

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 964**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2019 PCT/EP2019/082672**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2020 WO20109355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2019 E 19806285 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3887823**

54 Título: **Métodos y kit para someter a ensayo el potencial lítico de células efectoras inmunitarias**

30 Prioridad:

28.11.2018 EP 18306576

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

10.06.2024

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VALITUTTI, SALVATORE;
FILALI, LIZA;
MUELLER, SABINA y
PUISSEGUR, MARIE-PIERRE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 971 964 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y kit para someter a ensayo el potencial lítico de células efectoras inmunitarias

5 **Campo**

La presente divulgación se encuentra dentro del campo de la medicina.

10 **Antecedentes:**

10

En general, se acepta que los linfocitos T CD8⁺, y en particular los linfocitos T citotóxicos (CTL), desempeñan un papel esencial en la respuesta inmunitaria antitumoral. Por consiguiente, los protocolos terapéuticos diseñados para potenciar las respuestas de CTL contra las células tumorales son tratamientos de primera línea para pacientes con cáncer (Chen y Mellman, 2017; Schumacher *et al.*, 2015). Las principales necesidades en oncología clínica son: i) entender mejor la biología de los CTL en pacientes con cáncer; ii) mejorar la monitorización de la función efectora de CTL contra tumores; iii) optimizar protocolos de inmunoterapia identificando los parámetros que influyen en la eficacia de las respuestas de CTL contra células tumorales. Desafortunadamente, estas necesidades están lejos de satisfacerse debido a varias limitaciones técnicas y éticas. De hecho, el estudio de las respuestas de CTL humanos en entornos clínicos está limitado por la escasez de muestras derivadas de pacientes con cáncer y por la singularidad de las colecciones de muestras en el momento de la biopsia o de la cirugía. Esas limitaciones dificultan la obtención de resultados exhaustivos de experimentos realizados usando muestras derivadas de pacientes, tal como se logra habitualmente con líneas celulares expandidas *in vitro* o modelos de ratón.

15

20

25

Una ruta clave usada por los CTL humanos para destruir sus células diana se basa en el suministro de mutaciones letales mediado por perforina/granzima. Minutos o segundos después del acoplamiento productivo de TCR, la secreción de la proteína formadora de poros perforina, granzima B y otras proteasas almacenadas en los gránulos citoplasmáticos de CTL (denominados gránulos líticos) tiene lugar en la sinapsis lítica de CTL/célula diana (Baran *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2013; Faroudi *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2010; Stinchcombe *et al.*, 2001).

30

La penetración de la granzima B mediada por perforina en las células diana desencadena una cascada apoptótica que conduce a la muerte de la célula diana (Lopez *et al.*, 2013; de Saint Basile *et al.*, 2010; Thiery *et al.*, 2011). Trabajos recientes plantean la noción de que las sinapsis líticas son los sitios privilegiados donde se desencadenan y ejecutan rápidamente los mecanismos citotóxicos de los CTL y donde se despliegan las primeras estrategias de defensa de las células tumorales (Bertrand *et al.*, 2013; Khazen *et al.*, 2016). Los resultados revelan la existencia de una lucha real que se produce a ambos lados de la sinapsis inmunológica

35

entre los CTL y las células diana tumorales. En particular, se demostró que las células de melanoma son resistentes a la citotoxicidad mediada por CTL en comparación con las células diana convencionales sensibles a la citotoxicidad (Caramalho *et al.*, 2009; Khazen *et al.*, 2016). También se demostró que las células de melanoma experimentan un rápido mecanismo de reparación de la membrana dependiente de Ca²⁺ que se produce segundos después del acoplamiento productivo inicial de TCR y se desencadena por la formación de poros mediada por perforina en la membrana plasmática de la célula diana (Khazen *et al.*, 2016). Esos resultados están en línea con la hipótesis de que las células de melanoma podrían haberse apropiado de mecanismos ancestrales de reparación de membranas para oponer resistencia al ataque de los CTL. De hecho, está bien establecido que,

40

tras una lesión en la membrana plasmática, las células experimentan un acoplamiento de lisosomas dependiente de calcio y una fusión con la membrana plasmática que se acompaña de un recambio de membrana de reparación (Andrews *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015; Horn y Jaiswal, 2018).

45

L. Piriou *et al.* dan a conocer que un ensayo de citometría de flujo que usa un colorante de carbocianina lipófilo es altamente reproducible y es adecuado para medir diferentes tipos de citotoxicidad celular (Piriou, L *et al.* "Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species". Cytometry vol. 41.4 (2000): 289-97).

50

Y. Yamaguchi *et al.* dan a conocer un ensayo para determinar la actividad citotóxica de los linfocitos citolíticos naturales, en el que las células diana se tiñen previamente con un colorante de membrana fluorescente verde lipófilo y las células muertas se detectan mediante incubación con una disolución de tinción de ADN y el análisis posterior se realiza en un citómetro de flujo (Yamaguchi, Yukie *et al.* "Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease." Arthritis research & therapy vol. 12.3 (2010): R80".

55

D. Flieger *et al.* dan a conocer un ensayo de citometría de flujo no radiactivo para el análisis cuantitativo de la citotoxicidad mediada por células, en el que antes de la incubación las células efectoras se tiñen con un colorante fluorescente lipófilo rojo PKH26 y las células diana (por ejemplo, células cancerosas) con un colorante fluorescente verde PKH2 (Flieger, D *et al.* "A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells." Journal of immunological methods vol. 180.1 (1995): 1-13).

60

65

Y. Nakagawa *et al.* dan a conocer un ensayo de citometría de flujo para evaluar las actividades citotóxicas

específicas de antígeno de linfocitos de célula T citotóxicos *in vitro* usando éster succinimidílico de diacetato de 5-carboxifluoresceína (CFSE) de colorante fluorescente único (Nakagawa, Yohko *et al.* "One-step simple assay to determine antigen-specific cytotoxic activities by single-color flow cytometry." Biomedical research (Tokio, Japan) vol. 32.2 (2011): 159-66).

5

Sumario:

La presente invención está definida por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un método de someter a ensayo el potencial lítico de una población de células efectoras inmunitarias que comprende las etapas que consisten en i) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica, ii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, en el que dicho nivel se correlaciona con el potencial lítico de la población de células efectoras inmunitarias y en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante de estirilo.

10

15

20

La siguiente descripción detallada, figuras y ejemplos no entran dentro del alcance de la presente invención y están presentes únicamente con fines de comprensión e ilustración. Además, cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

Descripción detallada

25

30

Para superar la dificultad de lograr una evaluación cuantitativa de la función de CTL en entornos clínicos, los presentes inventores tenían como objetivo desarrollar un nuevo método inspirado en el presente conocimiento de la biología diana de tumor/CTL y basado en la citometría de flujo. La metodología permite evaluar rápidamente la resistencia sináptica de las células tumorales diana al ataque de CTL y la capacidad intrínseca de CTL CD8⁺ para destruir eficientemente sus células diana.

35

40

Por consiguiente, el primer objeto de la presente divulgación se refiere a un método de someter a ensayo el potencial lítico de una población de células efectoras inmunitarias que comprende las etapas que consisten en i) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un periodo suficiente de tiempo y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica, ii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, en el que dicho nivel se correlaciona con el potencial lítico de la población de células efectoras inmunitarias y en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante de estirilo.

45

50

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula efectora inmunitaria" o "célula efectora citotóxica" se refiere a una célula que es capaz de destruir o provocar directa o indirectamente la muerte de una célula diana (es decir, "potencial lítico") que presenta un antígeno contra el cual se dirige la célula efectora. Las células efectoras preferidas usan perforina para destruir las células diana e incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos citolíticos naturales (células NK) y linfocitos T citolíticos naturales (células NKT). En particular, la población de células efectoras inmunitarias es una población de linfocitos T citotóxicos. Tal como se usa en el presente documento, el término "linfocito T citotóxico" o "CTL" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto de linfocitos T que expresan CD8 en su superficie y contienen gránulos líticos. Los antígenos CD8 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulinas y son elementos de reconocimiento asociativos en interacciones restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Están restringidos al MHC de clase I y funcionan como linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos también se denominan linfocitos T CD8⁺, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T citolíticos o células T citotóxicas.

55

En particular, la población de células efectoras inmunitarias es una población de linfocitos T citotóxicos infiltrantes de tumor. Tal como se usa en el presente documento, el término "linfocito T citotóxico infiltrante de tumor" o "TIL" se refiere a la agrupación de linfocitos T citotóxicos del paciente que han abandonado el torrente sanguíneo y han migrado hacia un tumor.

60

65

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula diana" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una célula contra la cual se somete a prueba la actividad de una célula efectora citotóxica. Las células diana preferidas pueden presentar uno o más de un antígeno, más preferiblemente de una manera restringida por MHC-I. Preferiblemente, las células diana son células tumorales, o células infectadas (de manera natural o no) por un patógeno (virus, bacteria, parásito...). En particular, las células diana son células transformadas con VEB (por ejemplo, células JY).

En particular, las células diana se preparan previamente antes de ponerse en contacto con la población de

células efectoras inmunitarias. Por ejemplo, en particular, puede ser beneficioso o deseable pulsar las células diana con al menos un antígeno. El antígeno comprende un "epitopo" que consiste en porciones del antígeno que se reconocen por las células efectoras inmunitarias. Por ejemplo, la interacción de dicho epitopo con un sitio de reconocimiento de antígeno de un receptor de antígeno de linfocito T (TCR) conduce a la inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno (es decir, ataque citotóxico). Normalmente, dicho antígeno es un péptido. En particular, las células diana se pulsan con un péptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos de un agente infeccioso o un antígeno tumoral. Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno tumoral" incluye tanto el antígeno específico de tumor (TSA) como antígeno asociado a tumor (TAA). Un antígeno específico de tumor se conoce como un antígeno que se expresa únicamente en células tumorales, mientras que el antígeno asociado a tumor se expresa en células tumorales, pero también puede expresarse en algunas células normales. En la técnica se han descrito antígenos específicos de tumores y antígenos asociados a tumores. Tal antígeno tumoral puede ser, pero no se limita a, mucina de células epiteliales humanas (Muc-1; una repetición central de 20 aminoácidos para la glicoproteína Muc-1, presente en células de cáncer de mama y células de cáncer de páncreas), el producto del oncogén Ha-ras, p53, antígeno carcinoembrionario (CEA), el producto del oncogén raf, GD2, GD3, GM2, TF, sTn, MAGE-1, MAGE-3, tirosinasa, gp75, Melan-A/Mart-1, gp100, HER2/neu, LMP 1 y 2 de VEB, F4, 6, 7 de VPH, antígeno sérico prostático (PSA), alfa-fetoproteína (AFP), CO17-1A, GA733, gp72, p53, el producto del oncogén ras, proteinasa 3, antígeno de tumor de Wilm 1, telomerasa, E7 de VPH y gangliósidos de melanoma, así como cualquier otro antígeno tumoral conocido ahora o identificado en el futuro. Otros determinantes antigénicos incluyen, in limitación, antígenos de parásitos u hongos (tales como *Candida*, *Trichophyton*), células bacterianas (por ejemplo, células de estafilococos, neumococos o estreptococos, *Borrelia*, *Pseudomonas*, *Listeria*), partículas virales (por ejemplo, VIH, VHB, VPH, VHS, HVT, CMV, HTLV, virus de la hepatitis C, rotavirus, flavivirus, virus asociado a Rous o virus del SRAG, virus de la fiebre amarilla o virus del dengue), o cualquier porción de los mismos.

En particular, la población de células (es decir, células efectoras inmunitarias o células diana) son normalmente células o líneas celulares primarias.

En particular, la población de células (es decir, células efectoras inmunitarias o células diana) se aísla de una muestra biológica obtenida de un paciente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica obtenida con el propósito de evaluación *in vitro*. La muestra es normalmente una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal. El término "muestra de tejido" incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsia o autopsia y secciones congeladas tomadas con fines histológicos. En particular, la muestra de tejido es una muestra de tejido tumoral. El término "muestra de tejido tumoral" significa cualquier muestra de tejido tumoral derivada del paciente. Dicha muestra de tejido se obtiene con el propósito de la evaluación *in vitro*. En particular, la muestra tumoral puede resultar del tumor resecaado del paciente. En particular, la muestra tumoral puede resultar de una biopsia realizada en el tumor primario del paciente o realizada en una muestra metastásica distante del tumor primario del paciente. Ejemplos de líquidos corporales son sangre, suero, plasma, líquido amniótico, líquido cerebral/de médula espinal, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, esputo, secreciones de garganta y faringe y otras secreciones de membranas mucosas, líquido sinovial, ascitis, líquido lagrimal, líquido linfático y orina. Más particularmente, la muestra es una muestra de sangre. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra de sangre" significa una muestra de sangre completa obtenida del paciente.

En particular, la población de células diana es una población de células tumorales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "poner en contacto" con una población de células efectoras inmunitarias y/o una población de células diana se refiere a colocar la población de células efectoras inmunitarias y/o la población de células diana en un tampón y/o medio en el que las células son capaces de interaccionar (por ejemplo, inducir una respuesta citotóxica). Normalmente, la población de células efectoras inmunitarias y la población de células diana se ponen en contacto durante un periodo de 2, 5, 10, 15, 30 ó 60 minutos. Puede usarse cualquier medio de cultivo adecuado para el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de células efectoras inmunitarias. Normalmente, consiste en un medio base que contiene nutrientes (una fuente de carbono, aminoácidos), un tampón de pH y sales, que pueden complementarse con suero de origen humano o de otro origen y/o factores de crecimiento y/o antibióticos. Normalmente, el medio base puede ser medio RPMI 1640, DMEM, IMDM, X-VIVO o AIM-V, todos los cuales son medios convencionales comercialmente disponibles. Normalmente, la razón entre la población de células efectoras inmunitarias y la población de células diana es de 2:1.

En particular, el método de la presente divulgación comprende además la etapa que consiste en medir el nivel de recambio de membrana en la población de células efectoras inmunitarias. Por consiguiente, en particular se miden tanto el nivel de recambio de membrana de las células diana como el nivel de recambio de membrana de las células efectoras inmunitarias. En particular, la razón entre ambos niveles de recambio de membrana indica el potencial lítico de las células efectoras inmunitarias.

La medición del nivel de recambio de membrana de reparación puede determinarse mediante cualquier ensayo

bien conocido en la técnica. Normalmente, se determina el nivel usando un colorante lipófilo fluorescente.

En particular, el método comprende además la etapa de medir la captación del colorante lipófilo fluorescente por la población de células efectoras inmunitarias.

5

Tal como se usa en el presente documento, el término "colorante de estirilo" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un colorante que tiene una estructura en la que un heteroátomo que tiene una carga positiva y un anillo aromático de tipo anillo de carbono están unidos mediante una cadena de dimetino o una cadena de polimetino. Los colorantes de estirilo preferidos incluyen, pero no se limitan a, FM1-43, FM4-64, 10 FM14-68, FM2-10, FM4-84, FM1-84, FM14-27, FM14-29, FM3-25, FM3-14, FM5-55, RH414, FM6-55, FM10-75, FM1-81, FM9-49, FM4-95, FM4-59, FM9-40, y combinaciones de los mismos. Los colorantes preferidos tales como FM1-43 son sólo débilmente fluorescentes en agua pero muy fluorescentes cuando se asocian con una membrana, de tal manera que la captación del colorante es fácilmente discernible. Los colorantes adecuados están disponibles comercialmente, es decir, Molecular Probes, Inc., de Eugene, Oregón, "Handbook of 15 Fluorescent Probes and Research Chemicals", 6ª edición, 1996, en particular, el capítulo 17, y más particularmente, la sección 2 del capítulo 17 (incluyendo el capítulo relacionado al que se hace referencia).

En general, el colorante lipófilo fluorescente se proporciona a las células en una concentración que oscila entre aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ y aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 10 $\mu\text{g/ml}$. Puede usarse o no una etapa 20 de lavado.

Se mide la captación de colorante fluorescente usando dispositivos que miden la fluorescencia celular, tal como una máquina de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Tal como se usa en el presente documento, el término "clasificación de células activada por fluorescencia" o "FACS" se refiere a un método 25 mediante el cual las células individuales de una muestra se analizan y clasifican según sus propiedades ópticas (por ejemplo, absorbancia de luz, dispersión de luz y propiedades de fluorescencia, etc.) a medida que pasan en una estrecha corriente en fila india a través de un rayo láser. La clasificación de células activada por fluorescencia es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula cada vez, basándose en las 30 características fluorescentes y de dispersión de luz específicas de cada célula. Es un instrumento científico útil ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de señales fluorescentes de células individuales, así como la separación física de células de particular interés. En un sistema de FACS típico, la suspensión celular se arrastra en el centro de una corriente de líquido estrecha que fluye rápidamente. El flujo está dispuesto de manera que haya una gran separación entre las células en relación con su diámetro. Un mecanismo de vibración hace que el flujo de células se rompa en gotas individuales. El sistema se ajusta para que exista una baja probabilidad de que haya más de una célula en una gota. Justo antes de que la corriente se rompa en gotas, el flujo pasa a través de una estación de medición de fluorescencia donde se mide el carácter fluorescente de interés de cada célula. Se coloca un anillo de carga eléctrica justo en el punto donde la corriente se rompe en gotas. Se coloca una carga en el anillo basándose en la medición de intensidad de fluorescencia inmediatamente 40 anterior y la carga opuesta queda atrapada en la gota a medida que se desprende de la corriente. Luego, las gotas cargadas caen a través de un sistema de deflexión electrostática que las desvía hacia recipientes según su carga. En algunos sistemas, la carga se aplica directamente a la corriente y la gota que se desprende retiene la carga del mismo signo que la corriente. Luego, la corriente se hace volver a neutra después de que se desprende la gota. Los marcadores fluorescentes para la técnica de FACS dependen de la lámpara o el láser 45 usado para excitar el colorante fluorescente y de los detectores disponibles. Los láseres disponibles más habitualmente en máquinas de un único láser son los láseres azules de argón (488 nm).

En particular, FACS ofrece la ventaja de que mediante el uso de una estrategia de activación es posible en la misma muestra determinar la captación de colorante fluorescente en ambas poblaciones de células (es decir, 50 células diana y células efectoras inmunitarias). Por ejemplo, puede cargarse un tipo de célula con una sonda fluorescente para distinguir los dos tipos de células. Una sonda útil es el marcador de proliferación violeta CellTrace que tiene una emisión de fluorescencia que no se solapa con la de FM1-43 y no es tóxico para las células. En este contexto, este marcador no se usa para medir la proliferación celular, sino para teñir un tipo de célula.

55

En particular, la captación de colorante fluorescente se expresa como un valor absoluto (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) o como una tasa (por ejemplo, intensidad de fluorescencia por una sección de tiempo). En particular, la intensidad de fluorescencia se expresa como MFI. El término "MFI", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la intensidad de fluorescencia media o su mediana de una población de células fluorescentes. En particular, la captación fluorescente se expresa como una tasa que consiste en medir la MFI 60 por minuto.

En particular, el método de la presente divulgación comprende la etapa que consiste en comparar el nivel de recambio de membrana de reparación (por ejemplo, captación de colorante fluorescente) con un valor de referencia. Normalmente, dicho valor de referencia puede corresponder al nivel de recambio de membrana de reparación (por ejemplo, la captación fluorescente) medido en células diana que no se ponen en contacto con las 65

células efectoras inmunitarias. En particular, el valor de referencia es el nivel de recambio de membrana de reparación (por ejemplo, la captación fluorescente) medido en células diana de control que se ponen en contacto con las células efectoras inmunitarias. Por ejemplo, dichas células diana de control son normalmente líneas celulares, o células transformadas con VEB (por ejemplo, células JY).

5 En particular, se mide la captación de colorante fluorescente en combinación con al menos otro parámetro, tal como la muerte celular de las células diana que puede medirse mediante cualquier ensayo bien conocido en la técnica (por ejemplo, uso de un colorante de viabilidad (por ejemplo, eFluor780), que mide la apoptosis por anexina V).

10 El método de la presente divulgación puede encontrar usos en una amplia variedad de contextos.

15 Por ejemplo, el método puede usarse para cribar la capacidad de un agente de prueba (por ejemplo, un péptido, una molécula orgánica pequeña, una vacuna, un ácido nucleico, etc.) para inducir una citotoxicidad mediada por células restringidas por clase I dirigida contra un antígeno particular. Este método implicaría administrar al organismo objeto el agente de prueba, obtener una célula efectora del organismo; y medir la actividad citotóxica de la célula efectora contra una diana que presenta el antígeno. En particular, el método de la presente divulgación se usa para determinar si un sujeto ha estado expuesto a (o está expuesto actualmente a) uno o más antígenos particulares. Por ejemplo, el método de la divulgación puede usarse para ver si a un sujeto le queda cierta inmunidad de vacunas/inmunizaciones anteriores. Pueden usarse antígenos conocidos asociados con una vacuna dada, por ejemplo, para detectar y cuantificar cualquier célula efectora presente en una muestra biológica obtenida del sujeto. También puede usarse el método de la presente divulgación para identificar el mejor antígeno o combinaciones de antígenos para una vacuna particular (por ejemplo, para la vacuna antigripal de un año en particular). En particular, el método de la presente divulgación también es particularmente adecuado para optimizar un antígeno para su uso en una vacuna. El método implica normalmente proporcionar una pluralidad de antígenos que son candidatos para la vacuna; cribar los antígenos usando cualquiera de los métodos y la divulgación; y seleccionar un antígeno que sea capaz de aumentar el potencial lítico de las células efectoras inmunitarias.

30 El método de la presente divulgación también es particularmente adecuado para detectar la presencia de actividad efectora citotóxica de memoria.

35 En particular, el método de la presente divulgación puede usarse para determinar si un sujeto rechazaría un trasplante, en el que las células efectoras inmunitarias del receptor se ponen en contacto con células diana que provienen del donante.

En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para diagnosticar enfermedades autoinmunitarias y, más particularmente, para identificar la naturaleza del autoantígeno.

40 En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para evaluar la resistencia de algunas células diana (por ejemplo, células tumorales) a una respuesta citotóxica. En particular, el método de la presente divulgación es adecuado para evaluar la magnitud de la defensa sináptica de células diana frente a la perforación. Normalmente, se ponen en contacto células diana (por ejemplo, células tumorales) recién aisladas de un producto biológico obtenido de un paciente, opcionalmente pulsadas con un determinante antigénico, con el efector inmunológico. Luego se mide el nivel de recambio de membrana de reparación e indica la resistencia de las células diana a las respuestas citotóxicas. Normalmente, un mayor nivel de recambio de membrana (por ejemplo, en comparación con células diana de control tales como células transformadas con VEB (por ejemplo, células JY)) indica que dichas células diana son resistentes a la respuesta citotóxica.

50 En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para cribar un compuesto de prueba para determinar la capacidad de modular (es decir, aumentar o disminuir) el potencial lítico de una población de células efectoras inmunitarias.

55 Por consiguiente, un objeto adicional se refiere a un método para cribar un compuesto de prueba para determinar la capacidad de modular (es decir, aumentar o disminuir) el potencial lítico de una población de células efectoras inmunitarias que comprende las etapas que consisten en i) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica en presencia del compuesto de prueba, ii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, iii) comparar el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa ii) con el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del compuesto de prueba y iv) seleccionar el compuesto de prueba en el que hay una diferencia se detecta entre el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa ii) y el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del compuesto de prueba, en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante de estirilo.

65

El término "compuesto de prueba" se refiere generalmente a un material que se espera que aumente, disminuya, reduzca, suprima o inhiba el recambio de membrana de reparación. Normalmente, el compuesto de prueba incluye moléculas pequeñas, moléculas de alto peso molecular, mezcla de compuestos tales como extractos naturales o productos de cultivo de células o tejidos, material biológico tal como proteínas, anticuerpos, péptidos, ADN, ARN, oligonucleótidos antisentido, ARNi, aptámeros, ARNzimas y ADNzimas, o glucosa y lípidos, pero no se limita a los mismos. Los compuestos de prueba pueden ser polipéptidos que tienen menos de 20 residuos de aminoácidos, particularmente 6, 10, 12, 20 aa o más de 20, tales como 50 aa. Estos materiales se obtienen a partir de bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales y los métodos para obtener o construir bibliotecas se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse una biblioteca de productos químicos sintéticos de Maybridge Chemical Co. (R.U.), Comgenex (EE.UU.), Brandon Associates (EE.UU.), Microsource (EE.UU.) y Sigma-Aldrich (EE.UU.). La biblioteca química de origen natural puede obtenerse de Pan Laboratories (EE.UU.) y MycoSearch (EE.UU.). Pueden obtenerse compuestos de prueba adicionales mediante diversos métodos de construcción de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, bibliotecas biológicas, bibliotecas en fase de disolución o en fase sólida paralelas espacialmente direccionables. El compuesto de prueba de una biblioteca puede componerse de péptidos, peptoides, compuestos oligoméricos circulares o lineales, compuestos basados en moldes tales como benzodiazepina, hidantoína, biarilos, compuestos carbocíclicos y policíclicos tales como naftaleno, fenotiazina, acridina, esteroides y similares. derivados de hidratos de carbono y aminoácidos, dihidropiridina, benzhidrido y compuestos heterocíclicos tales como triazina, indol, tiazolidina y similares, pero sin limitarse a los mismos.

En particular, el compuesto de prueba se ha seleccionado previamente para modular la actividad o expresión de una proteína del punto de control inmunitario. Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína del punto de control inmunitario" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una molécula que se expresa por linfocitos T en la que o bien aumenta una señal (moléculas del punto de control estimuladoras) o bien disminuye una señal (moléculas del punto de control inhibitoras). Se reconoce en la técnica que las moléculas del punto de control inmunitario constituyen rutas del punto de control inmunitario similares a las rutas dependientes de CTLA-4 y PD-1 (véase, por ejemplo, Pardoll, 2012. *Nature Rev Cancer* 12:252-264; Mellman *et al.*, 2011. *Nature* 480:480-489). Los ejemplos de moléculas del punto de control inhibitoras incluyen B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, CD277, KIR, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT y VISTA. B7-H3, también llamada CD276, se entendió originalmente como una molécula coestimuladora, pero ahora se considera coinhibitoria. B7-H4, también llamada VTCN1, se expresa por células tumorales y macrófagos asociados a tumores y desempeña un papel en el escape tumoral. El atenuador de linfocitos B y T (BTLA), también llamado CD272, es un ligando de HVEM (mediador de entrada de herpesvirus). La expresión de BTLA en la superficie celular se regula gradualmente por disminución durante la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ humanos del fenotipo de células indiferenciadas al fenotipo de células efectoras; sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ humanos específicos de tumores expresan altos niveles de BTLA. CTLA-4, proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos y también llamada CD152, se sobreexpresa en los linfocitos Treg y sirve para controlar la proliferación de linfocitos T. KIR, receptor similar a inmunoglobulina de linfocitos T citotóxicos, es un receptor para moléculas de MHC de clase I en los linfocitos citolíticos naturales. LAG3, gen 3 de activación de linfocitos, actúa para suprimir una respuesta inmunitaria mediante la acción de los linfocitos Treg, así como efectos directos sobre los linfocitos T CD8⁺. TIM-3, abreviatura de dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 de mucina, se expresa en linfocitos T CD4⁺ humanos activados y regula las citocinas Th1 y Th17. TIM-3 actúa como regulador negativo de la función de Th1/Tc1 al desencadenar la muerte celular tras la interacción con su ligando, galectina-9. VISTA, abreviatura de supresor de Ig del dominio V de la activación de linfocitos T, se expresa principalmente en células hematopoyéticas, de modo que la expresión constante de VISTA en leucocitos dentro de los tumores puede permitir que el bloqueo de VISTA sea eficaz en una amplia gama de tumores sólidos. Tal como se usa en el presente documento, el término "PD-1" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína 1 de muerte celular programada (también conocida como CD279). PD-1 actúa como punto de control inmunitario, que al unirse a uno de sus ligandos, PD-L1 o PD-L2, permite a Shp2 desfosforilar CD28 e inhibe la activación de los linfocitos T.

En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para detectar el agotamiento de los linfocitos T en un paciente. Normalmente, se aísla una población de células efectoras inmunitarias (es decir, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) recientes) a partir de una muestra biológica obtenida del paciente y se usa en el ensayo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "agotamiento de linfocitos T" se refiere a un estado de disfunción de linfocitos T. El agotamiento de los linfocitos T generalmente surge durante muchas infecciones crónicas y cáncer. El agotamiento de los linfocitos T puede definirse por una función efectora deficiente, expresión sostenida de receptores inhibidores y/o un estado transcripcional distinto del de los linfocitos T de memoria o efectoras funcionales. El agotamiento de los linfocitos T generalmente impide el control óptimo de infecciones y tumores. Véase, por ejemplo, Wherry EJ, *Nat Immunol.* (2011) 12: 492-499, para obtener información adicional sobre el agotamiento de los linfocitos T. Normalmente, el agotamiento de los linfocitos T resulta de la unión de una proteína del punto de control inmunitario a al menos uno de sus ligandos (por ejemplo, PD1-1 y uno de sus ligandos PD-L1 o PD-L2).

En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para determinar que un paciente que padece cáncer logrará una respuesta con una terapia de bloqueo del punto de control inmunitario.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica e incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores de transmisión hemática. El término "cáncer" incluye enfermedades de la piel, los tejidos, órganos, huesos, cartílagos, sangre y vasos. El término "cáncer" abarca además cánceres primarios y metastásicos. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante métodos y composiciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, tubo gastrointestinal, encías, cabeza, riñón, hígado, pulmón, 10 nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de tipo pilomatrixoma; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; 15 adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis de colon familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma bronquiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxífilo; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; 20 adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma corticosuprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; 25 carcinoma medular; carcinoma lobulillar; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; 30 melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de diseminación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto de Müller; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; 35 sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; teratoma de tipo *struma ovarii*, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor óseo de células gigantes; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma 40 maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfatorio; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; 45 paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno de células grandes, difuso; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia 50 megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

Por consiguiente, un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de determinación de si un paciente que padece cáncer logrará una respuesta con un inhibidor del punto de control inmunitario, que comprende las etapas que consisten en i) aislar una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, 55 TIL) de una muestra biológica obtenida del paciente (por ejemplo, muestra de tejido tumoral o muestra de sangre), ii) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un período de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica en presencia del inhibidor del punto de control inmunitario, iii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, iv) comparar el nivel de 60 recambio de membrana de reparación determinado en la etapa iii) con el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del inhibidor del punto de control inmunitario y v) concluir que el paciente logrará una respuesta con el inhibidor del punto de control inmunitario cuando el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa iii) es mayor que el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del inhibidor del punto de control inmunitario, en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante 65 de estirilo.

Por tanto, el método es particularmente adecuado para discriminar los pacientes que responden (“respondedor”) de los que no responden. Tal como se usa en el presente documento, el término “respondedor” en el contexto de la presente divulgación se refiere a un paciente que logrará una respuesta, es decir, un paciente en el que el cáncer se erradica, reduce o mejora. Según la divulgación, los respondedores tienen una respuesta objetiva y, por tanto, el término no abarca a los pacientes que tienen un cáncer estabilizado de tal manera que la enfermedad no progresa después de la terapia del punto de control inmunitario. Un paciente que no responde o refractario incluye pacientes en quienes el cáncer no muestra reducción o mejora después de la terapia del punto de control inmunitario. Según la divulgación, el término “no respondedor” también incluye pacientes que tienen un cáncer estabilizado. Normalmente, la caracterización del paciente como respondedor o no respondedor puede realizarse con referencia a un criterio o conjunto de entrenamiento. El criterio puede ser el perfil de un paciente que se sabe que responde o no responde o, alternativamente, puede ser un valor numérico. Tales criterios predeterminados pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada, tal como una lista impresa o diagrama, un programa de software u otros medios. Cuando se concluye que el paciente no responde, el médico podría tomar la decisión de suspender la terapia del punto de control inmunitario para evitar más efectos secundarios adversos.

Los ejemplos de inhibidores del punto de control inmunitario incluyen antagonistas de PD-1, antagonistas de PD-L1, antagonistas de PD-L2, antagonistas de CTLA-4, antagonistas de VISTA, antagonistas de TIM-3, antagonistas de LAG-3, antagonistas de IDO, antagonistas de KIR2D, antagonistas de A2AR, antagonistas de B7-H3, antagonistas B7-H4 y antagonistas de BTLA.

En particular, los antagonistas del eje PD-1 (muerte programada-1) incluyen antagonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1), antagonista de PD-L1 (ligando de muerte programada-1) (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1) y antagonista de PD-L2 (ligando de muerte programada-2) (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L2). En particular, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (también conocido como nivolumab, MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 y Opdivo®), Merck 3475 (también conocido como pembrolizumab, MK-3475, lambrolizumab, Keytruda® y SCH-900475) y CT-011 (también conocido como pidlizumab, hBAT y hBAT-1). En particular, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 (también conocido como B7-DCIg). En particular, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2010/077634 A1. MEDI4736 es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en los documentos WO2011/066389 y US2013/034559. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538 o BMS-936558, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la patente estadounidense n.º 8.008.449 y el documento WO2006/121168. Merck 3745, también conocido como MK-3475 o SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la patente estadounidense n.º 8.345.509 y el documento WO2009/114335. CT-011 (pidilizumab), también conocido como hBAT o hBAT-1, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión PD-L2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342. Atezolimumab es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en la patente estadounidense n.º 8.217.149. Avelumab es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento US 20140341917. CA-170 es un antagonista de PD-1 descrito en los documentos WO2015033301 y WO2015033299. Otros anticuerpos anti-PD-1 se describen en la patente estadounidense n.º 8.609.089, los documentos US 2010028330 y/o US 20120114649. En particular, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 elegido entre nivolumab, pembrolizumab o pidilizumab. En particular, el antagonista de PD-L1 se selecciona del grupo que comprende avelumab, BMS-936559, CA-170, durvalumab, MCLA-145, SP142, STI-A1011, STIA1012, STI-A1010, STI-A1014, A110, KY1003 y atezolimumab y se prefiere avelumab, durvalumab o atezolimumab.

En particular, los antagonistas de CTLA-4 (antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos) se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos anti-CTLA-4, anticuerpos anti-CTLA-4 humanos, anticuerpos anti-CTLA-4 de ratón, anticuerpos anti-CTLA-4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA-4 de ratón y anticuerpos anti-CTLA-4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA-4 humanizados, anticuerpos anti-CTLA-4 monoclonales, anticuerpos anti-CTLA-4 policlonales, anticuerpos anti-CTLA-4 quiméricos, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA-4, anticuerpos anti-dominio de CTLA-4, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena sencilla, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena ligera, inhibidores de CTLA-4 que son agonistas de la ruta coestimuladora, los anticuerpos dados a conocer en la publicación PCT n.º WO 2001/014424, los anticuerpos dados a conocer en la publicación PCT n.º WO 2004/035607, los anticuerpos dados a conocer en la publicación estadounidense n.º 2005/0201994 y los anticuerpos dados a conocer en la patente europea concedida n.º EP 1212422 B. Se describen anticuerpos contra CTLA-4 adicionales en las patentes estadounidenses n.ºs 5.811.097; 5.855.887; 6.051.227; y 6.984.720; en las publicaciones PCT n.ºs WO 01/14424 y WO 00/37504; y en las publicaciones estadounidenses n.ºs 2002/0039581 y 2002/086014. Otros anticuerpos anti-CTLA-4 que pueden usarse en un método de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, los dados a conocer en: el documento WO 98/42752; patentes estadounidenses n.ºs 6.682.736 y 6.207.156; Hurwitz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17): 10067-10071 (1998); Camacho *et al.*, J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract n.º 2505 (2004) (anticuerpo CP-675206); Mokyr *et al.*, Cancer Res., 58:5301-5304 (1998), y las patentes estadounidenses n.ºs 5.977.318, 6.682.736, 7.109.003 y 7.132.281. Un anticuerpo contra CTLA-4 clínico

preferido es el anticuerpo monoclonal humano (también denominado MDX-010 e ipilimumab con n.º CAS 477202-00-9 y disponible de Medarex, Inc., Bloomsbury, N.J.) que se describe en el documento WO 01/14424. Con respecto a los antagonistas de CTLA-4 (anticuerpos), estos se conocen e incluyen tremelimumab (CP-675,206) e ipilimumab.

Otros inhibidores del punto de control inmunitario incluyen inhibidores del gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), tales como IMP321, una proteína de fusión de Ig soluble (Brignone *et al.*, 2007, J. Immunol. 179:4202-4211). Otros inhibidores del punto de control inmunitario incluyen los inhibidores de B7, tales como los inhibidores de B7-H3 y B7-H4. En particular, el anticuerpo anti-B7-H3 MGA271 (Loo *et al.*, 2012, Clin. Res. Cancer. 15 (18) de julio 3834). También se incluyen inhibidores de TIM-3 (dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 de mucina) (Fourcade *et al.*, 2010, J. Exp. Med. 207:2175-86 y Sakuishi *et al.*, 2010, J. Exp. Med. 207:2187-94). Tal como se usa en el presente documento, el término "TIM-3" tiene su significado general en la técnica y se refiere a inmunoglobulina de linfocitos T y molécula 3 que contiene dominio de mucina. El ligando natural de TIM-3 es la galectina 9 (Gal9). Por consiguiente, el término "inhibidor de TIM-3" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto, una sustancia o composición que puede inhibir la función de TIM-3. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir la expresión o actividad de TIM-3, modular o bloquear la ruta de señalización de TIM-3 y/o bloquear la unión de TIM-3 a galectina-9. Los anticuerpos que tienen especificidad por TIM-3 se conocen bien en la técnica y normalmente son los descritos en los documentos WO2011155607, WO2013006490 y WO2010117057.

En particular, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor deIDO. En el documento WO 2014150677 se describen ejemplos de inhibidores deIDO. Los ejemplos de inhibidores deIDO incluyen, sin limitación, 1-metil-triptófano (IMT), β -(3-benzofuranil)-alanina, β -(3-benzo(b)tienil)-alanina, 6-nitro-triptófano, 6-fluoro-triptófano, 4-metil-triptófano, 5-metil-triptófano, 6-metil-triptófano, 5-metoxi-triptófano, 5-hidroxi-triptófano, indol-3-carbinol, 3,3'-diindolilmetano, galato de epigalocatequina, 1,3-diacetato de 5-Br-4-Cl-indoxilo, 9-vinilcarbazol, acemetacina, 5-bromo-triptófano, diacetato de 5-bromoindoxilo, ácido 3-aminonaftoico, ditiocarbamato de pirrolidina, 4-fenilimidazol, un derivado de brasinina, un derivado de tiohidantoína, un derivado de β -carbolina o un derivado de brasilexina. Preferiblemente, el inhibidor deIDO se selecciona de 1-metil-triptófano, β -(3-benzofuranil)-alanina, 6-nitro-L-triptófano, ácido 3-amino-naftoico y β -[3-benzo(b)tienil]-alanina o un derivado o profármaco de la misma.

En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para estratificar pacientes que padecen cáncer basándose en una puntuación que combina la capacidad de sus CTL para proporcionar una respuesta citotóxica y la capacidad de las células tumorales para oponer resistencia a la respuesta citotóxica. En particular, la puntuación es particularmente adecuada para determinar si los pacientes lograrán una respuesta a un tratamiento particular (por ejemplo, terapia de bloqueo del punto de control inmunitario).

Por consiguiente, un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de determinación de si un paciente que padece un cáncer logrará una respuesta con un tratamiento que comprende la etapa que consiste en i) implementar el método de la presente divulgación para evaluar la capacidad de CTL para proporcionar una respuesta citotóxica y la capacidad de las células tumorales para oponer resistencia a la respuesta citotóxica; b) implementar un algoritmo con datos que comprenden los potenciales líticos determinados en la etapa i) para obtener una salida del algoritmo; c) determinar la probabilidad de que el paciente logre una respuesta al tratamiento.

El algoritmo de la presente divulgación puede realizarse mediante uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas informáticos para realizar funciones operando con datos de entrada y generando salida. El algoritmo también puede realizarse mediante, y el aparato también puede implementarse como, un conjunto de circuitos lógicos de uso especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de puertas programables en campo) o un ASIC (circuito integrado de aplicación específica). Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa informático incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores tanto de uso general como especial, y uno o más procesadores de cualquier clase de ordenador digital. Generalmente, un procesador recibirá instrucciones y datos de una memoria de sólo lectura o de una memoria de acceso aleatorio o de ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para ejecutar instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. Generalmente, un ordenador también incluirá, o estará acoplado operativamente para recibir datos de o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, magnetoópticos o discos ópticos. Sin embargo, no es necesario que un ordenador tenga tales dispositivos. Además, un ordenador puede estar integrado en otro dispositivo. Los medios legibles por ordenador adecuados para almacenar instrucciones y datos de programas informáticos incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo a modo de ejemplo dispositivos de memoria semiconductores, por ejemplo, EPROM, EEPROM y dispositivos de memoria flash; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles; discos magnetoópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria pueden complementarse con o incorporarse a conjuntos de circuitos lógicos de uso especial. Para proporcionar interacción con un usuario, el método de la presente divulgación puede implementarse en un ordenador que tiene un dispositivo de visualización, por ejemplo, en ejemplos no limitativos, un monitor CRT (tubo de rayos

catódicos) o LCD (pantalla de cristal líquido), para presentar visualmente información al usuario y un teclado y un dispositivo señalador, por ejemplo, un ratón o una bola de seguimiento, mediante el cual el usuario puede proporcionar entradas al ordenador. También pueden usarse otras clases de dispositivos para permitir la interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial, por ejemplo, retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil; y la entrada del usuario puede recibirse en cualquier forma, incluida la entrada acústica, de voz o táctil. Por consiguiente, en particular, el algoritmo puede implementarse en un sistema informático que incluye un componente de extremo posterior (*back-end*), por ejemplo, tal como un servidor de datos, o que incluye un componente de *middleware*, por ejemplo, un servidor de aplicaciones, o que incluye un componente de extremo frontal (*front-end*), por ejemplo, un ordenador cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador web a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación de la divulgación, o cualquier combinación de uno o más de dichos componentes de extremo posterior, *middleware* o extremo frontal. Los componentes del sistema pueden interconectarse mediante cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), por ejemplo, Internet. El sistema informático puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor generalmente están remotos entre sí y normalmente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de que los programas informáticos se ejecutan en los respectivos ordenadores y tienen una relación cliente-servidor entre sí.

Otros aspectos de la presente divulgación incluyen kits para llevar a cabo el método de la presente divulgación. Un kit puede incluir materiales útiles para preparar células efectoras inmunitarias y células diana, el colorante fluorescente, un dispositivo tal como una placa de 96 pocillos en la que pueden mezclarse e incubarse las células diana y efectoras, y los materiales necesarios para detectar la intensidad de fluorescencia. Pueden organizarse diferentes combinaciones de tales materiales como un kit para ayudar al experto en la técnica a llevar a cabo el método de la presente divulgación. En particular, el kit de la presente divulgación comprende además un microprocesador para implementar el algoritmo tal como se describió anteriormente y una pantalla visual y/o una señal audible que indica la probabilidad determinada por el microprocesador.

La divulgación se ilustrará con más detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1: La internalización de FM1-43 aumenta después del ataque de CTL en células diana resistentes y sensibles. Cinética temporal de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 en células D10 o JY no pulsadas o pulsadas con péptido antigénico 10 μ M. Se realizó el análisis con células diana solas o después de la conjugación con CTL durante 2, 5 ó 15 minutos. La MFI normalizada corresponde a: intensidad de fluorescencia media geométrica de la muestra - media geométrica de las células diana no teñidas. Los resultados se expresan como media \pm SEM de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. Se usó la prueba de Mann Whitney para datos independientes usando el software GraphPad Prism para determinar la significación estadística después de 15 minutos de conjugación. **P<0,01

Figura 2: El pretratamiento con BAPTA-AM disminuye la internalización de FM1-43 en células de melanoma. Análisis gráfico mediante FACS de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 en células de melanoma (D10) pretratadas o no con BAPTA-AM 50 μ M, ya sea solo o tras una conjugación de 5 minutos con CTL. Se presentan resultados típicos de uno de cada tres experimentos.

Figura 3: El silenciamiento con perforina disminuye significativamente la respuesta de membrana en las células de melanoma. (a) Análisis gráfico mediante FACS de la intensidad de fluorescencia de perforina en CTL previamente sometidos a electroporación con ARNip que selecciona como diana perforina o ARNip de control. (b) Cinética temporal de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 en células D10, ya sea no pulsadas (símbolos vacíos) o pulsadas (símbolos rellenos) después de la conjugación durante 2, 5 y 15 minutos con CTL previamente sometidos a electroporación con ARNip que selecciona como diana perforina o ARNip de control. Los datos proceden de cinco experimentos independientes (tres electroporaciones independientes). Se usó la prueba de Mann Whitney para datos independientes usando el software GraphPad Prism para determinar la significación estadística. ns P>0,05 *P<0,05 **P<0,01

Figura 4: La internalización de FM1-43 aumenta igualmente en CTL después de la activación por células diana resistentes o sensibles. (a, b) Cinética temporal de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 en CTL, ya sea solo o tras conjugación con células D10 (a) o JY (b) durante 2, 5 ó 15 minutos. La MFI normalizada corresponde a: intensidad de fluorescencia media geométrica de la muestra - media geométrica de CTL no teñidos. Los resultados se expresan como media \pm SEM de 4 experimentos independientes realizados por duplicado, los mismos experimentos que en la figura 1. Se usó la prueba de Mann Whitney para datos independientes usando el software GraphPad Prism para determinar la significación estadística después de 15 minutos de conjugación. *P<0,05

Figura 5: Captación de FM1-43 en CTL en comparación con la exposición a CD107a para medir la activación de CTL tras estimulación antigénica. Las células diana fueron o bien no pulsadas o bien pulsadas con diferentes concentraciones de péptido antigénico y se conjugaron con CTL relacionados durante 2, 5 ó 15 minutos. (A) Después de la conjugación, se cuantificó la exposición a CD107a en CTL mediante citometría de flujo. Los números indicados son porcentajes de células CD107a⁺. (B) Durante la conjugación, se añadieron al medio 10 µg/ml de FM1-43. Las intensidades de fluorescencia de FM1-43 se muestran en el lado de CTL de la sinapsis lítica. Los números indican porcentajes de células con un aumento de la captación de FM1-43 en comparación con la condición no pulsada. Estos resultados son típicos de dos experimentos independientes.

10 **Ejemplo**

Métodos

Células

15 Se usó un clon de CTL CD8⁺ humano restringido a HLA-A2 específico para el péptido NLVPMVATV (SEQ ID NO:1) de la proteína pp65 del citomegalovirus. Se usaron como células diana, células B humanas transformadas con VEB HLA-A2⁺ (células JY) y una línea celular de melanoma (D10). Se generaron y mantuvieron clones de linfocitos T y líneas celulares EBV-B tal como se describe (Khazen *et al.*, 2016). Las células D10 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. G. Spagnoli, Basilea, Suiza).

Silenciamiento de perforina

25 Usando un sistema de electroporación Gene PulserXcell de onda cuadrada (BioRad), se sometieron a electroporación 1.10⁶ CTL (en 100 µl de medio OptiMEM, Gibco) (300 V, 2 ms) con ARNip (300 pmol) que selecciona como diana perforina o ARNip de control. Los CTL se transfirieron a medio de cultivo RPMI/HS completo y tibio, se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ y se usaron 48 h ó 72 h después de la electroporación. La eficacia del silenciamiento se comprobó a nivel de ARN mediante experimentos de RT-qPCR (no mostrados) y a nivel de proteína tras tinción intracelular mediante citometría de flujo.

30 Tinción con perforina por citometría de flujo.

Los CTL previamente transfectados con ARNip se fijaron con paraformaldehído al 3%, se permeabilizaron con saponina al 0,1% (en PBS/BSA al 3%/HEPES) y se tiñeron con un Acn humano anti-perforina (10 µg/ml, clon δG9, BD Biosciences). El anticuerpo primario fue seguido por Ac específico de isotipo de cabra anti-ratón marcado con Alexa 488. Se adquirieron muestras usando un aparato de FACS MACSQuant 10 (MiltenyiBiotec).

Ensayo de recambio de membrana

40 Carga de células diana: se dejaron las células diana no pulsadas o se pulsaron con péptido antigénico 10 µM durante 2 h a 37 °C/5 % de CO₂. Se lavaron las células tres veces, se resuspendieron a de 15 x 10³ a 30 x 10³ células en 25 µl de RPMI/FCS al 5 %/HEPES y se transfirieron a una placa con fondo en U de 96 pocillos.

45 En algunos experimentos, se trataron previamente (2 h) o no células D10 con BAPTA-AM 50 µM (ThermoFisher Scientific).

Tinción de CTL: se tiñeron CTL con CellTrace Violet 10 µM (CTV, ThermoFisher Scientific) durante 30 minutos a 37 °C/5 % de CO₂, se lavaron tres veces y se resuspendieron a de 30 x 10³ a 60 x 10³ células por 25 µl de RPMI/FCS al 5 %/HEPES.

50 Conjugación de CTL y células diana: se añadieron 25 µl de CTL (teñidos previamente con CTV) en pocillos que contenían células diana pulsadas o no pulsadas en una razón de CTL/célula diana de 2:1. Se añadieron previamente células diana a tres placas con fondo en U de 96 pocillos (una placa por punto de tiempo: 2, 5 ó 15 minutos). Se preparó una disolución prediluida de FM1-43 (ThermoFisher Scientific) a 20 µg/ml. Se añadieron 55 50 µl de esta disolución a pocillos que contenían en 50 µl de las células de interés para tener una concentración final de 10 µg/ml. Se añadió la disolución de FM1-43 a los pocillos al mismo tiempo que los CTL. Las células sedimentaron durante 1 minuto a 455 g y se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante 2, 5 ó 15 minutos.

60 Al final del tiempo de incubación, se añadieron a cada pocillo en hielo 100 µl de tampón de FACS frío (PBS FBS al 1 % HS al 1 % azida al 0,1 %) complementado con EDTA 0,5 mM. Las células sedimentaron durante 2 minutos a 455 g a 4 °C y se lavaron con 200 µl de tampón de FACS/EDTA 0,5 mM.

65 Tinción de viabilidad: Después del lavado, se añadió a cada pocillo el colorante de viabilidad fijable eFluor780 (ThermoFisher Scientific, dilución 1000X según las instrucciones del fabricante) en 50 µl de tampón de FACS. Se mantuvieron las células en hielo durante 20 minutos y se lavaron dos veces en tampón de FACS. Se adquirieron

muestras usando un aparato de FACS MACSQuant 10 (MiltenyiBiotec).

Exposición a CD107a de CTL

- 5 Las células JY se dejaron no pulsadas o se pulsaron con 0,01 nM a 10 μ M de péptido antigénico durante 2 h a 37 °C/5 % de CO₂, se lavaron tres veces y posteriormente se transfirieron a una placa con fondo en U de 96 pocillos a 20 x 10³ células por 50 μ l de RPMI FCS al 5 %/HEPES. Los CTL se tiñeron previamente con CMFDA 0,1 μ M durante 20 min a 37 °C/5 % de CO₂, se lavaron y se añadieron a las células diana en una razón de dos CTL frente a una célula diana en 50 μ l de RPMI FCS al 5 %/HEPES. Las células sedimentaron durante 1 min, 10 455 g y se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante 2 min, 5 min o 15 min. Al final de cada tiempo de incubación, se resuspendieron los cocultivos de CTL/células diana y se lavaron en PBS enfriado con hielo que contenía EDTA 2 mM. Se tiñeron las células con colorante de viabilidad fijable eFluor 450 (eBiosciences) y con anticuerpo anti-CD107a humano PE-Cy7 (10 μ g/ml; BD Biosciences) en hielo a 4 °C durante 30 minutos en tampón de FACS. Se adquirieron muestras usando el aparato MACS Quant Analyzer VYB (Miltenyi). Se analizaron los 15 resultados usando el software FlowJo 10.

Resultados

- 20 Para detectar directamente las primeras etapas de la resistencia de las células tumorales al ataque de CTL en la sinapsis lítica, se desarrolló un método para monitorizar la interacción CTL/células tumorales en presencia de FM1-43, un colorante lipófilo fluorescente que se intercala rápidamente en la bicapa lipídica durante el recambio de membrana que acompaña a la reparación de la membrana plasmática. Este ensayo nos permite medir el recambio de membrana de reparación de las células tumorales bajo ataque de CTL mediante análisis por FACS a nivel de toda la población de células tumorales. Se aplicó inicialmente este enfoque para comparar la respuesta 25 de células de melanoma (células D10) al ataque de CTL en comparación con células diana convencionales que son sensibles a la citotoxicidad mediada por CTL (células B transformadas con VEB, células JY). Tal como se muestra en la figura 1, se observa que, en ausencia de CTL y en condiciones en las que las células diana no estaban cargadas con el péptido antigénico específico, FM1-43 se intercalaba en la membrana D10 a un ritmo más rápido en comparación con las células JY, lo que indica que las células de melanoma presentan un reciclaje 30 de la membrana basal más activo que las células diana convencionales. Tras el ataque de CTL, la tasa de captación de FM1-43 aumentó en ambas células diana, lo que indica que el ataque de CTL desencadena una actividad de reparación de membrana que mejora la captación basal de FM1-43.

- 35 En conjunto, los resultados anteriores muestran que el presente método puede usarse para controlar el recambio de la membrana basal y la cinética y la extensión de la respuesta de células diana al ataque de CTL mediante análisis por FACS.

- 40 También muestran que las células diana resistentes, tales como las células de melanoma, tienen un recambio de membrana más rápido, tanto en condiciones basales como tras el ataque de CTL, lo que sugiere que este mecanismo podría contribuir a la resistencia de las células diana a la citotoxicidad mediada por perforina.

- 45 A continuación, se investigó si la captación de la membrana de FM1-43 en condiciones basales y tras el ataque de CTL dependía de Ca²⁺. Para ello, células D10, cargadas previamente con el péptido antigénico, se pretrataron o no con BAPTA-AM 50 μ M (un quelante de Ca²⁺) y se conjugaron con CTL. Se observó una disminución de la captación de FM1-43 en células pretratadas con BAPTA-AM en comparación con las células no tratadas (figura 2). Estos resultados respaldan la idea de que el recambio de membrana de reparación observado forma parte de un proceso ancestral de reparación de la membrana basado en la entrada de Ca²⁺ extracelular y el sellado de la membrana mediante la activación de la exocitosis de los lisosomas y el recambio de membrana (Cheng *et al.*, 2015).

- 50 Finalmente se investigó si la inducción observada del recambio de membrana de reparación en las células diana sería una consecuencia directa de la formación de poros mediada por perforina en su membrana plasmática. Para abordar este punto, se silenció la expresión de perforina en CTL usando un enfoque de ARNip (figura 3A). En estas condiciones, se redujo la respuesta de reparación de las células de melanoma (figura 3B). En conjunto, 55 estos resultados indican que el desencadenamiento de la reparación de membrana está directamente relacionado con el potencial lítico de los CTL.

- 60 Un aspecto interesante del presente ensayo es que, al seleccionar CTL (véase la sección de materiales y métodos), puede verificarse en la misma muestra el nivel de activación de estas células tras la conjugación con las células diana. De hecho, tras el acoplamiento de TCR, los CTL experimentan la activación de su ruta endocítica/exocítica, lo que da como resultado la captación de FM1-43. La captación de FM1-43 en CTL puede usarse para verificar si una determinada población de células diana ha desencadenado eficientemente la secreción de gránulos líticos en CTL. Por ejemplo, en la figura 4 se muestra que, aunque las células de melanoma experimentan una reparación de membrana exacerbada en comparación con las células JY, ambas 65 células desencadenan de manera similar la secreción de gránulos líticos en CTL.

Se propone usar la captación de FM1-43 en conjugados de CTL/célula diana para detectar no sólo la respuesta de defensa de la célula diana en la sinapsis lítica, sino también la rápida activación de CTL. Se han descrito varios métodos para detectar la activación de CTL mediante análisis por FACS. Entre esos métodos, el método de referencia es la regulación por incremento del marcador lisosómico CD107a en la superficie de CTL (Bertrand *et al.*, 2013). La exposición de este marcador en la superficie celular indica que el CTL ha secretado su gránulo lítico y de alguna manera se considera la "prueba irrefutable" del CTL.

Se comparó la exposición a FM1-43 con CD107a en una cohorte de CTL estimuladas por células diana convencionales (células B transformadas con VEB, JY) pulsadas con una concentración creciente del péptido antigénico. Tal como se muestra en las figuras 5A-B, este análisis reveló que la captación de FM1-43 es más rápida (se detecta antes) y más sensible (se detecta a menores concentraciones antigénicas) en comparación con la exposición a CD107a de referencia.

También es importante señalar que, al basarse en la adición de una sonda fluorescente al medio de cultivo, el método de captación de FM1-43 es menos costoso que la medición de la exposición a CD107a que se basa en el uso de anticuerpos marcados con fluorocromo y puede usarse en suspensiones celulares de células derivadas de tumores primarios sin ninguna manipulación de las células. Obviamente, esto no es posible cuando se tiñe para CD107a, ya que las células deben lavarse y mantenerse a 4 °C para la tinción. Existe una variante de tinción para CD107a en la que se añaden anticuerpos anti-CD107a marcados con fluorocromo al medio de cultivo en una especie de procedimiento de carga de células vivas, pero estos métodos normalmente requieren horas de interacción intercelular para proporcionar resultados detectables (Betts *et al.*, 2003). Por tanto, son en gran medida menos eficientes que el método de captación de FM1-43.

En conclusión, la técnica de captación de FM1-43 tiene las cualidades solicitadas para convertirse en el método de referencia para medir la desgranulación de CTL humanos en la salud y la enfermedad. De hecho, la medición de la captación de FM1-43 es más eficiente, rápida y menos costosa que la medición de la exposición a CD107a para evaluar la activación de CTL.

30 Bibliografía

En la totalidad de esta solicitud, diversa bibliografía describe el estado de la técnica a la que pertenece esta divulgación.

Andrews, N.W., Almeida, P.E., and Corrotte, M. (2014). Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol.* 24, 734-742.

Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K.A., Clarke, C.J.P., Lukoyanova, N., Saibil, H., Whisstock, J.C., Voskoboinik, I., *et al.* (2009). The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly. *Immunity* 30, 684-695.

Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., Koup, R.A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods.* 281, 65-78.

Bertrand, F., Muller, S., Roh, K.-H., Laurent, C., Dupre, L., and Valitutti, S. (2013). An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 6073-6078.

Caramalho, Í., Faroudi, M., Padovan, E., Müller, S., and Valitutti, S. (2009). Visualizing CTL/melanoma cell interactions: multiple hits must be delivered for tumour cell annihilation. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 3834-3846.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541, 321-330.

Cheng, X., Zhang, X., Yu, L., and Xu, H. (2015). Calcium signaling in membrane repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 45, 24-31.

Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P., Muller, S., and Valitutti, S. (2003). Cutting Edge: T Lymphocyte Activation by Repeated Immunological Synapse Formation and Intermittent Signaling. *J. Immunol.* 171, 1128-1132.

Horn, A., and Jaiswal, J.K. (2018). Cellular mechanisms and signals that coordinate plasma membrane repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3751-3770.

Khazen, R., Müller, S., Gaudenzio, N., Espinosa, E., Puissegur, M.-P., and Valitutti, S. (2016). Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat. Commun.* 7, 10823.

- 5 Law, R.H.P., Lukoyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., *et al.* (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 468, 447-451.
- 10 Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukoyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., and Whisstock, J.C. (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* 121, 2659-2668.
- 15 de Saint Basile, G., Ménasché, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 568-579.
- Schumacher, T.N., Kesmir, C., and van Buuren, M.M. (2015). Biomarkers in Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* 27, 12-14.
- 20 Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat. Immunol.* 12, 770-777.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de someter a ensayo el potencial lítico de una población de células efectoras inmunitarias que comprende las etapas que consisten en i) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica, ii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, en el que dicho nivel se correlaciona con el potencial lítico de la población de células efectoras inmunitarias y en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante de estirilo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que las células efectoras inmunitarias se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos citolíticos naturales (células NK) y linfocitos T citolíticos naturales (células NKT).
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que las células efectoras inmunitarias son linfocitos T citotóxicos infiltrantes de tumor.
4. Método según de la reivindicación 1, en el que las células diana son células tumorales.
5. Método según la reivindicación 1, en el que las células diana se pulsan previamente con al menos un antígeno.
6. Método según la reivindicación 5, en el que las células diana se pulsan con un péptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos de un agente infeccioso o un antígeno tumoral.
7. Método según la reivindicación 1, en el que las células efectoras inmunitarias y/o las células diana se aíslan de una muestra biológica obtenida de un paciente.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido tal como una muestra de tejido tumoral, o una muestra de líquido corporal tal como una muestra de sangre.
9. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa que consiste en medir el nivel de recambio de membrana en la población de células efectoras inmunitarias.
10. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de medir la captación del colorante lipófilo fluorescente por la población de células efectoras inmunitarias.
11. Método según la reivindicación 1, en el que el colorante de estirilo se selecciona del grupo que consiste en FM1-43, FM4-64, FM14-68, FM2-10, FM4-84, FM1-84, FM14-27, FM14-29, FM3-25, FM3-14, FM5-55, RH414, FM6-55, FM10-75, FM1-81, FM9-49, FM4-95, FM4-59 y FM9-40.
12. Método según la reivindicación 1, en el que se mide la captación de colorante fluorescente usando dispositivos que miden la fluorescencia celular, tales como una máquina de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).
13. Método según la reivindicación 1, que comprende la etapa que consiste en comparar el nivel de recambio de membrana de reparación con un valor de referencia.
14. Uso del método según la reivindicación 1 en un ensayo de diagnóstico.
15. Método *in vitro* o método de cribado de un compuesto de prueba para determinar la capacidad de modular el potencial lítico de una población de células efectoras inmunitarias que comprende las etapas que consisten en i) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un periodo suficiente de tiempo y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica en presencia del compuesto de prueba, ii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, iii) comparar el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa ii) con el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del compuesto de prueba y iv) seleccionar el compuesto de prueba en el que se detecta una diferencia entre el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa ii) y el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del compuesto de prueba, en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante de estirilo.
16. Método según la reivindicación 15, en el que el colorante de estirilo se selecciona del grupo que

consiste en FM1-43, FM4-64, FM14-68, FM2-10, FM4-84, FM1-84, FM14-27, FM14-29, FM3-25, FM3-14, FM5-55, RH414, FM6-55, FM10-75, FM1-81, FM9-49, FM4-95, FM4-59 y FM9-40.

- 5 17. Método según la reivindicación 15, en el que el compuesto de prueba se ha seleccionado previamente para modular la actividad o expresión de una proteína del punto de control inmunitario.
18. Uso del método según la reivindicación 1, para detectar el agotamiento de linfocitos T en un paciente.
- 10 19. Método de determinación de si un paciente que padece cáncer logrará una respuesta con un inhibidor del punto de control inmunitario, que comprende las etapas que consisten en i) aislar una población de células efectoras inmunitarias de una muestra biológica obtenida del paciente, ii) poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con una población de células diana durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para permitir que la población de células efectoras inmunitarias induzca una respuesta citotóxica en presencia del inhibidor del punto de control inmunitario, 15 iii) medir el nivel de recambio de membrana de reparación en la población de células diana midiendo la captación de un colorante lipófilo fluorescente por la población de células diana, iv) comparar el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa iii) con el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del inhibidor del punto de control inmunitario y v) concluir que el paciente logrará una respuesta con el inhibidor del punto de control inmunitario cuando el nivel de recambio de membrana de reparación determinado en la etapa iii) es mayor que el nivel de recambio de membrana de reparación medido en ausencia del inhibidor del punto de control inmunitario, en el que el colorante lipófilo fluorescente es un colorante de estirilo.
- 20 20. Método según la reivindicación 19, en el que el colorante de estirilo se selecciona del grupo que consiste en FM1-43, FM4-64, FM14-68, FM2-10, FM4-84, FM1-84, FM14-27, FM14-29, FM3-25, FM3-25 25 14, FM5-55, RH414, FM6-55, FM10-75, FM1-81, FM9-49, FM4-95, FM4-59 y FM9-40.
- 30 21. Método de determinación de si un paciente que padece un cáncer logrará una respuesta con un tratamiento que comprende la etapa que consiste en i) implementar el método según la reivindicación 1 para evaluar la capacidad de los CTL para proporcionar una respuesta citotóxica y la capacidad de las células tumorales para oponer resistencia a la respuesta citotóxica; b) implementar un algoritmo con datos que comprenden los potenciales líticos determinados en la etapa i) para obtener una salida del algoritmo; c) determinar la probabilidad de que el paciente logre una respuesta al tratamiento.

35

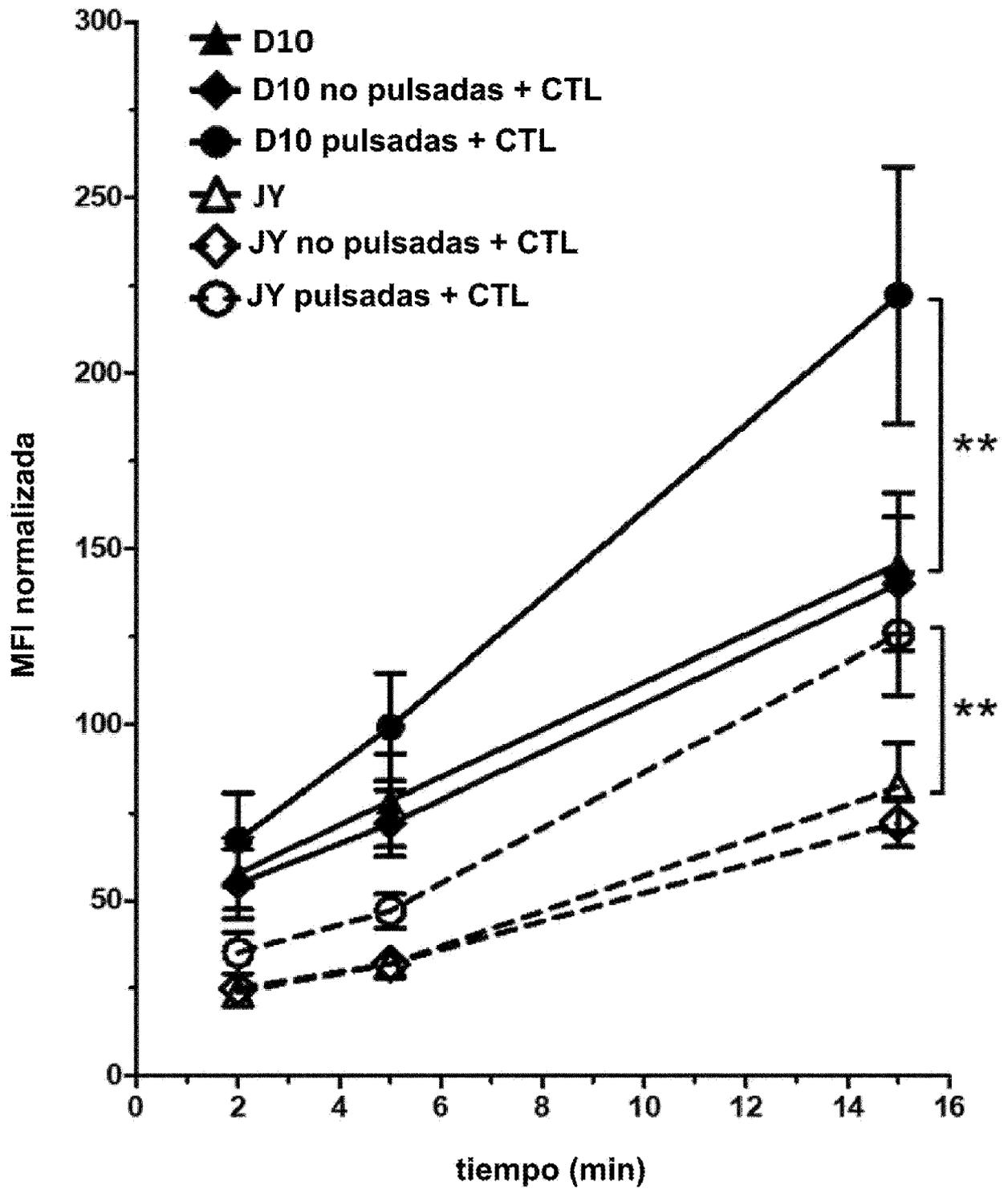


Figura 1

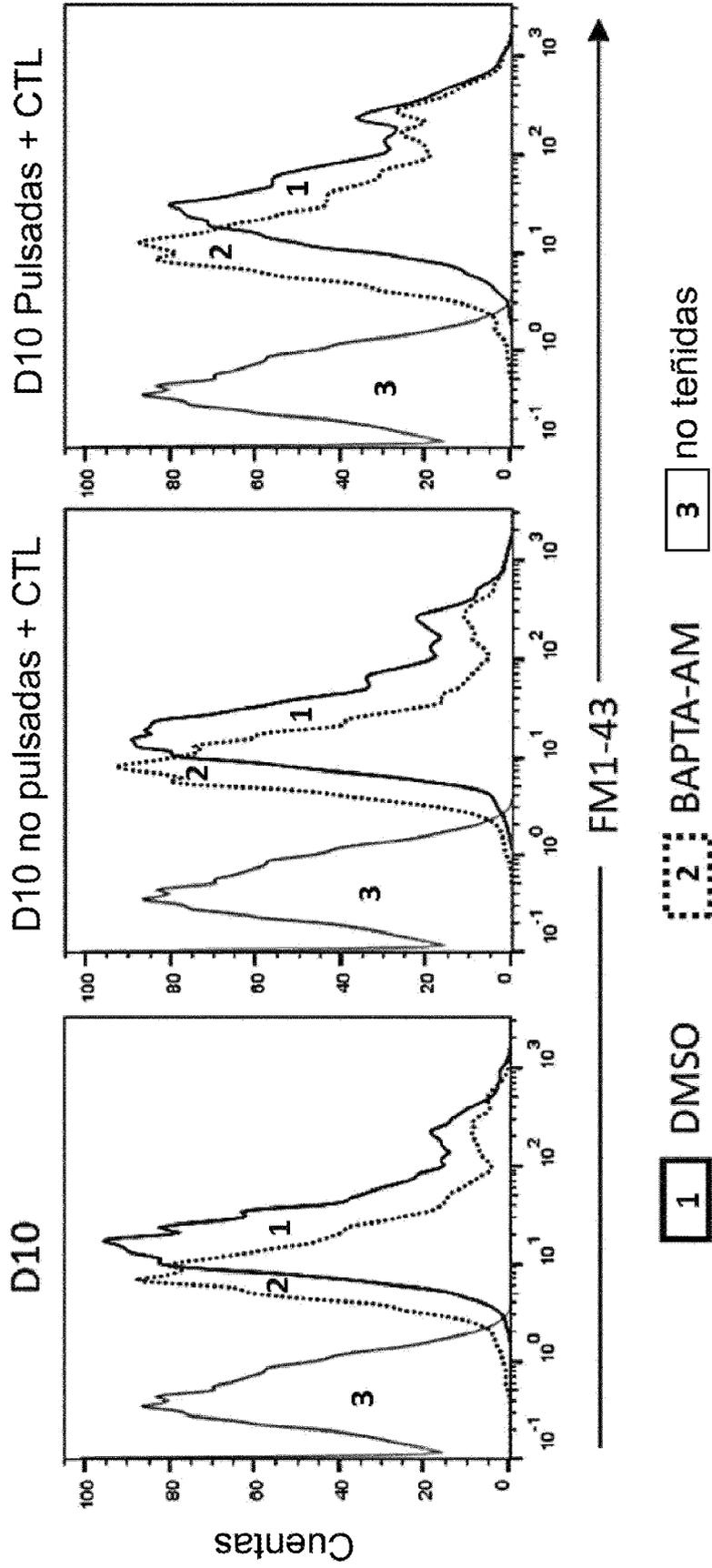
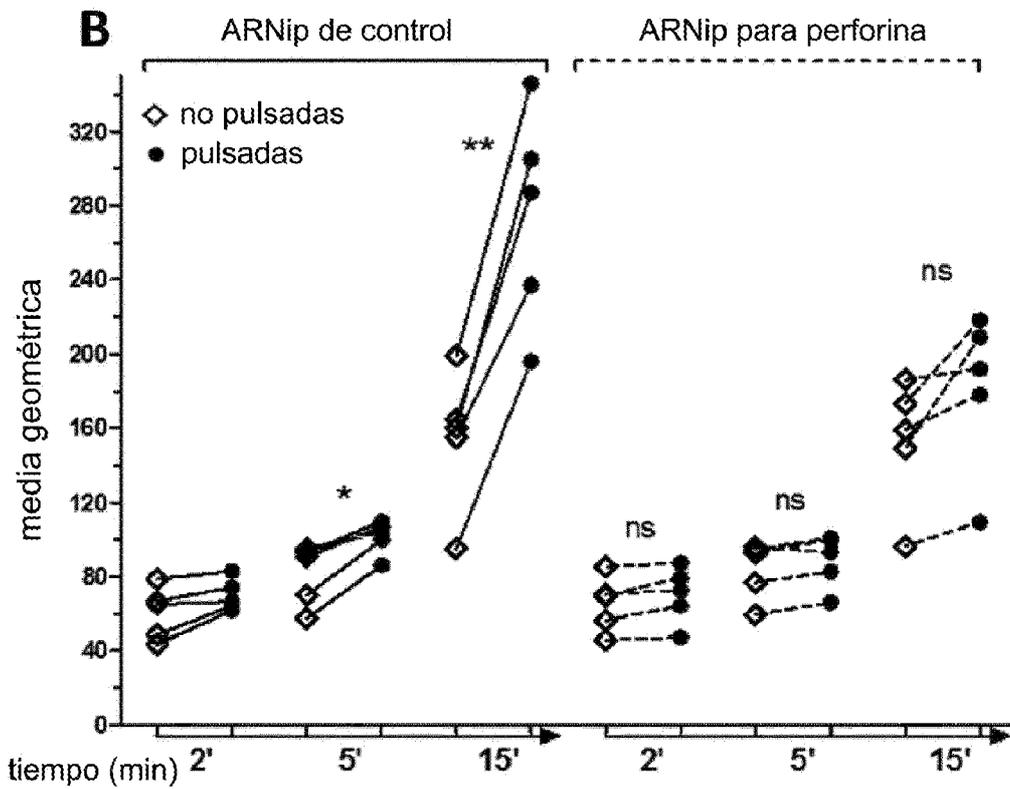
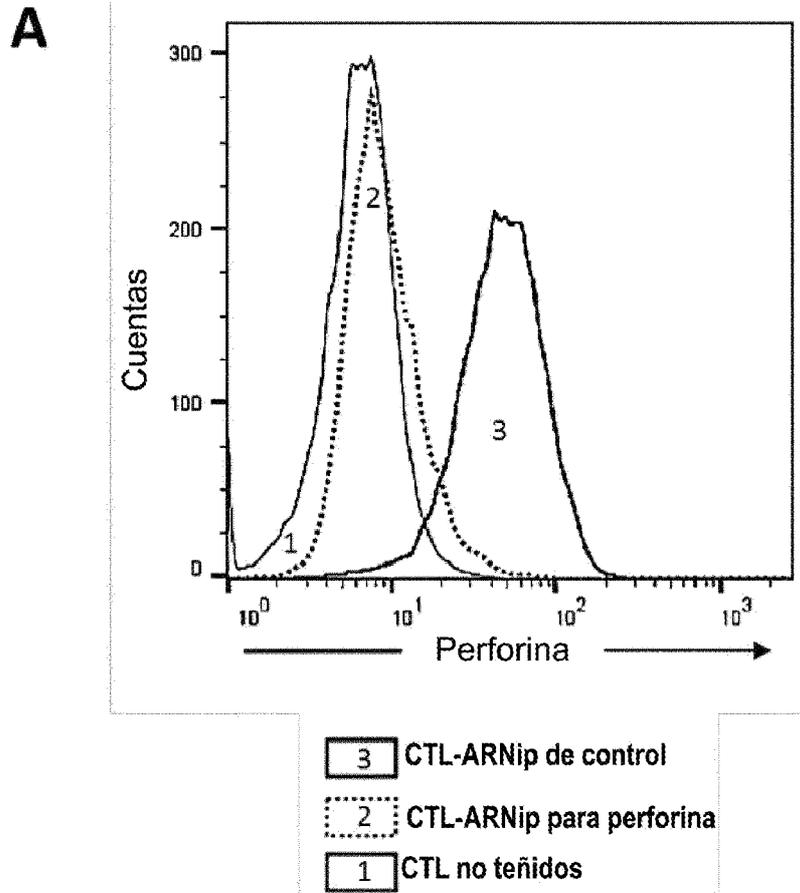


Figura 2



Figuras 3A y 3B

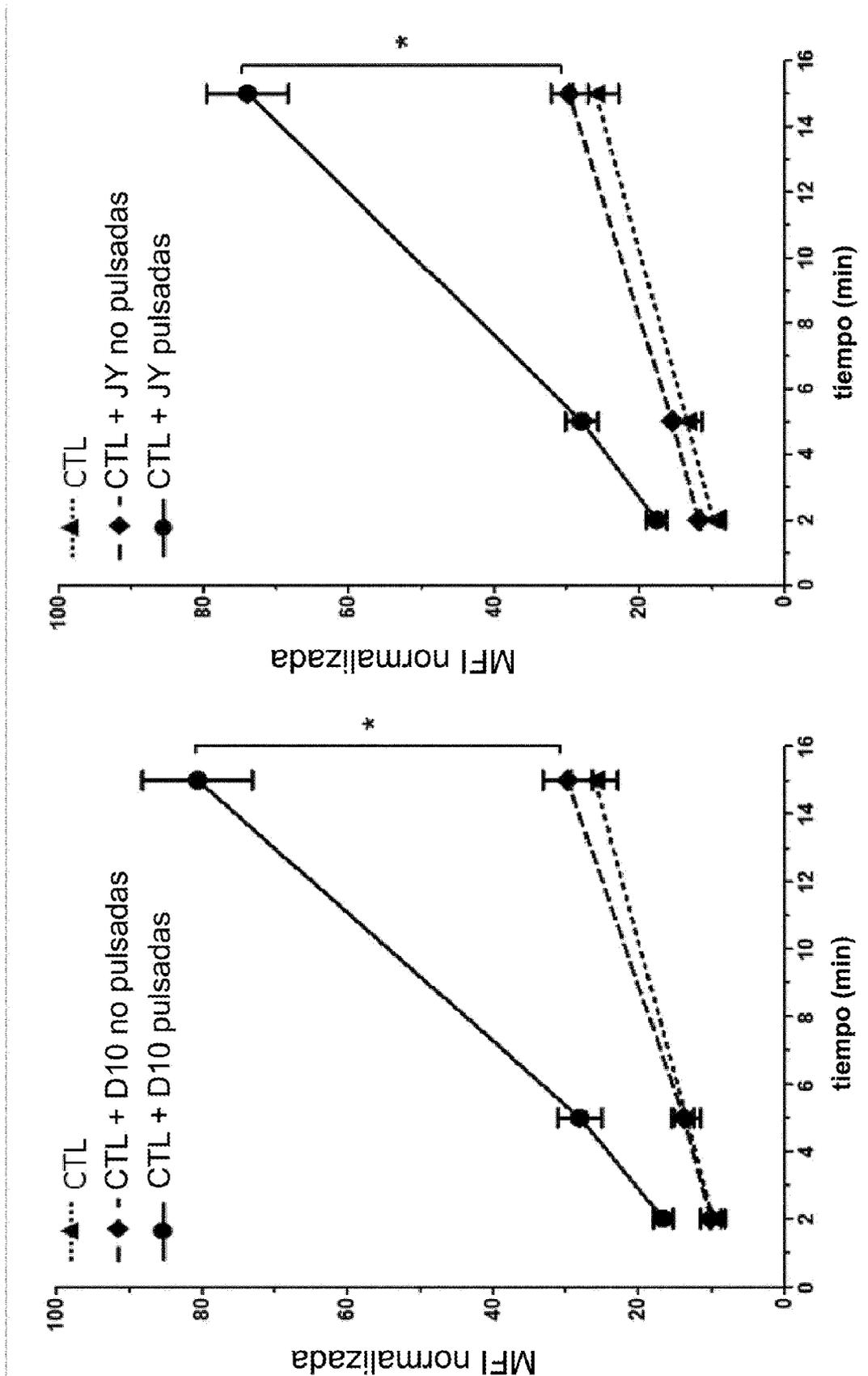
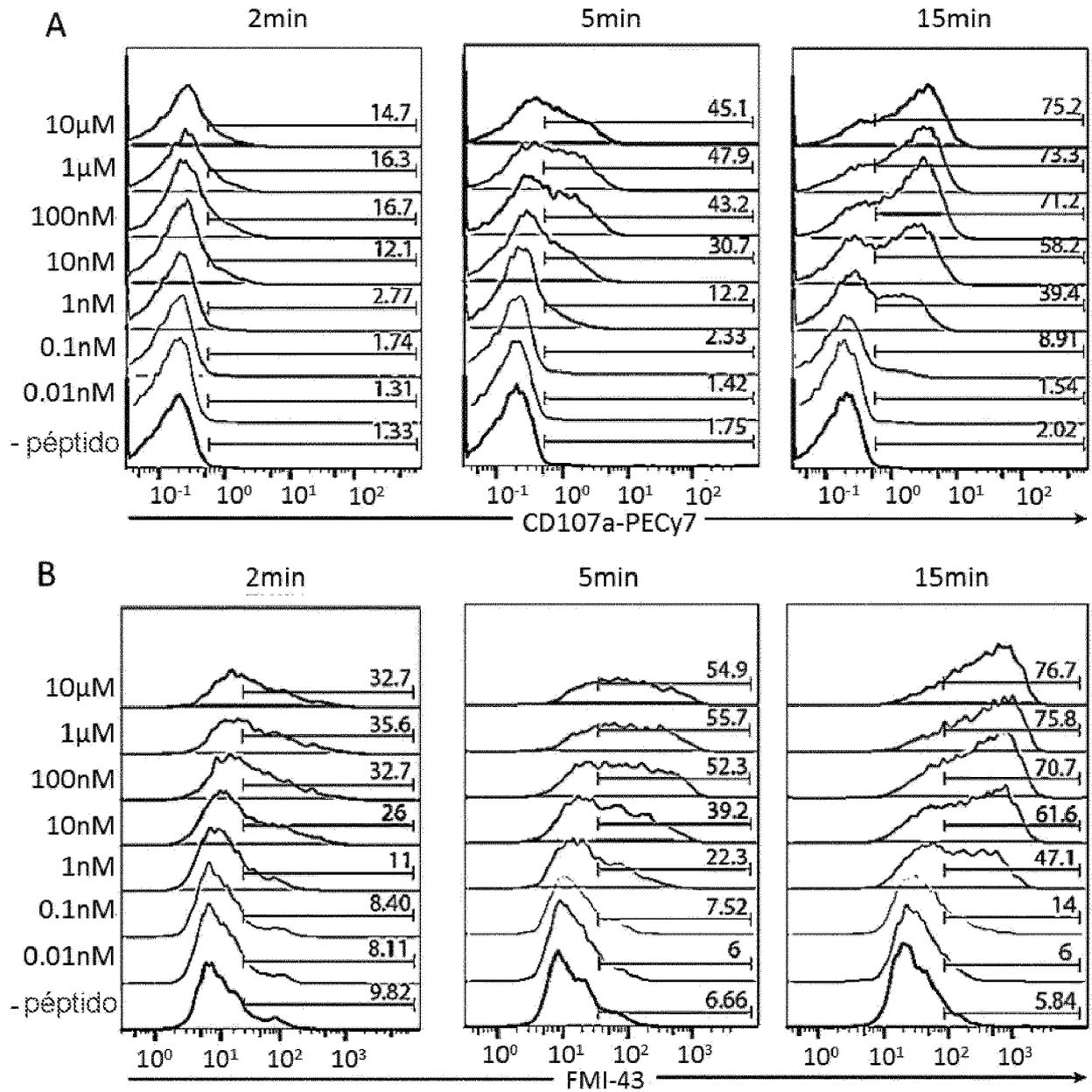


Figura 4



Figuras 5A y 5B