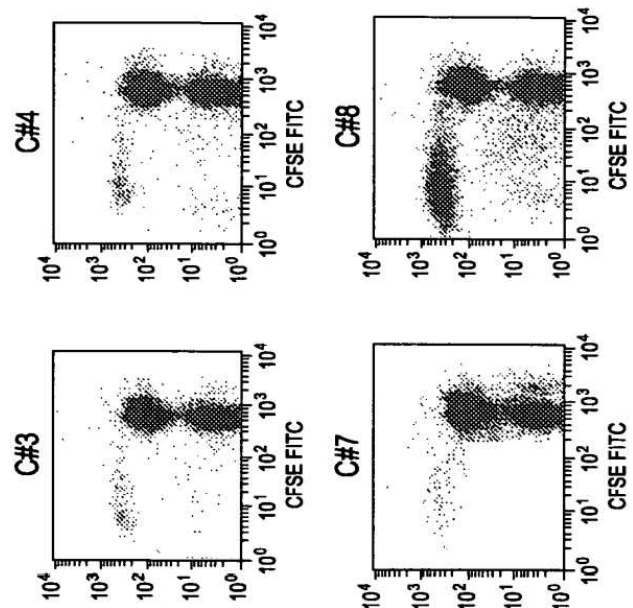
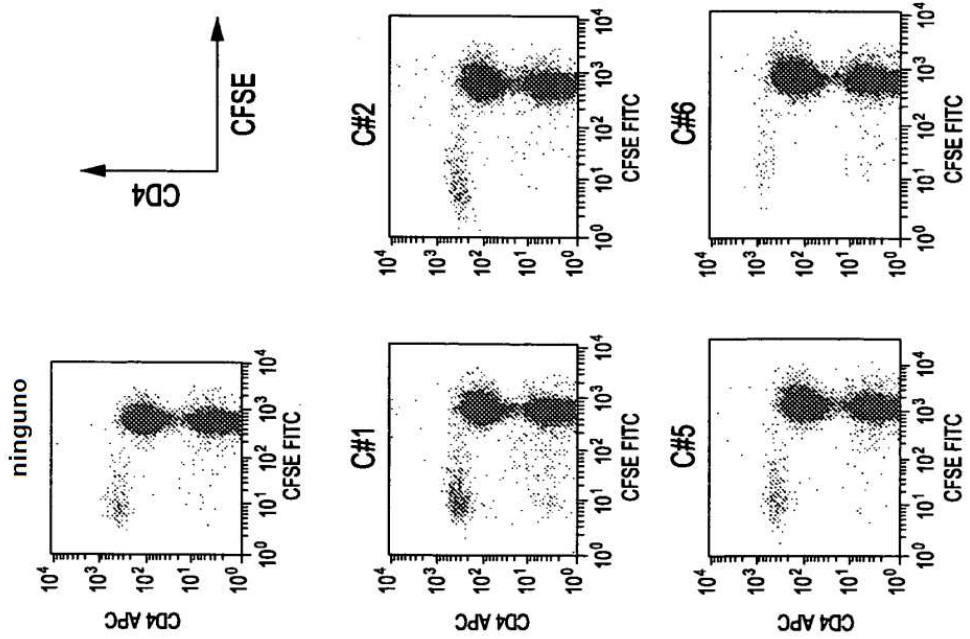


FIG. 22B

FIG. 22A



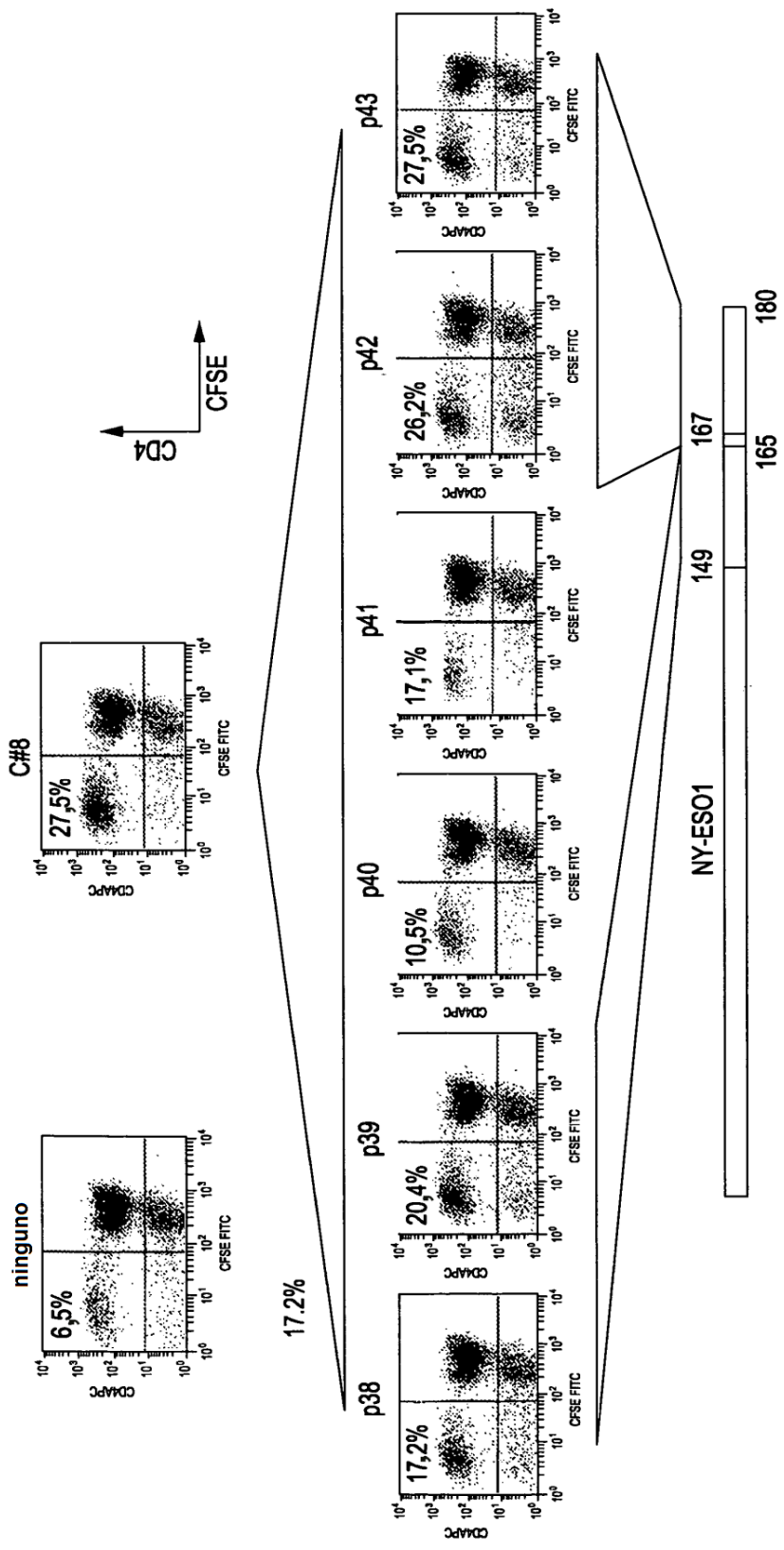


FIG. 22C

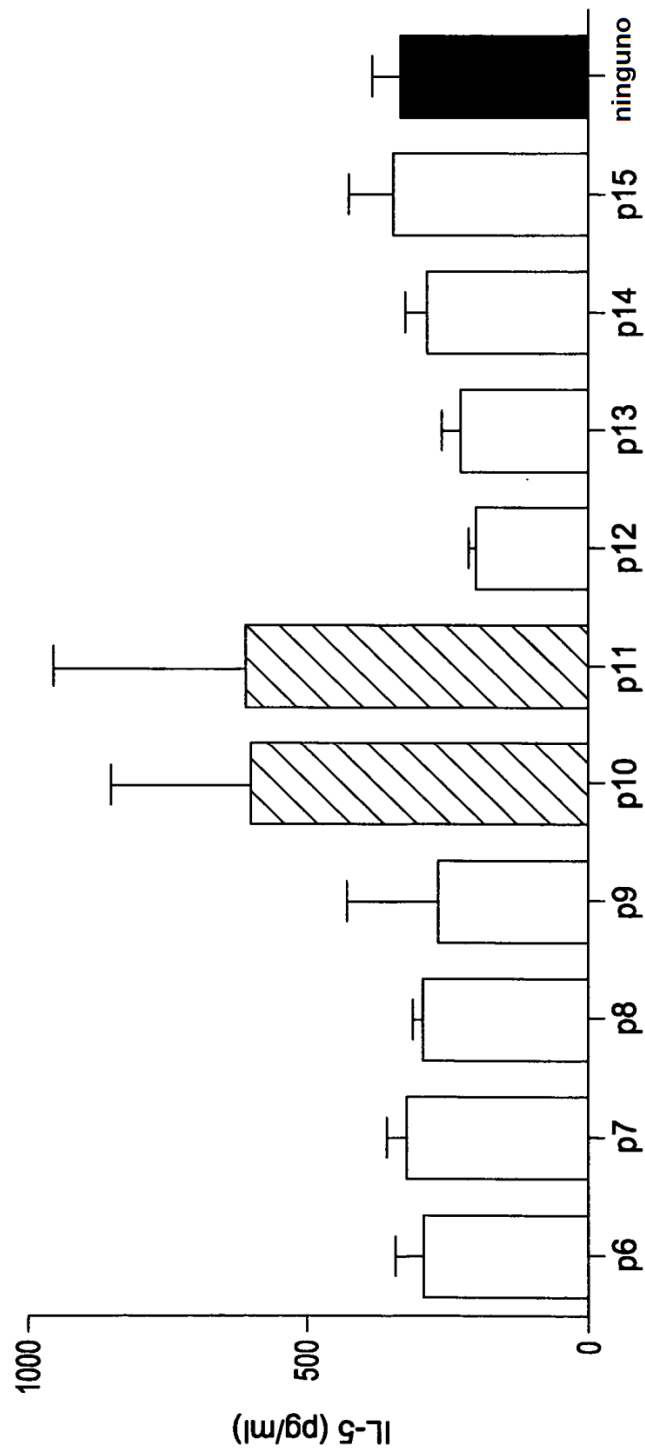


FIG. 23

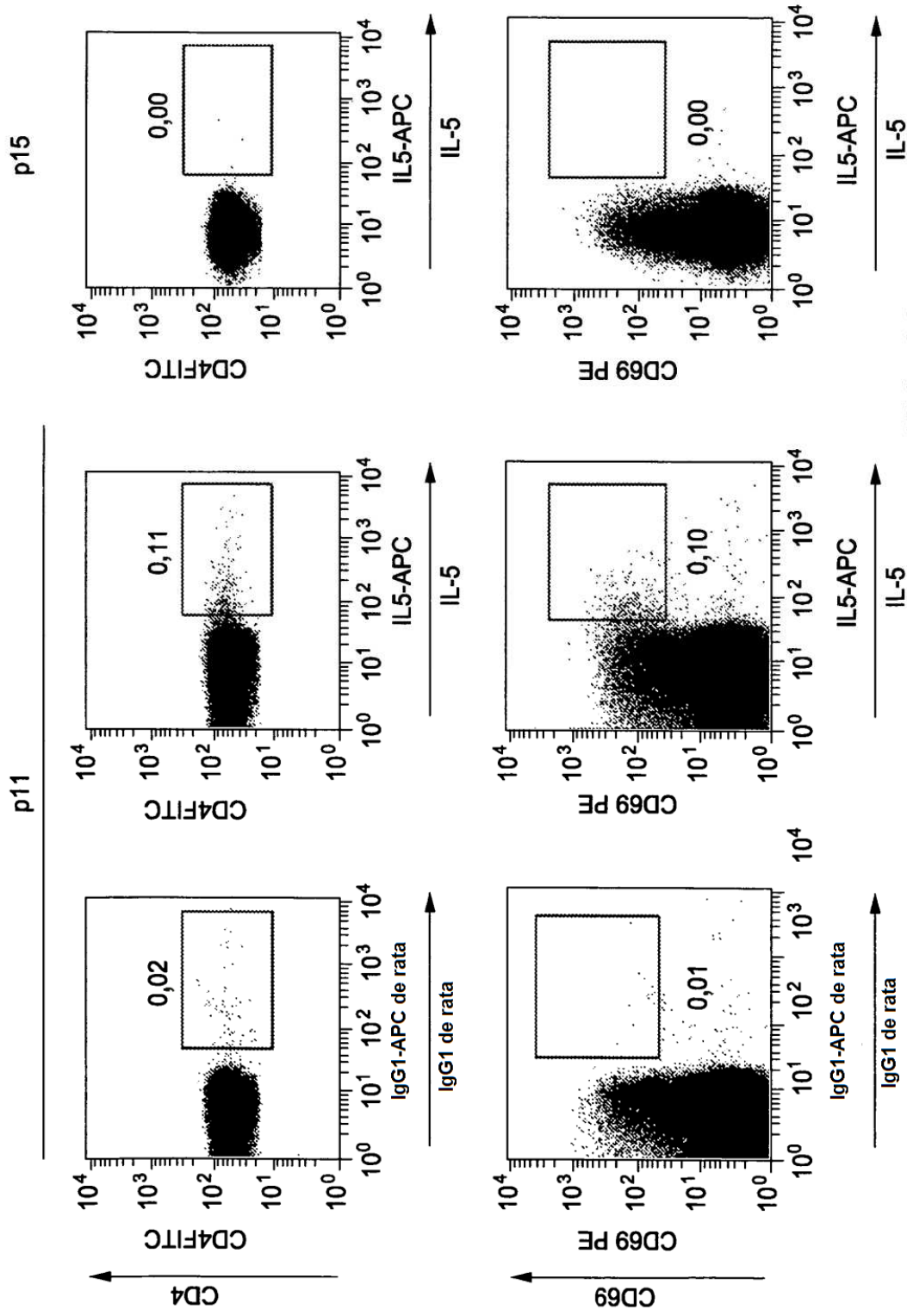
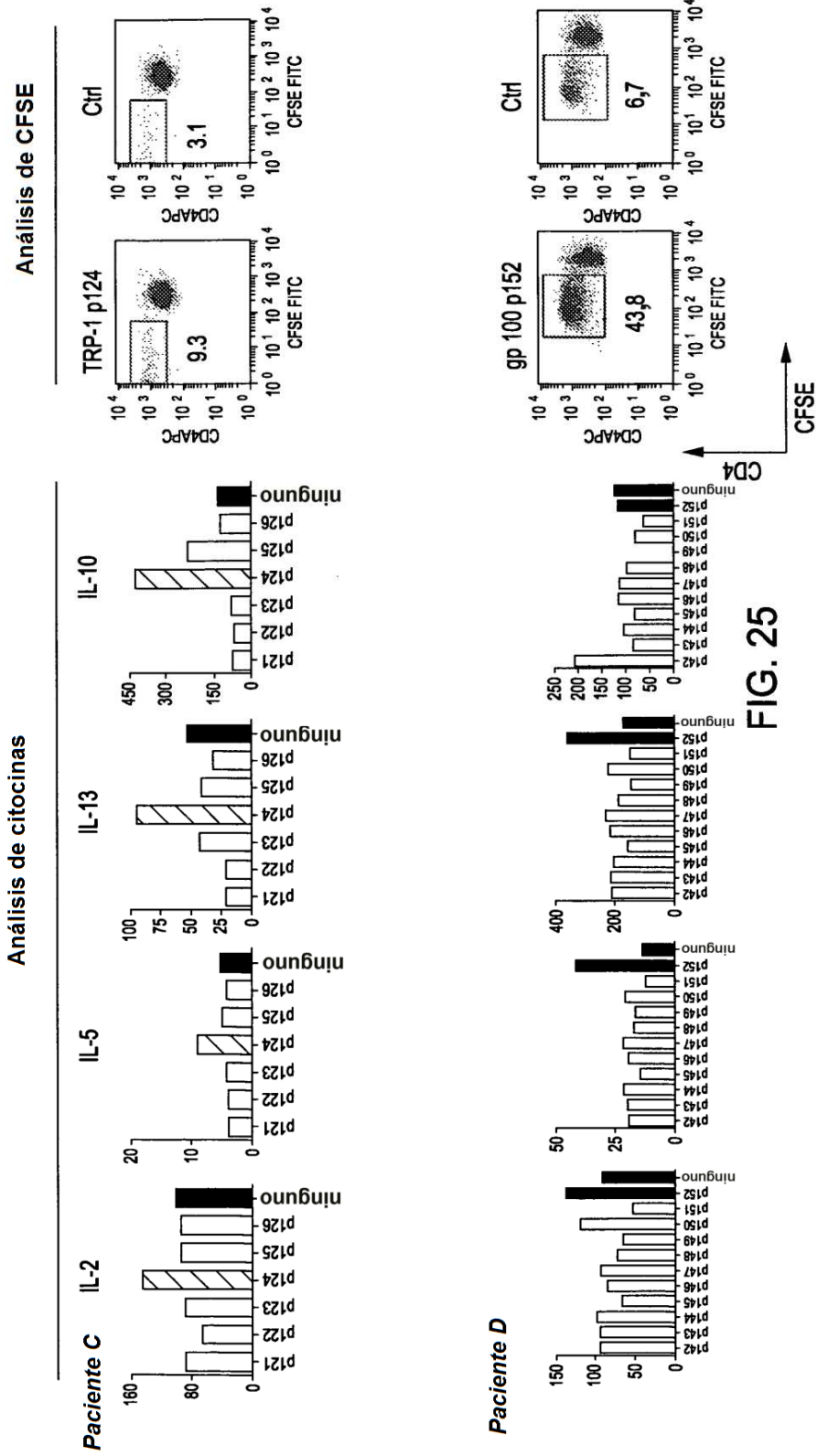


FIG. 24



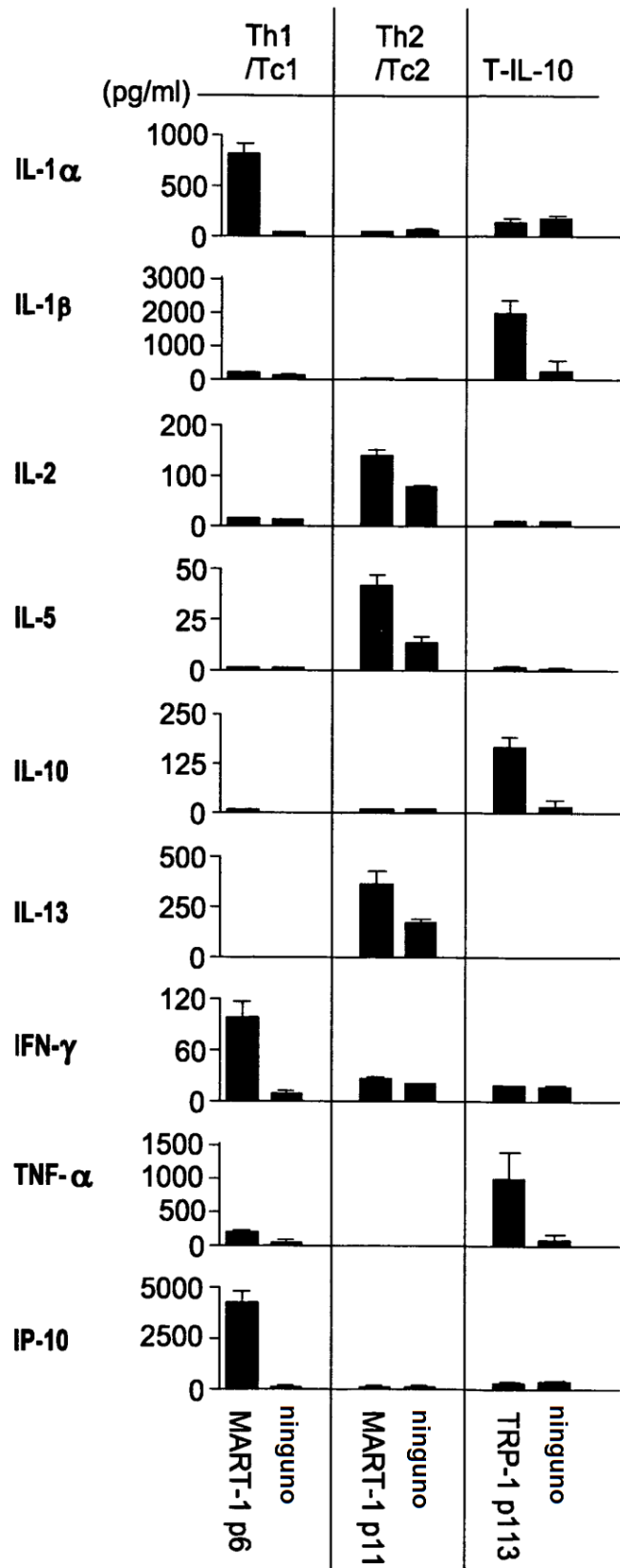


FIG. 26

Epítopes novedosos identificados con EPIMAX

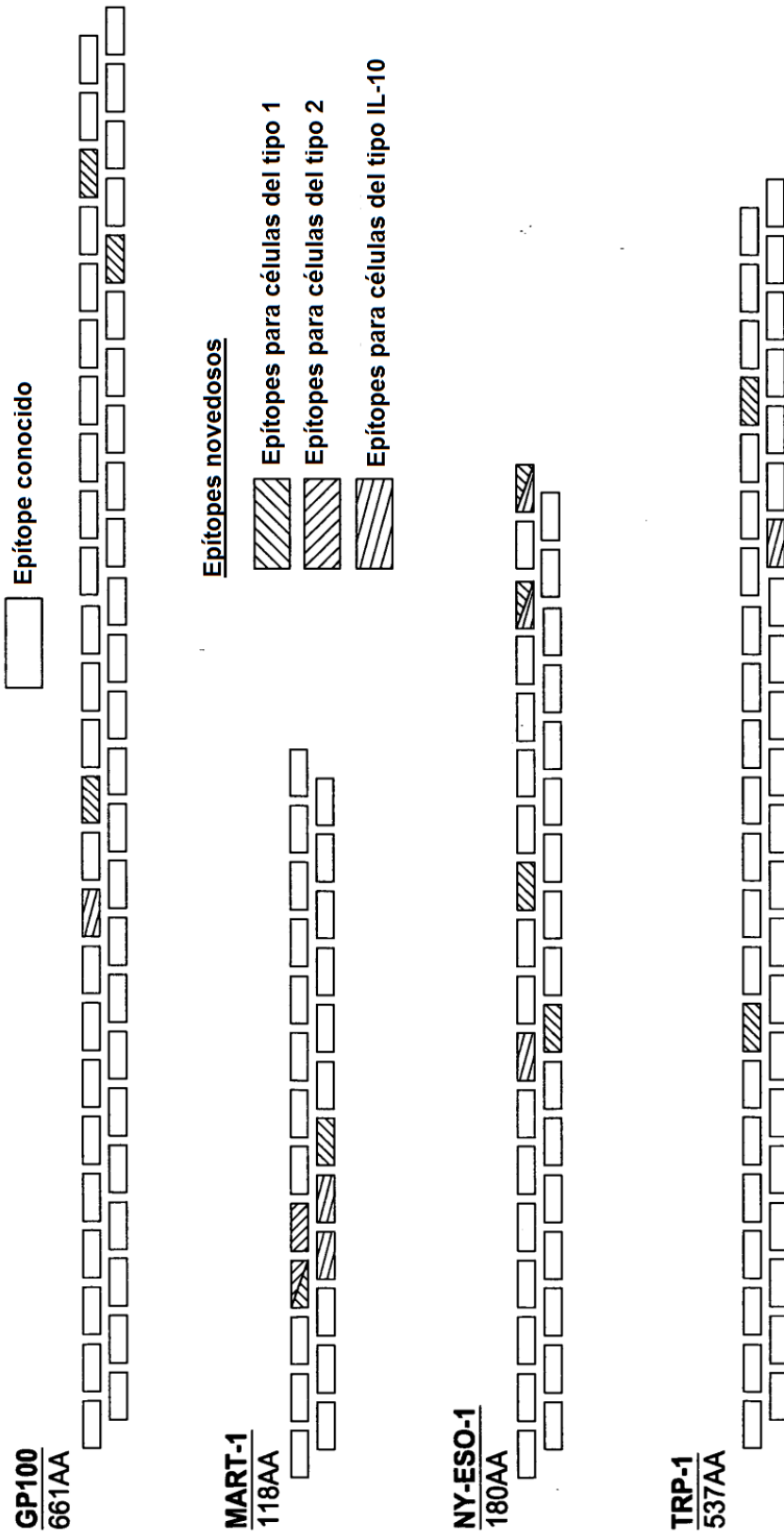


FIG. 27

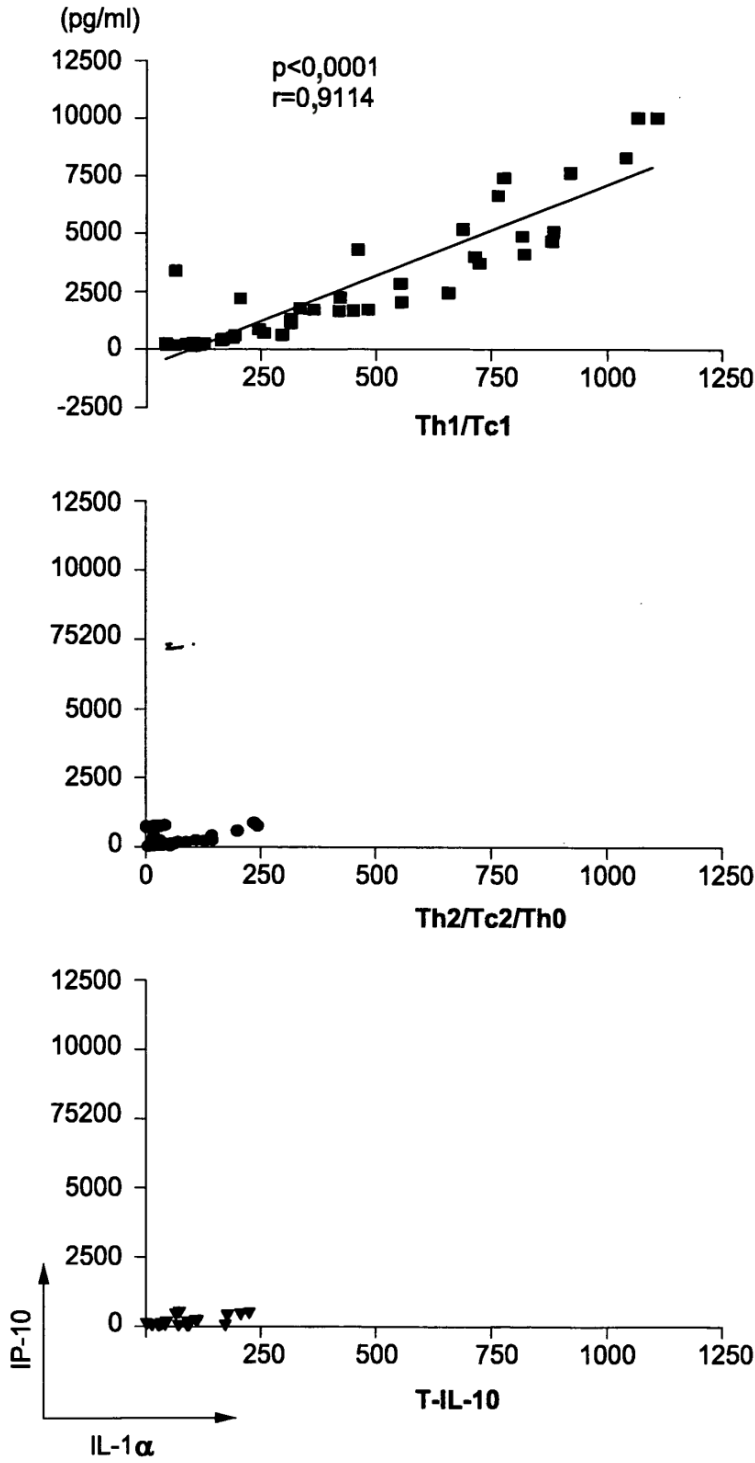


FIG. 28

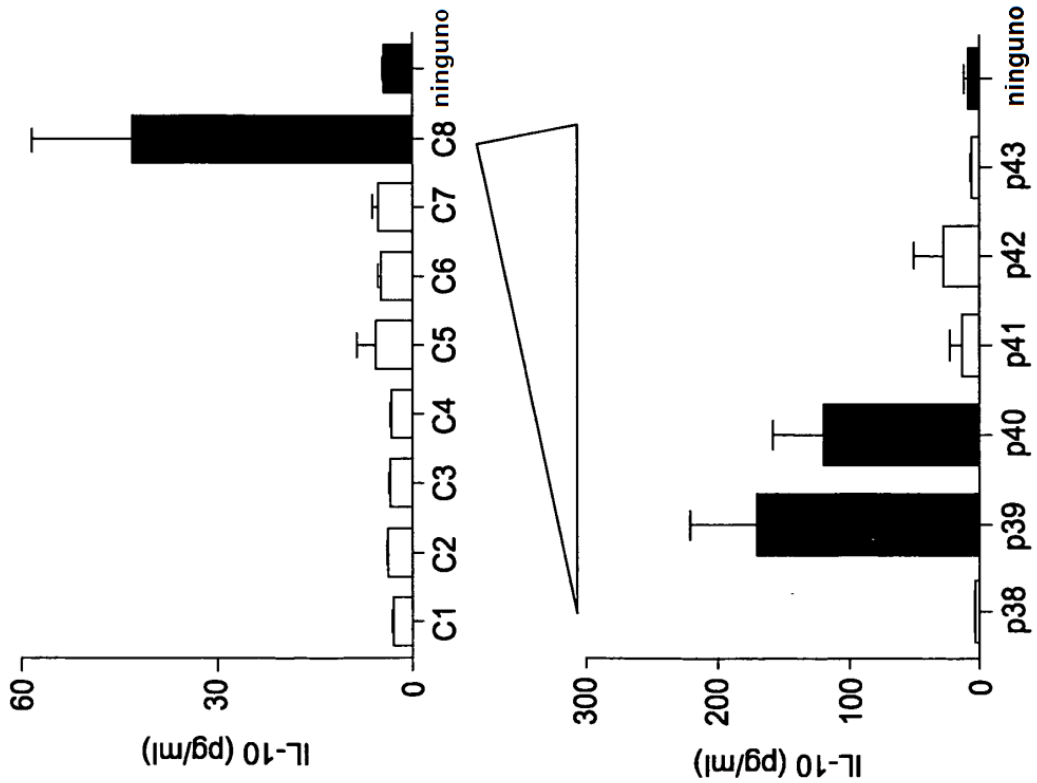


FIG. 29A

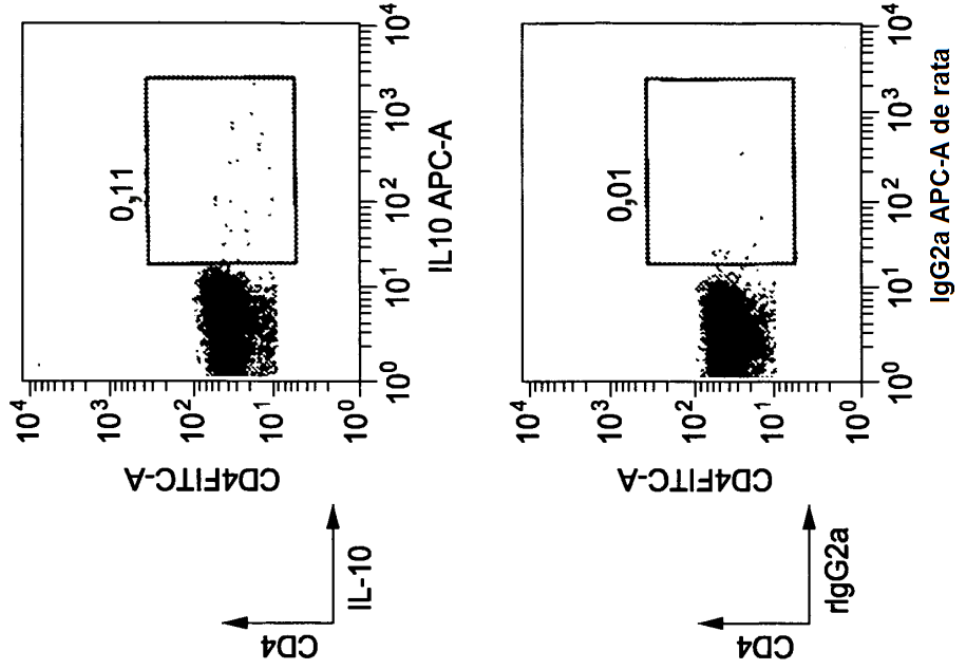


FIG. 29B

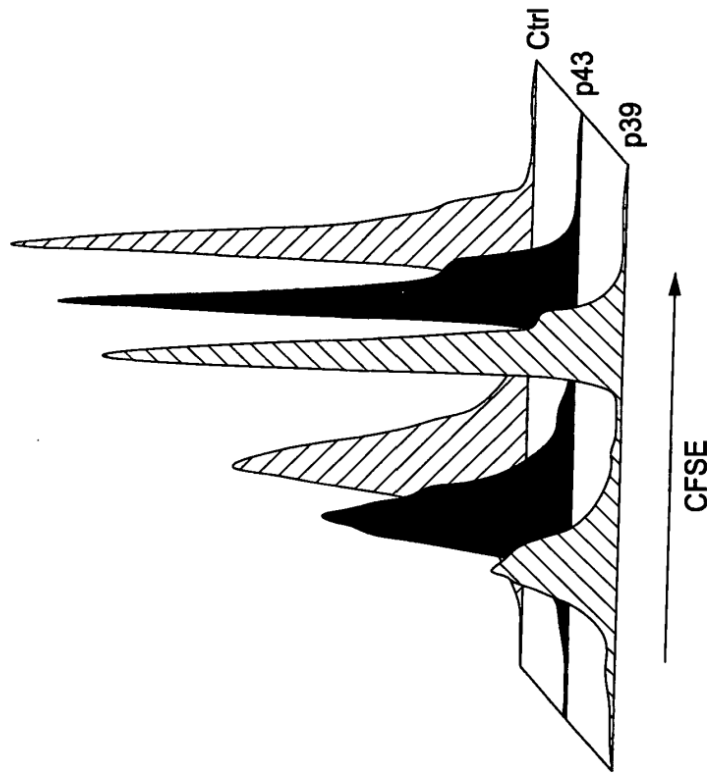


FIG. 29C

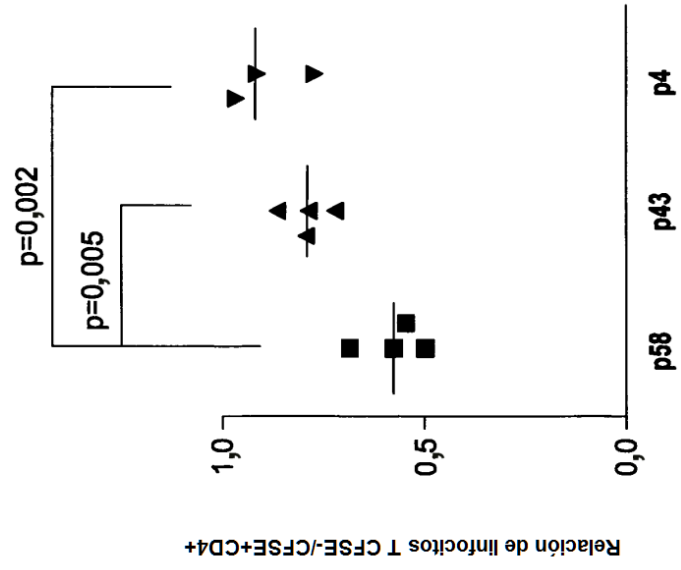
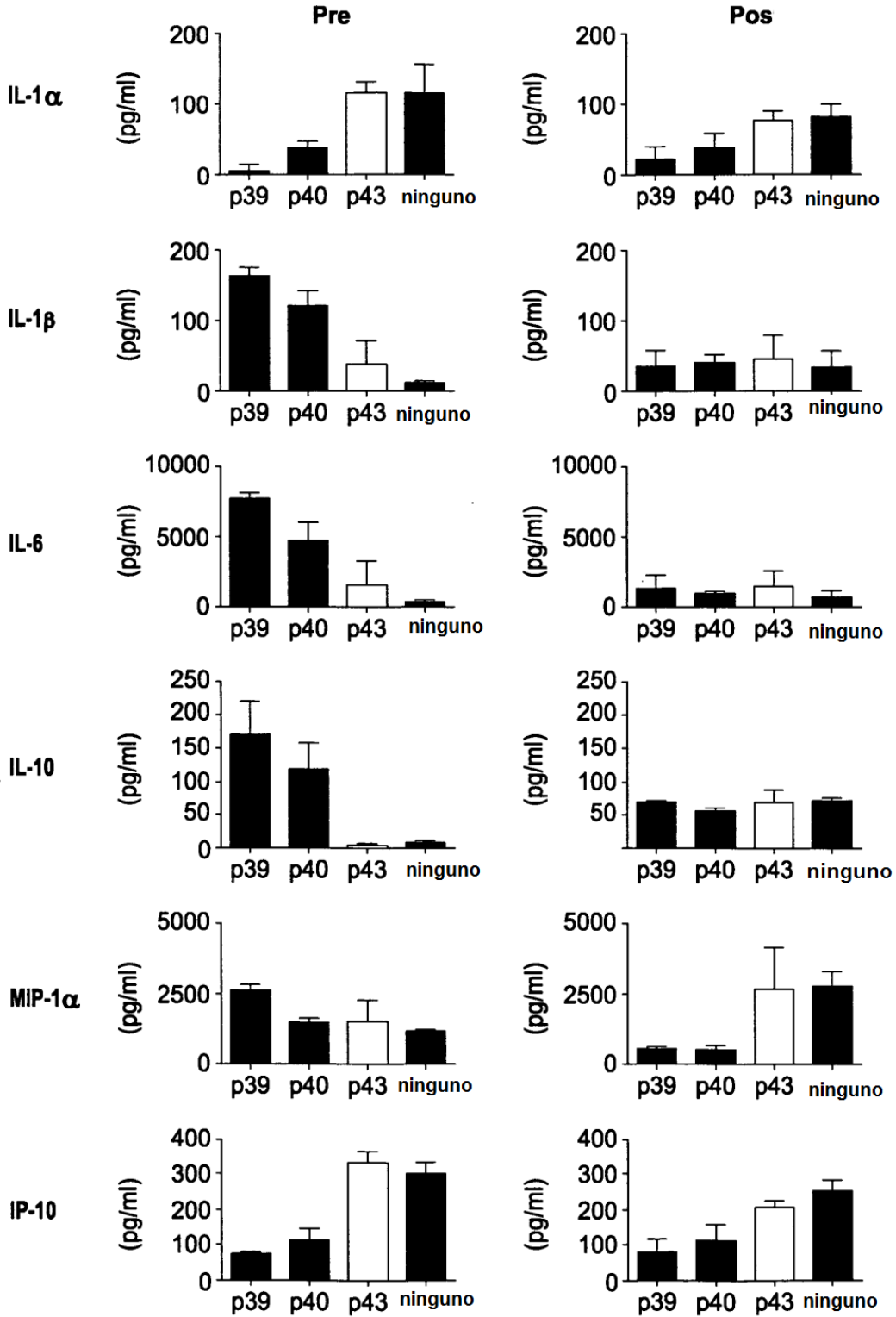


FIG. 29D

FIG. 30



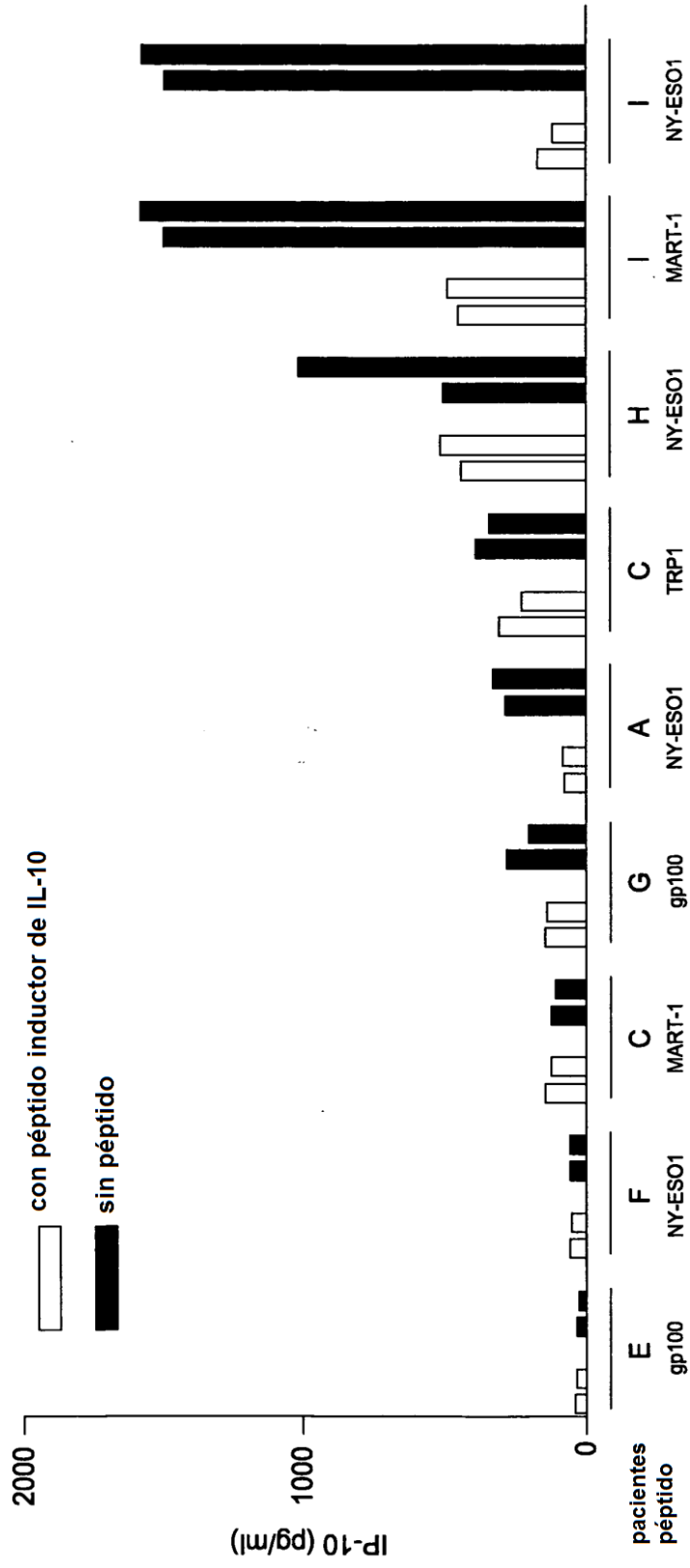


FIG. 31

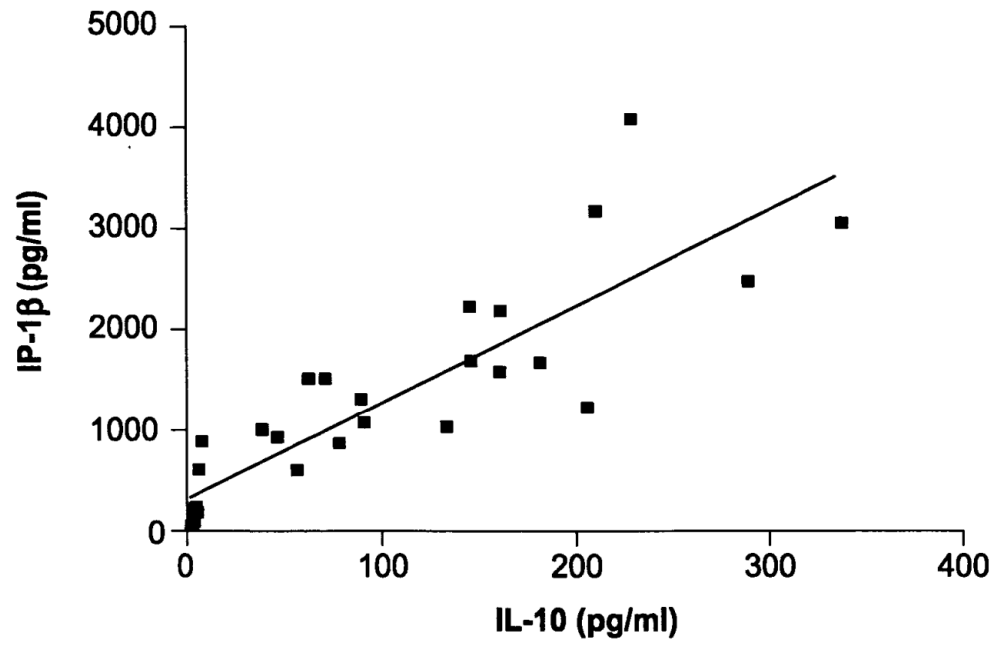


FIG. 32

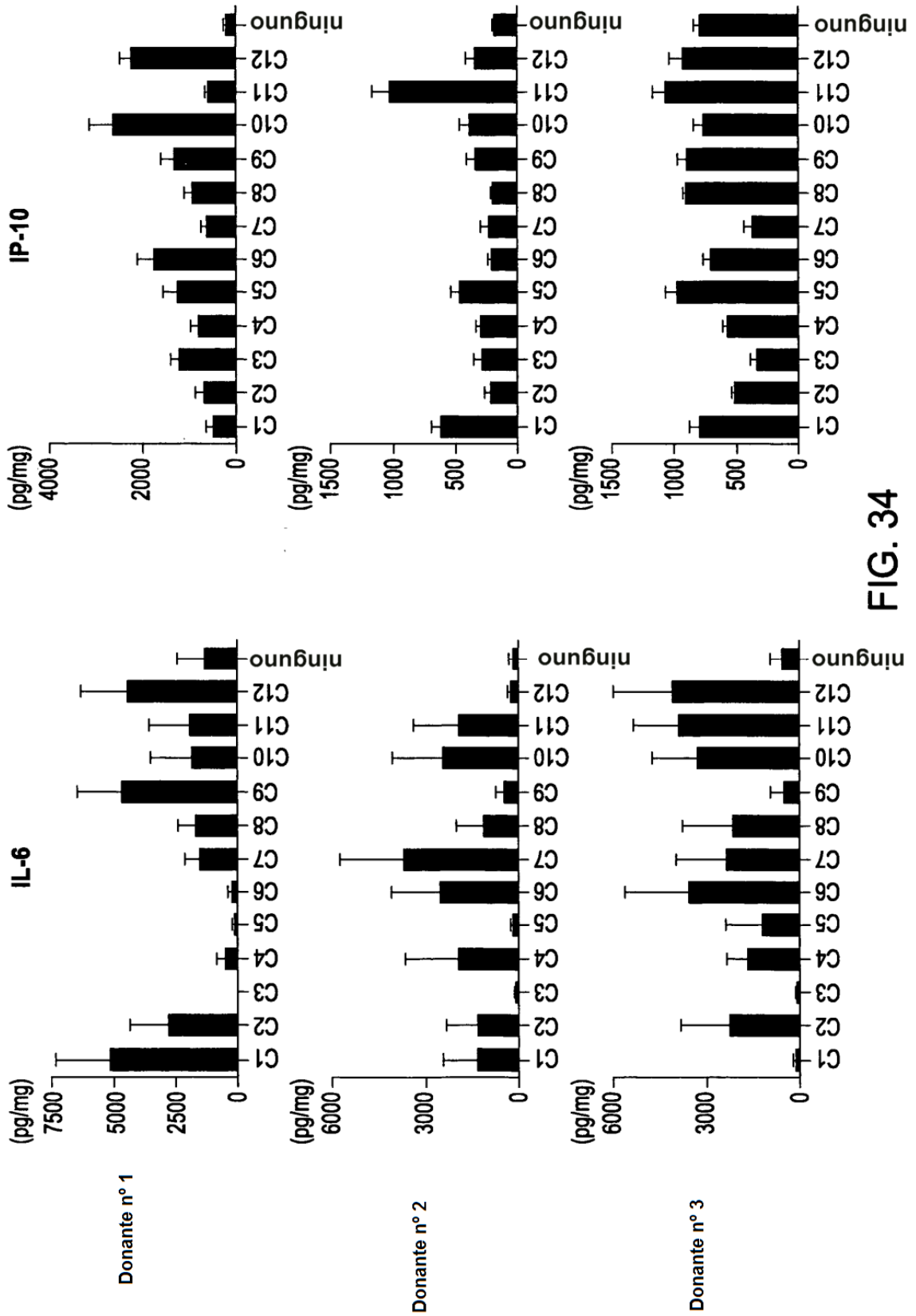


FIG. 34

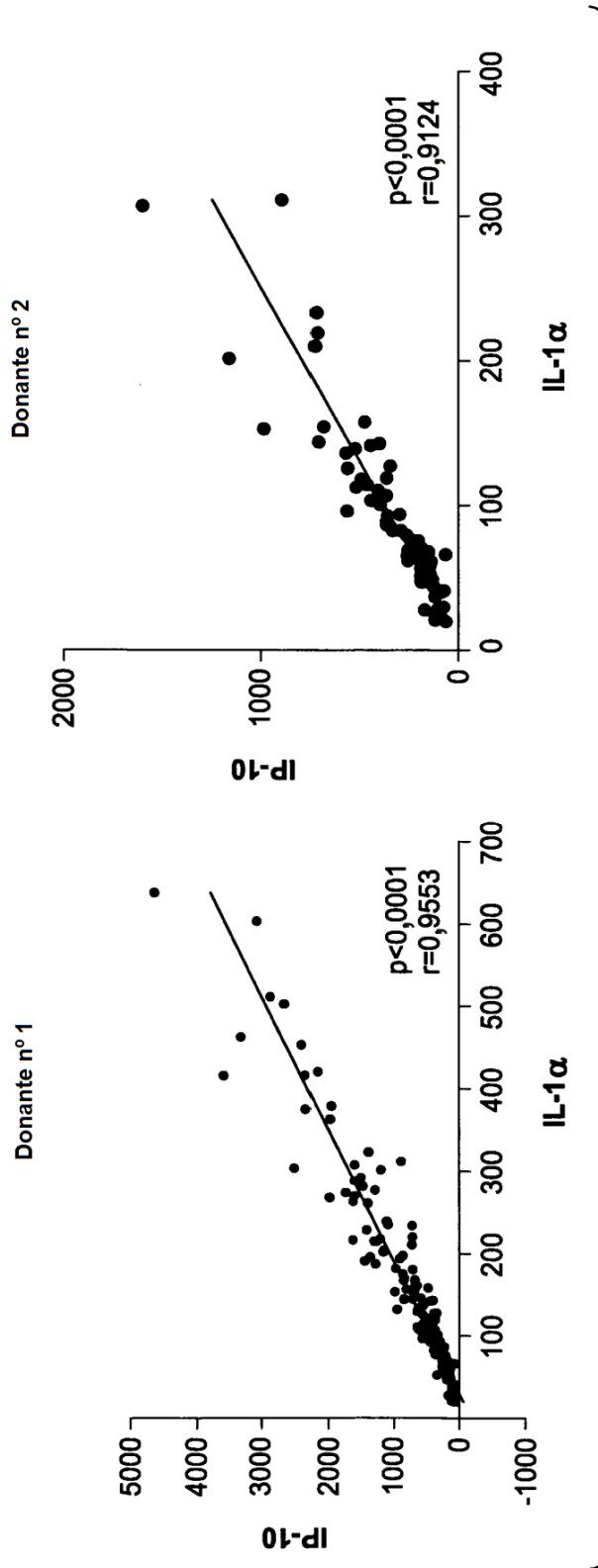


FIG. 35

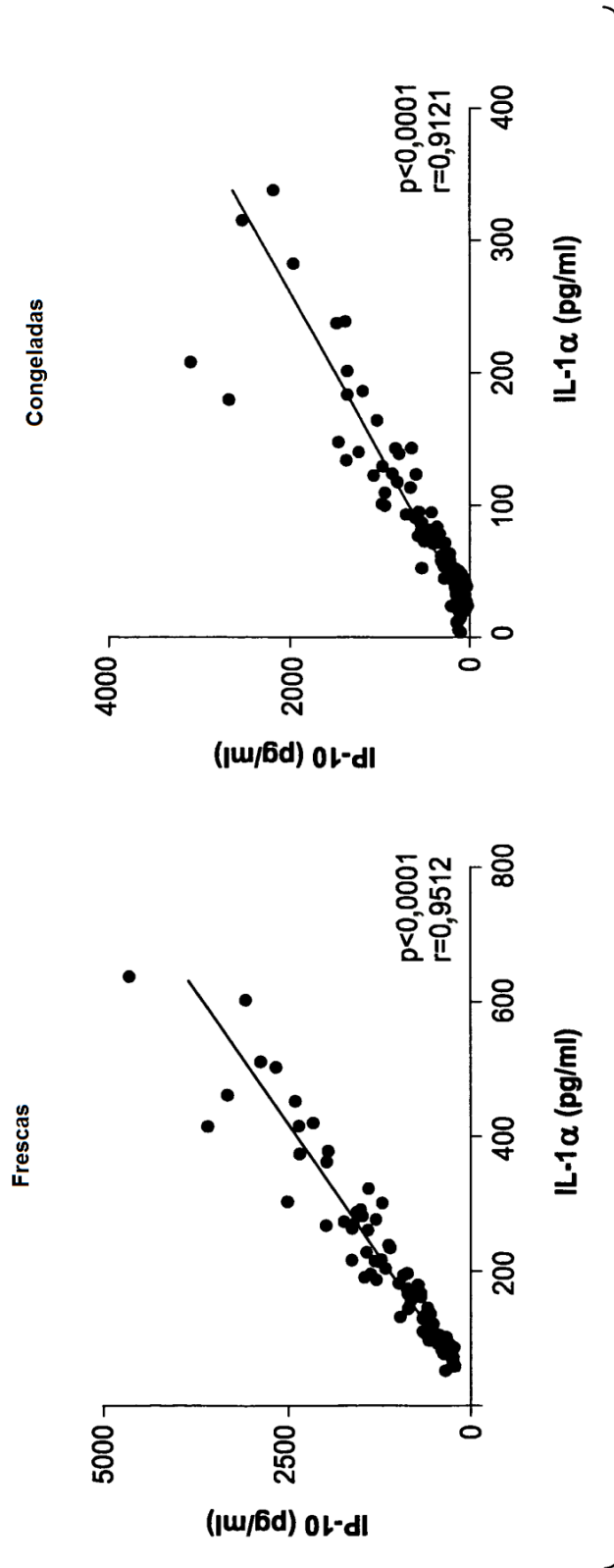


FIG. 36

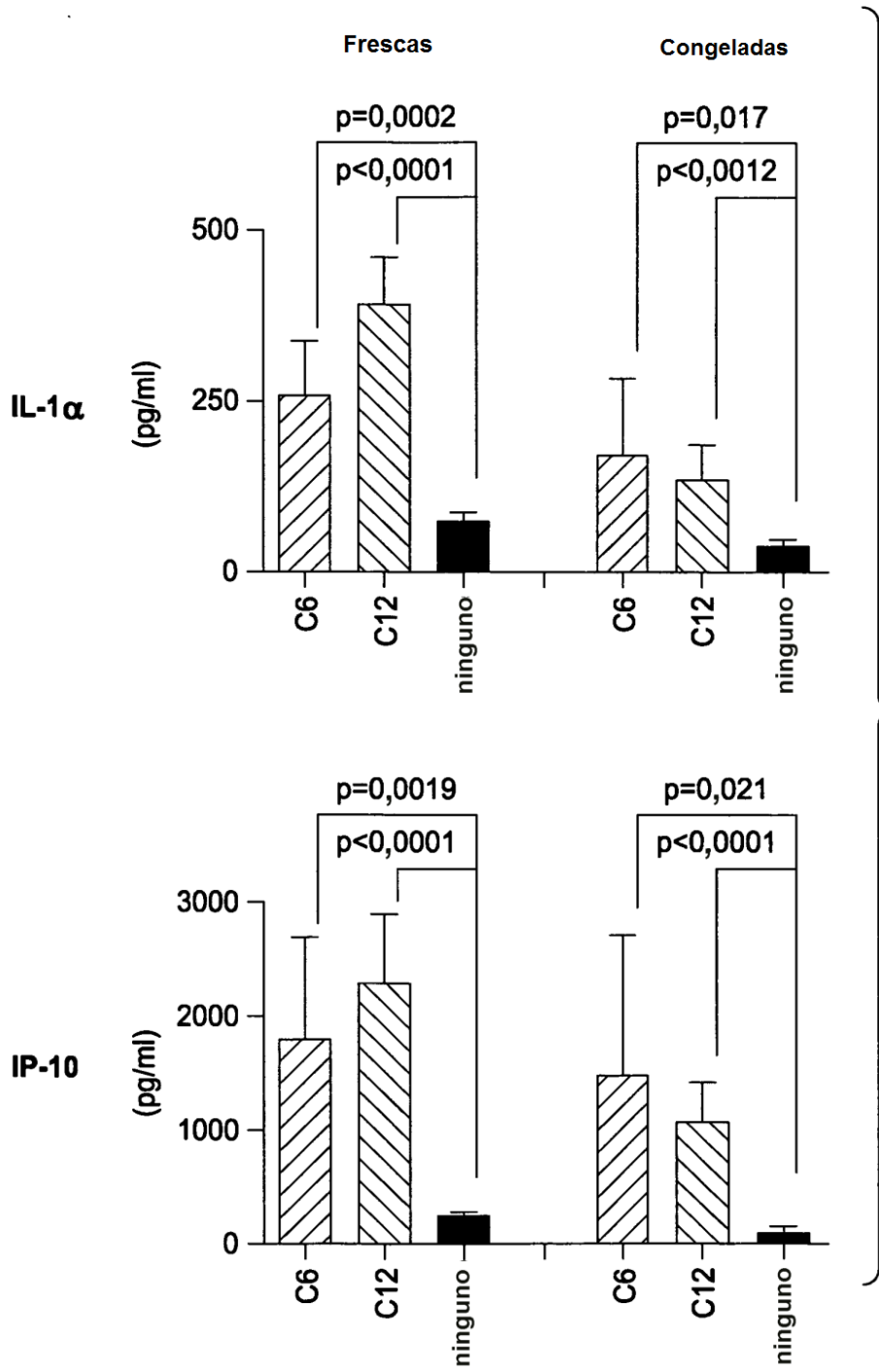


FIG. 37

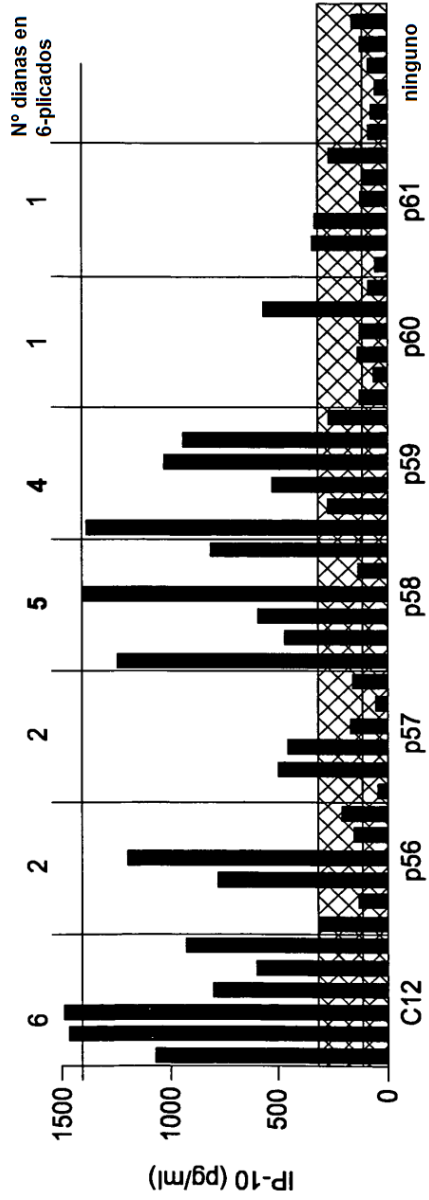


FIG. 38A

FIG. 38B

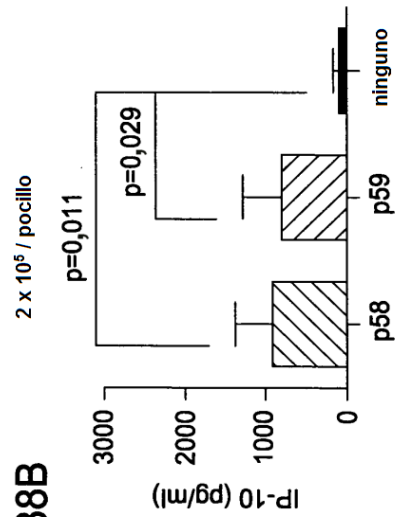
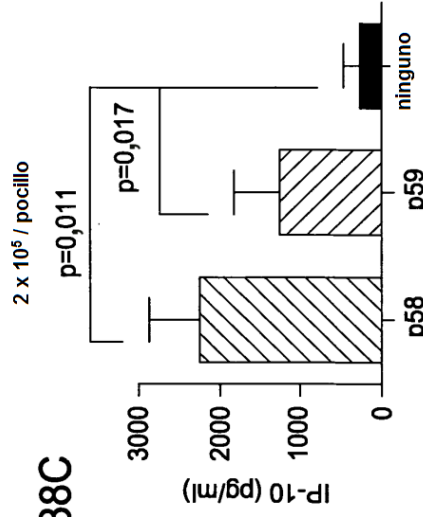
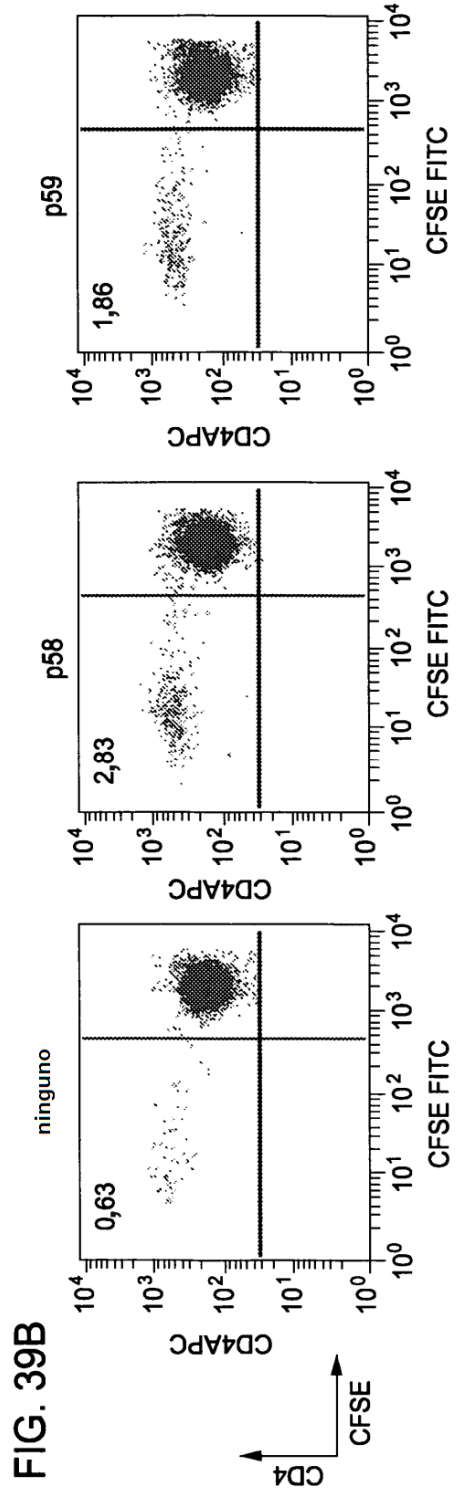
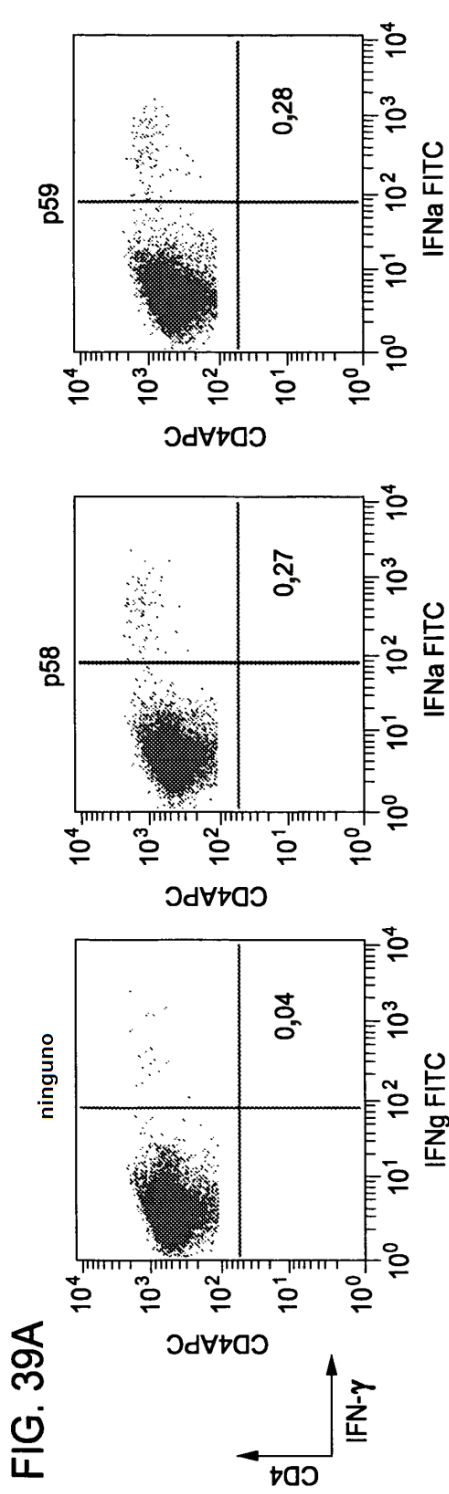


FIG. 38C





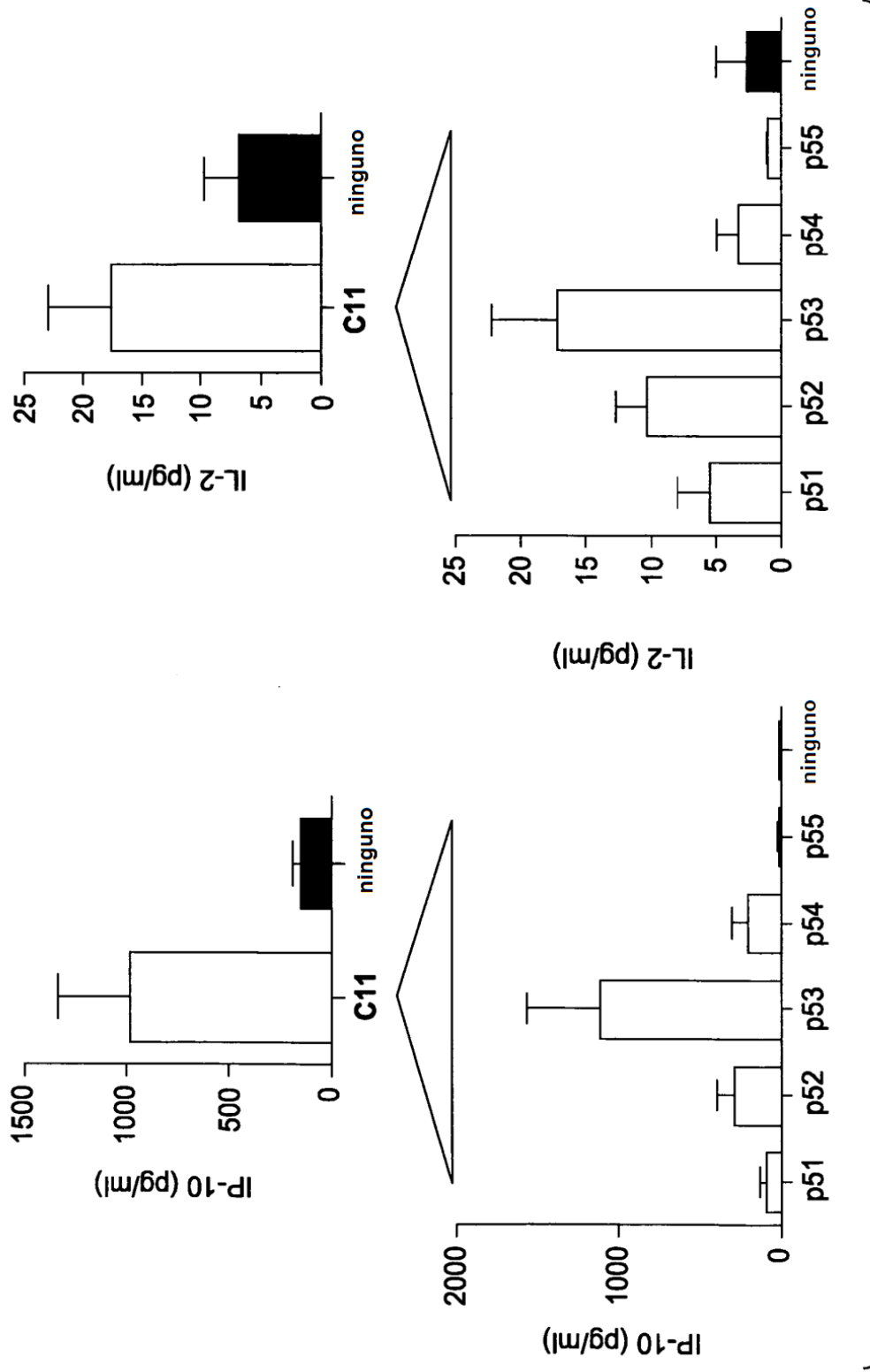


FIG. 40

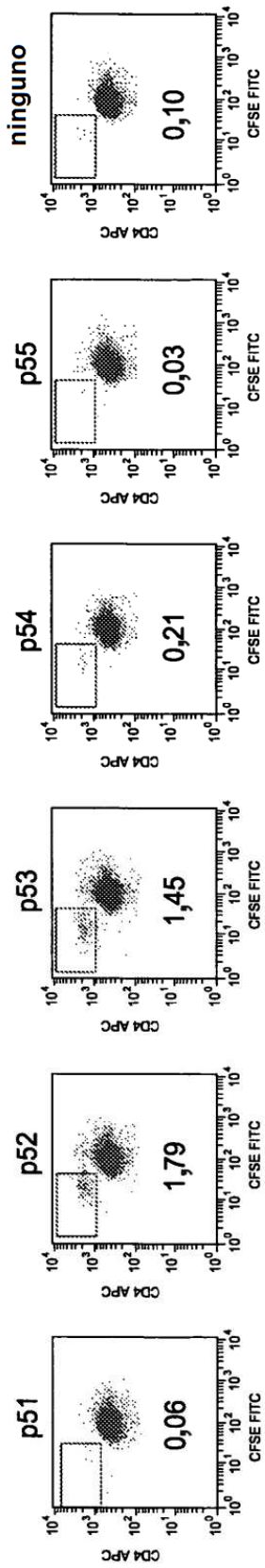


FIG. 41A

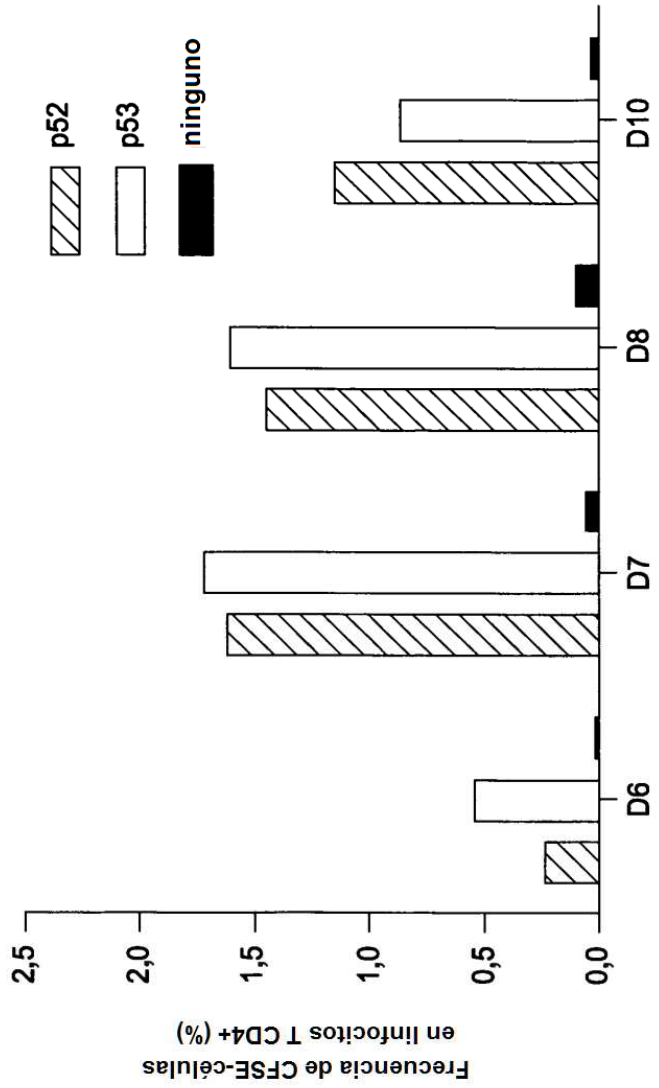
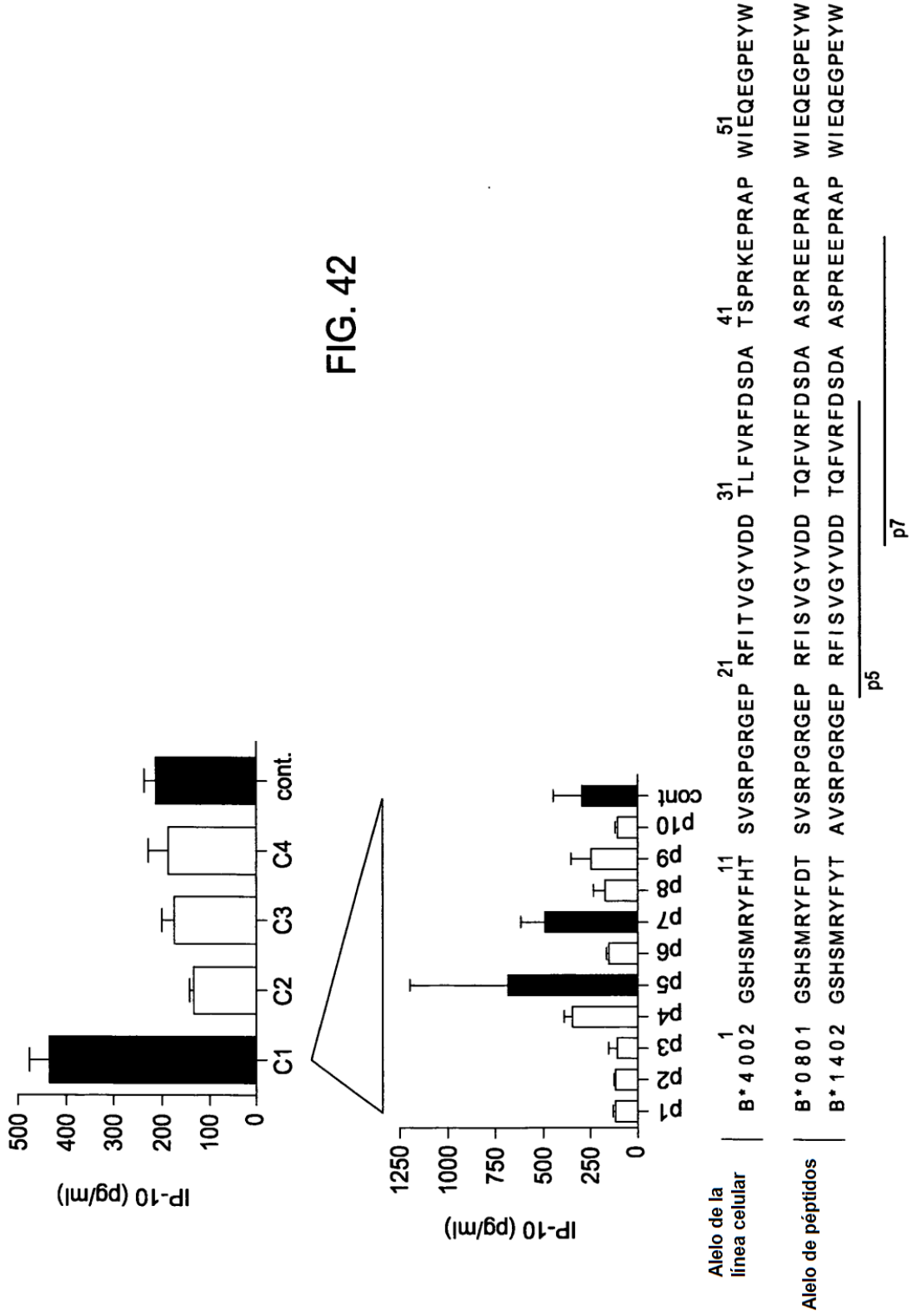


FIG. 41B



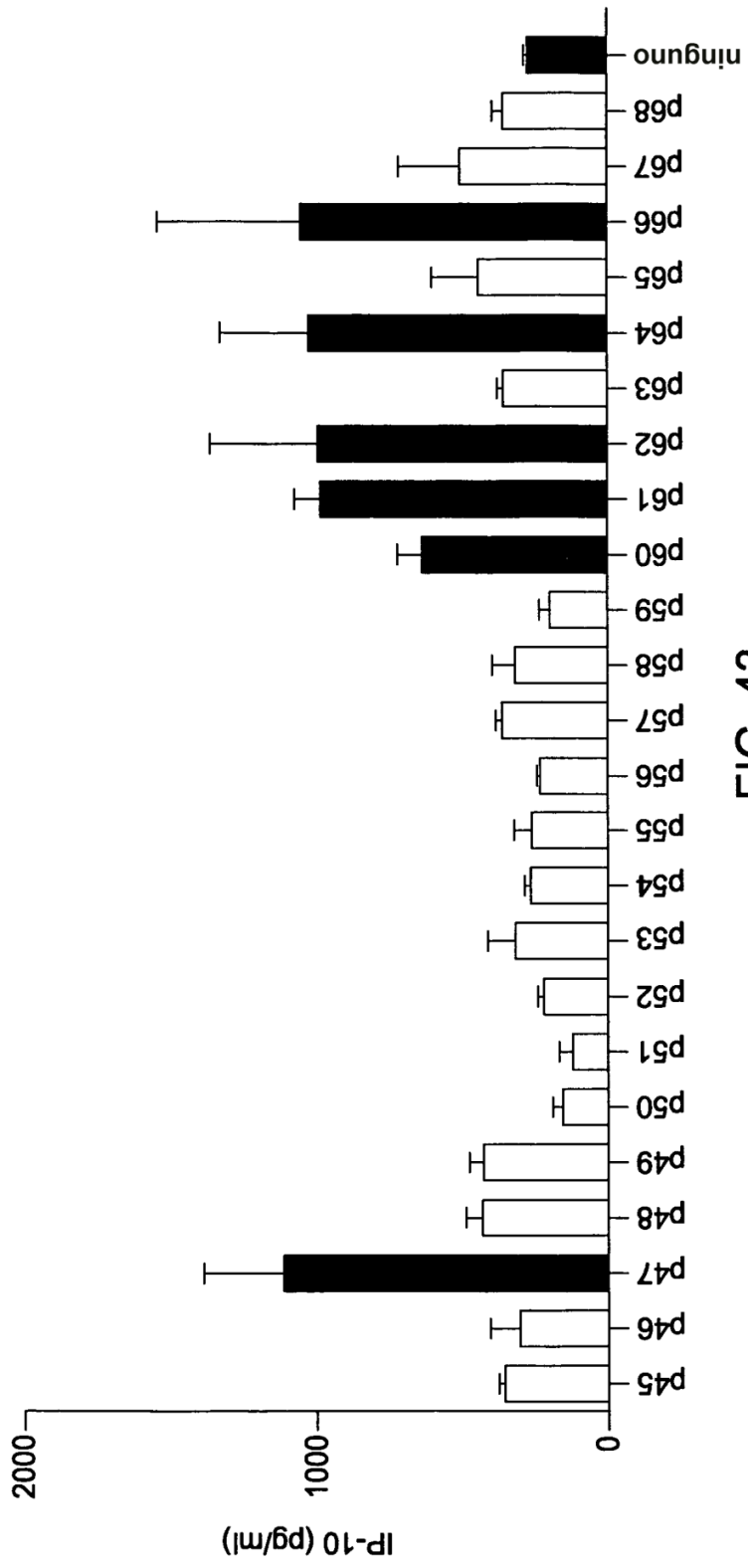


FIG. 43

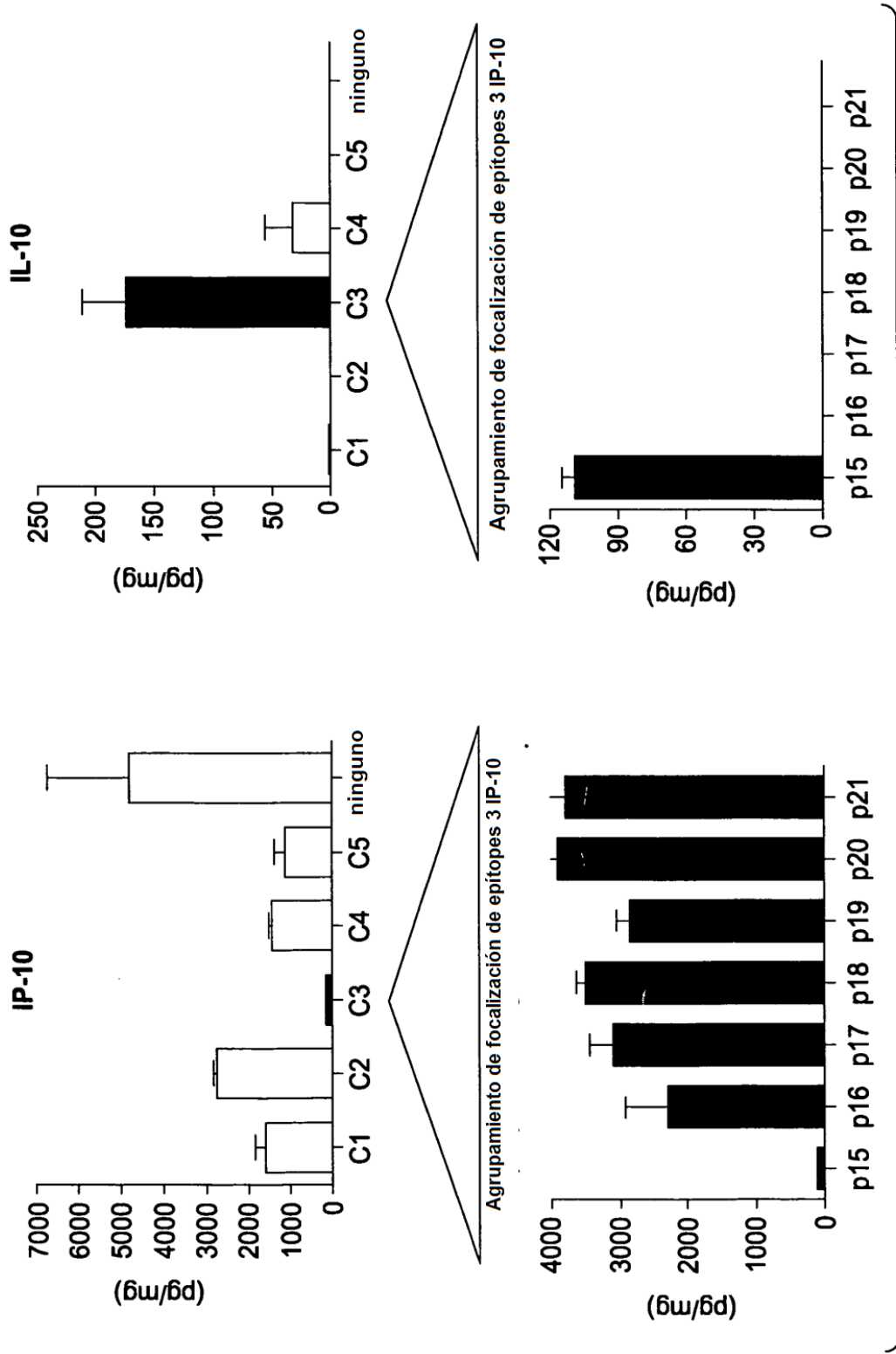


FIG. 44A

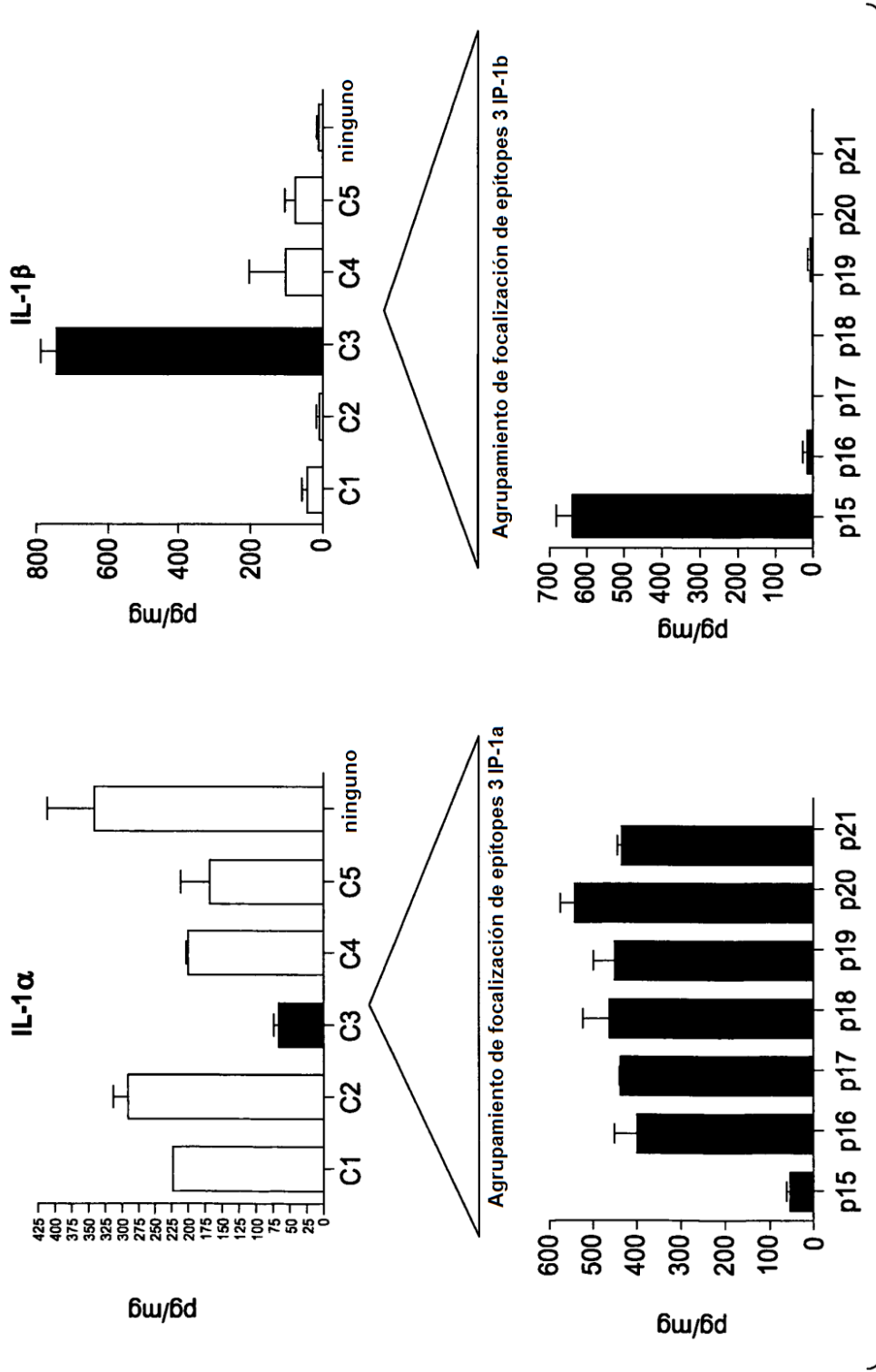


FIG. 44B

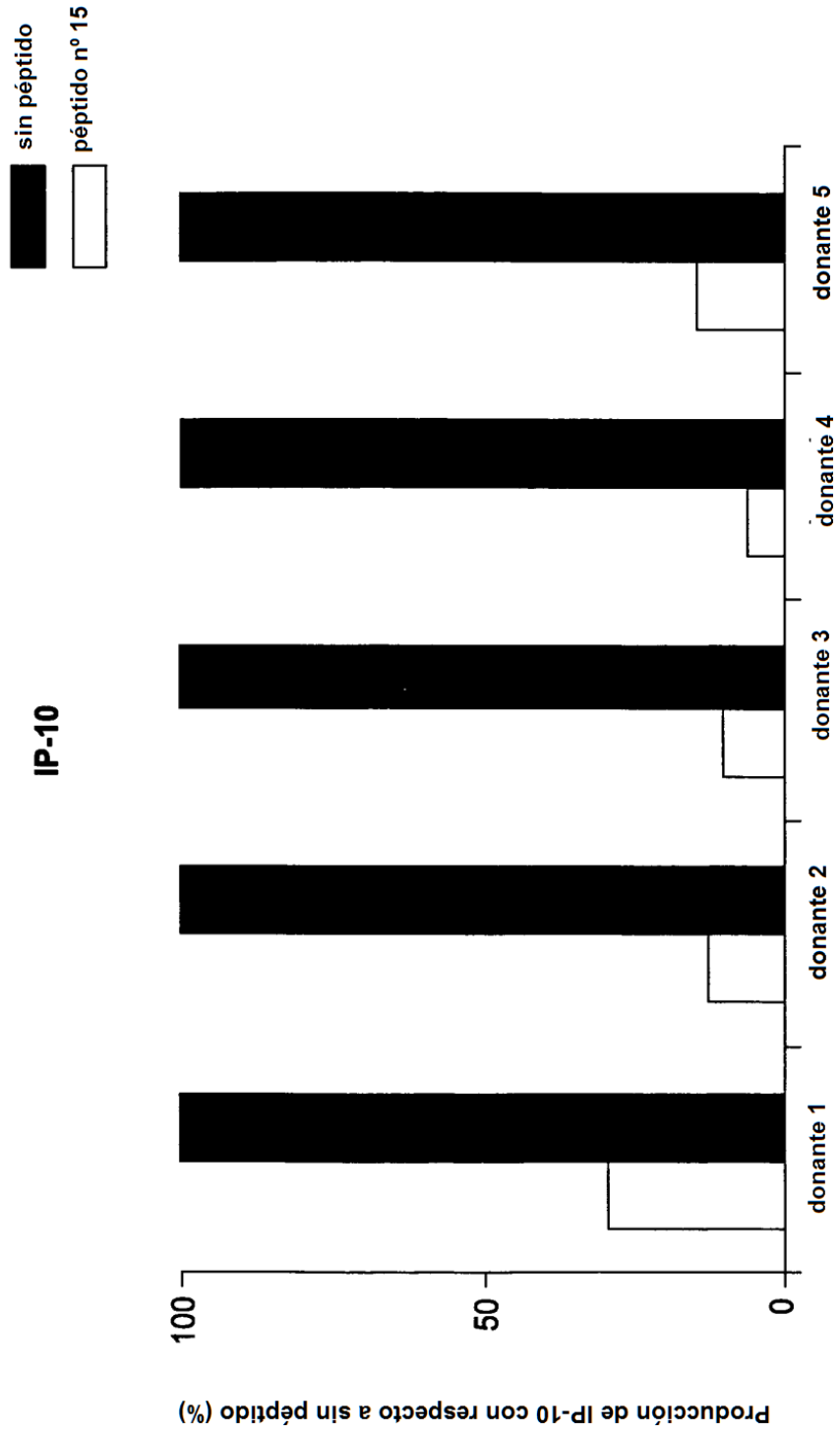


FIG. 45

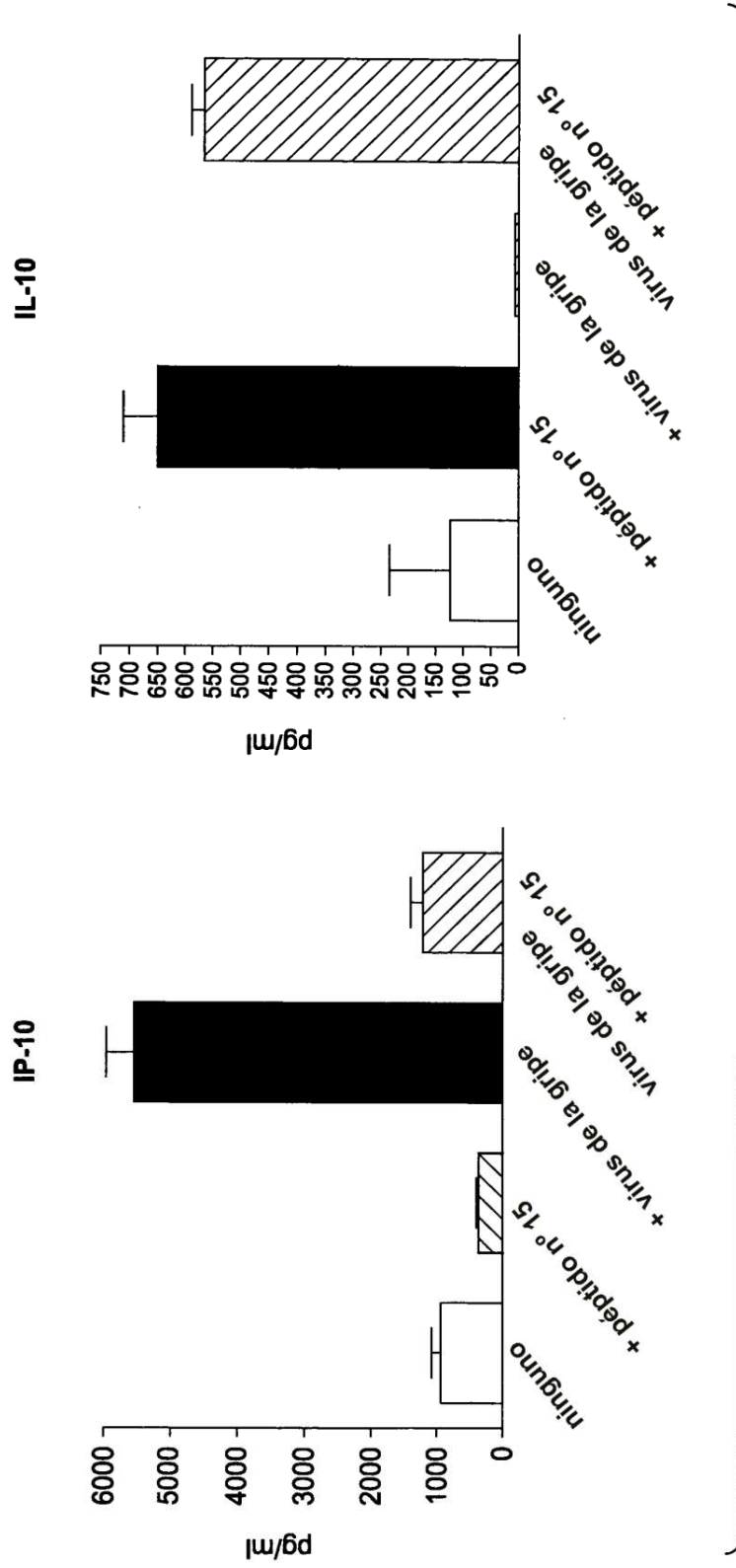


FIG. 46

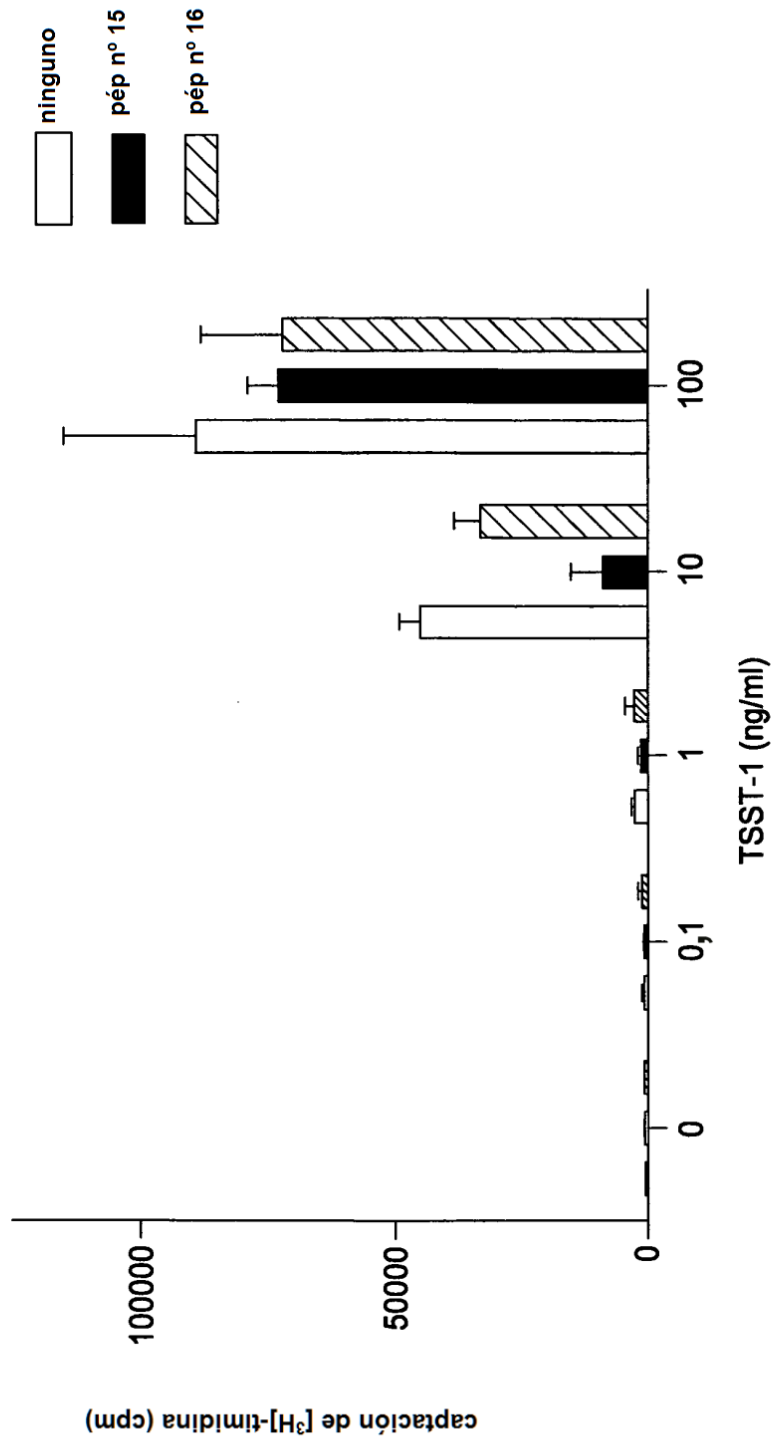


FIG. 47

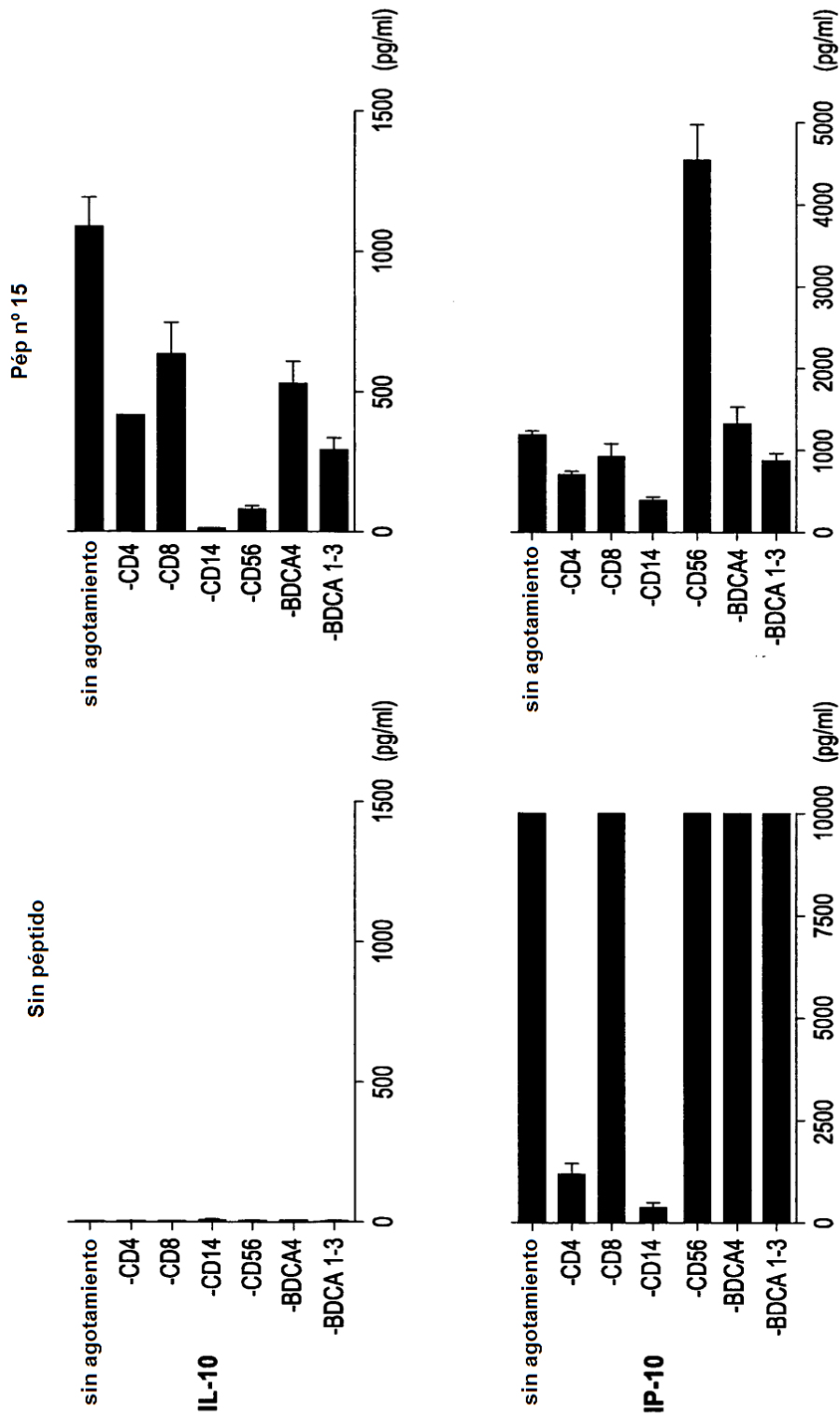


FIG. 48

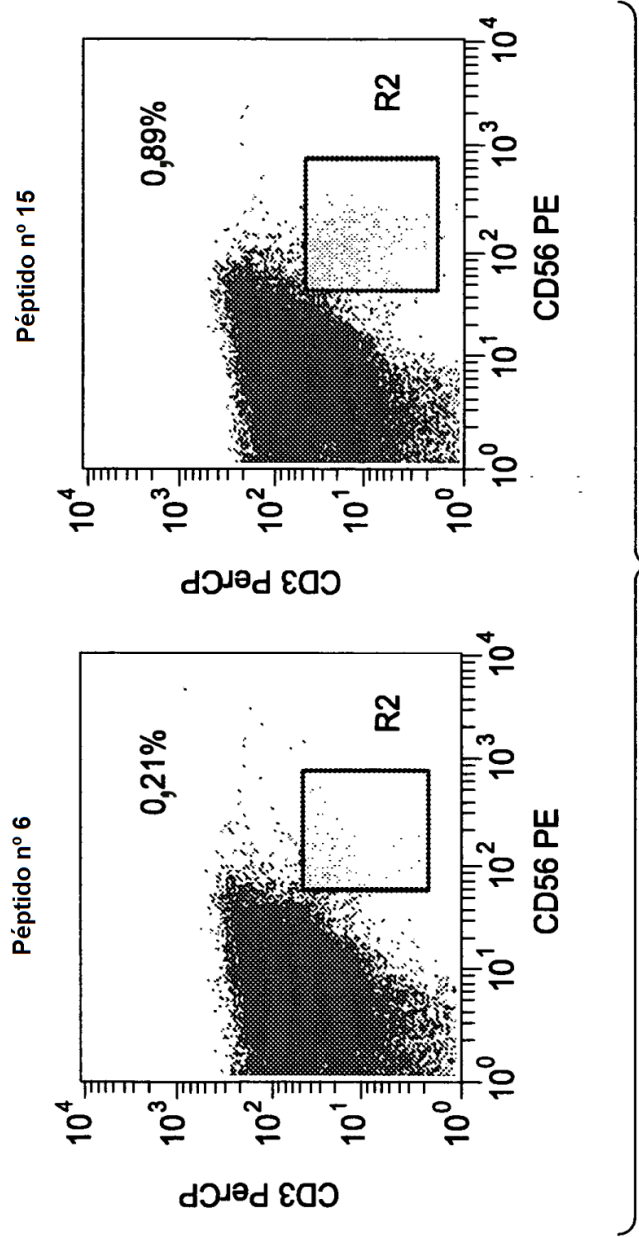


FIG. 49