

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 027**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2010** **E 10175578 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012** **EP 2306191**

54 Título: **Uso de CD154 para la identificación y separación de células T no-reguladoras a partir de una mezcla de células T reguladoras**

30 Prioridad:

10.09.2009 DE 102009040716

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2013

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)
Friedrich-Ebert-Str 68
51429 Bergisch-Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**SCHÖNBRUNN, ANNE;
KOHLE, SIEGFRIED;
THIEL, ANDREAS;
MÜLLER, ROBIN y
FRENTSCH, MARCO**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 399 027 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

Uso de CD154 para la identificación y separación de células T no-reguladoras a partir de una mezcla de células T reguladoras.

Campo de la invención

La invención se relaciona generalmente con el campo de la inmunología, particularmente el campo de la separación de células. La presente invención se refiere al uso de la molécula CD154 (ligando de CD40) para identificar y separar células-T no-reguladoras (células-T convencionales) de una mezcla que comprende células-T reguladoras.

Antecedentes de la invención

Las células-T específicas, las cuales suprimen activamente las respuestas inmunes no deseadas tales como, por ejemplo, a estructuras endógenas (auto-antígenos) existen en el organismo. Ellas se denominan como células-T reguladoras (Treg). Las células-T reguladoras se involucran esencialmente en el mantenimiento a lo largo de la vida de la tolerancia periférica a auto-antígenos. Ellas se producen en el timo, pero la actividad de las mismas se reduce grandemente con el aumento de la edad.

Las células-T reguladoras pueden llevar a la supresión de las respuestas anti-tumorales como se muestra por ejemplo por Onizuka y otros, Cancer Res.1999, vol.59, p.3128-3133 y Shimizu y otros, J. Immunol. 1999, vol. 163, p.5211-5218, debido a que muchos antígenos tumorales representan auto-antígenos clásicos. En contraste, números reducidos de Treg o alteraciones funcionales en Treg pueden llevar a enfermedades autoinmunes durante las cuales las estructuras endógenas se atacan de una manera no controlada como sustancias foráneas o patógenos.

Las Treg se involucran en el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica, en que ellas inhiben la activación de las células T auto-reactivas. Ellas son capaces de suprimir tanto la producción de citocinas como también la proliferación de tales células-T potencialmente patogénicas. Una etapa esencial en la identificación de células-T auxiliaadoras reguladoras fue la caracterización de las células T-auxiliadoras CD4+, las cuales incluyen la proteína de la cadena-alfa constitutiva del receptor de interleucina-2 (IL-2) (CD25) como una proteína de la superficie de la membrana. La significación funcional y el mecanismo molecular exacto de la supresión de estas células-T reguladoras CD25+CD4+ y además la manera en la cual ellas surgen no se elucidó hasta ahora. A partir de que el receptor CD25 se expresa además por subpoblaciones de células T no-reguladoras, este marcador solo se puede usar provisionalmente para analizar y concentrar Treg. CD25 no puede, sin embargo, usarse particularmente para identificar y separar células-T reguladoras activadas específicas por el antígeno.

El aislamiento de Treg sin células-T convencionales contaminantes y particularmente de Treg específicas por ciertos antígenos es, sin embargo, uno de los grandes objetivos terapéuticos. Esto es además cierto para el análisis de las Treg y las Treg específicas por el antígeno. Las Treg específicas por (auto) antígenos son un medio específico para suprimir respuestas inmunes no deseadas tales como, por ejemplo, reacciones autoinmunes en la artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), aterosclerosis (AS), diabetes, y soriasis. Otras respuestas inmunes no deseadas en las cuales las Treg pudieran representar un medio específico son GvHD (enfermedad de injerto contra huésped) en trasplantes alogénicos de células madres o el rechazo de trasplante en trasplante de órganos (Hara y otros, J. Immunol. 166: 3789-3796(2001); Taylor y otros, J. Exp. Med. 193: 1311-1318 (2001)). Las alergias representan además respuestas inmunes no deseadas para las cuales están disponibles hasta la fecha solamente unas pocas opciones terapéuticas. Un tratamiento terapéutico con Treg, el cual se basa en el principio natural de la tolerancia periférica y que se demostró en muchos modelos experimentales que no involucra ningún efecto colateral en comparación con medicamentos convencionales y que podría ser curativo.

En relación con el potencial establecido de las Treg, las moléculas y mecanismos involucrados en la supresión, y marcadores de Treg confiables, son de gran importancia. Un marcador biológico molecular de Treg, el represor de la transcripción FoxP3, el cual pertenece a la familia-cabeza de tecedor, se reconoce en la materia.(Hori y otros, (2003) Science 99(5609): 1057-61). Adicionalmente, las células-T reguladoras se pueden identificar sobre las bases de la expresión de la molécula CD25 (Thornton y Shevach (1998) J. Exp. Med. 188 287-296; Sakaguchi y otros (1995) J. Immunol. 155 1151-1164).

Hasta la fecha, sin embargo, no fue posible identificar y aislar aquellas células Treg, las cuales reconocen un antígeno específico. Esto sería posible si las Treg activadas específicamente se pudieran separar. Esto sería un pre-requisito para terapias específicas con Treg, por ejemplo, para enfermedades autoinmunes en las cuales la reacción autoinmune subyacente a la enfermedad se debe suprimir, pero no aquellas reacciones inmunes que se lanzan contra células tumorales.

De acuerdo con Choi y otros, (2004, JLB), no existen evidencias de que CD137 (4-1 BB) se pueda emplear como un marcador discriminativo para Treg contra CD25. En una solicitud internacional (documento WO 2007/110249), se describe que las Treg selectivamente expresan CD137 aproximadamente 4 horas después de la activación, mientras

las células-T convencionales solamente comienzan a expresar CD137 después de aproximadamente 12 a 16 horas. Aunque esta ventana de tiempo temprana se puede usar para aislar las células-T reguladoras solamente unas horas después de la activación, este método es propenso a errores y por lo tanto es de poco uso práctico. Una fuerte variabilidad en el estado de activación de las células-T después de obtenerlas a partir de la sangre o los tejidos así como también la variabilidad de la cinética especial de CD137 en las células-T individuales lleva a una contaminación de las células-T reguladoras con células-T convencionales, la cual puede ser pequeña o grande, en dependencia del momento del aislamiento, y la cual limita dramáticamente el uso de las células aisladas. Al usar un momento temprano para separar las células, la contaminación se puede mantener pequeña, aunque el rendimiento de las células-T reguladoras aisladas decrece extremadamente, a partir de que no todas las células-T reguladoras se convirtieron todavía a positivas para CD137. Como el número de células-T reguladoras, en particular de las células-T reguladoras específicas por el antígeno es pequeño para comenzar, la reducción del rendimiento disminuye el uso del método, a partir de que muchos usos terapéuticos no se pueden aplicar.

Por lo tanto, hasta la fecha, no es posible identificar y separar las células efectoras contaminantes (por ejemplo negativas para FoxP3 y/o positivas para citocinas) a partir de las células-T reguladoras (definidas por la expresión de marcadores conocidos, en particular CD25, CD25+CD127-, GITR+) o para diferenciar células-T reguladoras activadas por el antígeno de células-T convencionales activadas.

El término "células T convencionales" como se usa en la presente descripción se refiere a todas las células T las cuales no pertenecen a las células T reguladoras "de origen natural" las cuales se caracterizan por una expresión estable del factor de transcripción Foxp3+ y las cuales típicamente expresan CD25 constitutivamente y no o bajos niveles de CD127. Las células T convencionales especialmente se refiere a células T las cuales ejercen funciones efectoras activadoras inmunes, es decir producción de citocinas efectoras tales como IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17, IL-22.

Es así difícil, basado en el estado actual de la técnica, identificar y/o aislar las células-T reguladoras. Los marcadores descritos hasta ahora no permiten la posibilidad de identificar la totalidad de las células-T reguladoras, porque no todas las células-T reguladoras expresan marcadores específicos definidos. Por consiguiente, solamente es posible identificar y/o separar subpoblaciones, tales como, por ejemplo, solamente las Treg, las cuales expresan fuertemente el receptor CD25. Además, varias otras subpoblaciones celulares que tienen los mismos marcadores de superficie celular (tales como CD4 para Th1 y Th2, u otras células-Th o CD25 para células-T o B activadas) no se pueden distinguir de las células-T reguladoras.

Particularmente, no es posible identificar Treg activadas después de la estimulación con antígenos definidos por medio de marcadores de activación específicos. Aunque la activación de las células-Th reguladoras lleva al aumento de la expresión de CD25 y CD38, ellos se expresan igual que todos los otros marcadores de activación de células T descritos además en otras células T, así que no es posible separar ninguna Treg específica por el antígeno por medio de marcadores de activación específicos.

Frentsch y otros (2005, Nat Med. 11(10):1118-24) y la solicitud EP 1 420 253 describen que CD154 (ligando de CD40) se expresa en todas las células-T activadas, en donde no se hace distinción por los autores entre las células-T convencionales y reguladoras con respecto a la expresión de CD154. Por lo tanto, no se conoce si CD154 se puede usar para discriminar entre células-T convencionales activadas y reguladoras activadas.

Rausch y otros, (2008, Infection y Immunity, 76(5):1908-1919) describieron que ellos fueron capaces de identificar células Teff y Treg específicas por un antígeno murino por la expresión de CD154. Los autores de hecho asumieron que CD154 se expresa además por Treg activadas por el antígeno y pudiera usarse para la selección positiva de Treg activadas por el antígeno. Por lo tanto, estos datos murinos no sugieren usar CD154 como un marcador discriminativo entre células-T convencionales activadas y reguladoras activadas.

La mayoría de los métodos que se usan para identificar y/o aislar células-Th reguladoras sobre la base de la expresión de un marcador de superficie particular dependen del reconocimiento de un marcador y la unión de un anticuerpo. Cuando no es posible usar un único marcador para identificar y/o aislar un tipo celular particular, es necesario encontrar una combinación de marcadores y los anticuerpos afines (Levings y otros, J Exp. Med. 193 (11): 1295-1302 (2001)). Tales experimentos pueden en la práctica ser muy complicados y difíciles de llevar a cabo. Además, es posible que la unión de los anticuerpos influya en la actividad de las células diana o la expresión de otros marcadores, así tienen una influencia negativa en el proceso de identificación y/o separación con los otros anticuerpos.

Hasta la fecha, no se llevó a cabo una identificación específica y/o separación de células-T reguladoras exclusivamente vivas. El único marcador específico descrito hasta la fecha, FoxP3, puede además, de acuerdo con investigaciones recientes, inducirse también en células-T no-reguladoras. (Fontenot J.D. 2003; Hori S. y otros 2003). Ya que FoxP3 se presenta como una proteína intracelular, no es posible además de acuerdo al presente estado de la materia identificar y/o aislar células reguladoras vivas, por ejemplo, sobre la base de un anticuerpo FoxP3. Otra vez, el problema que surge es que solamente se puede identificar la totalidad de las Treg, pero no Treg específicas

por antígenos pre-definidos. Una identificación confiable y/o separación de Treg y en particular Treg específicas por el antígeno por lo tanto no ha sido posible.

BD Pharmingen TM: "Hoja de datos técnicos: PE conjugated mouse anti-human CD137 (4-1 BB)", 7 de mayo de 2005, http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/hu-man/live/web_enabled/36005X_555956.pdf, además describe que el marcador CD137 representa un marcador de activación para todas las células-T. La solicitud del documento WO 2005/124346 también describe meramente a CD137 como un marcador en CD4⁺ CD25⁺; sin embargo la publicación no describe que CD4⁺CD25⁺ se expresa especialmente en un momento particular durante la activación del marcador CD137 cuando se compara a células-T CD4⁺ CD25⁻. Los autores del documento WO 2005/124346 A describen, por otro lado, que ambas poblaciones celulares de células T CD4⁺ CD25⁺ y CD4⁺ CD25⁻ expresan el marcador CD137 en la misma medida después de la activación de las mismas. Los documentos mencionados representan la opinión en la materia de que el marcador CD137 no se puede usar como un marcador discriminatorio para células-Treg CD25⁺ contra células-T CD25⁻. Particularmente, BD Pharmingen TM describe un anticuerpo de ratón anti CD137 humano conjugado a PE. El documento WO 2005/124346 describe la co-estimulación de células de ratón T-reg CD4⁺ CD25⁺ aisladas frescas a través de CD137. Las células-Treg no se estimulan a través de CD137, sino a través de la presencia de un estímulo que actúa fuertemente tal como CD3. Sobre la base de las descripciones mencionadas, un técnico con experiencia asume que la mayoría de las asíllamadas células-Treg frescas no expresan CD137. Por ejemplo, se muestra en la figura 5 del documento WO 2005/124346 que la co-estimulación con 4-1 BBL ejerce propiedades activadoras particularmente además sobre células CD25⁻. Se describe en la figura 1d de forma no ambigua que células T CD4⁺ CD25⁺ y CD4⁺ CD25⁻ ambas expresan CD137 durante la activación, de forma que las publicaciones mencionadas no motivan a los técnicos con experiencia a usar CD137 para la presentación o aislamiento específicos de células Treg CD4⁺ CD25⁺ a partir de mezclas de células.

En el documento WO 2007/110249 A, se describe que Treg expresa CD137 selectivamente dentro de un marco de tiempo de activación (solamente después de aproximadamente 4 horas), mientras que las células-T convencionales comienzan a expresar CD137 después de aproximadamente 12 a 16 horas. Aunque este marco de tiempo se puede usar para identificar las células-T reguladoras, la variabilidad de la cinética de expresión, así como también el corto tiempo de estimulación, lleva a una disminución masiva de la pureza celular y el rendimiento. Tran y otros, mostraron que "TGF-beta latente (LAP)", y CD121 a/b se expresan por células Treg las cuales se activaron policlonalmente por 24-48 horas y se pueden usar para seleccionar Treg (Tran y otros, Blood 2009, 113:5125-5133). Similarmente GARP (LRCC32), el cual actúa como un anclaje a la superficie para LAP se expresa por células Treg activadas policlonalmente (Tran y otros Proc Natl Acad Sci USA. 2009, 106(32):13445-50). Sin embargo, no hay un método disponible para el enriquecimiento de células Treg activadas que permita la depleción simultánea de células T activadas convencionales y células T Foxp3+ con expresión variable de Foxp3.

Sumario de la invención

La presente invención se relaciona con un método para identificar y separar células-T no reguladoras (células-T convencionales) a partir de una mezcla que comprende las células-T reguladoras usando la molécula CD154 (ligando de CD40) a través de la depleción de las células-T CD154+ de la mezcla o en combinación con la selección positiva adicional de Treg usando marcadores para las células-T reguladoras, tales como por ejemplo, CD25, GITR, CTLA4 o marcadores de las células-T reguladoras activadas, tales como, por ejemplo, CD137, "TGF-beta latente (LAP)", GARP (LRCC32), CD121a/b. La invención se relaciona además con un kit que comprende un anticuerpo para detectar CD154 y al menos un anticuerpo adicional para detectar marcadores para las células-T reguladoras activadas. Los anticuerpos se pueden acoplar a colorantes fluorescentes o micropartículas magnéticas. Las células-T reguladoras y las células-T convencionales se pueden activar ya sea con antígenos policlonales o específicos. La activación se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo* y se puede llevar a cabo en células-T no separadas o células-T reguladoras preseleccionadas, por ejemplo, usando CD25, CTLA-4 (CD152),

GITR u otro marcador típico para las células-T reguladoras.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra que poco tiempo después de la estimulación una gran fracción de T reg CD137+ Treg expresa además CD154.

Las Figuras 2 y 3 muestran que dentro de la mezcla de células-T CD137+ las células-T CD154- expresan más FoxP3.

La Figura 4 muestra que dentro de la mezcla de células-T CD137+ solamente las células-T CD154+ expresan citocinas efectoras.

La Figura 5 muestra la ventana de tiempo para clasificar y reanalizar las células-T CD137/CD154 doble- y simple positivas.

La Figura 6 muestra que solamente las células Treg CD154- muestran propiedades supresoras.

La Figura 7 muestra que Treg CD25⁺⁺ FoxP3⁺ contienen células-T CD154⁺.

La Figura 8 muestra que Helios se expresa casi exclusivamente por Treg CD137⁺CD154⁻.

La Figura 9 muestra que las Treg CD137⁺ CD154⁻ muestran una mayor de-metilación del promotor FoxP3.

La Figura 10 muestra que CD137 y CD154 además se expresan en expansión

Treg de varias poblaciones.

Las Figuras 11 y 12 muestran que la depleción de Treg CD154⁺ a partir de un cultivo de expansión aumenta la pureza de FoxP3 y la estabilidad a largo plazo de la expresión de FoxP3.

Descripción detallada de la invención

Se encontró sorpresivamente un método para eliminar células-T convencionales, vivas de mezclas que comprenden células-T reguladoras, en donde CD154 se puede usar como un marcador y en donde los anticuerpos específicos para CD154 se pueden usar para identificar y/o eliminar células-T convencionales activadas. Al combinar la depleción de células-T convencionales con una etapa de separación (anterior o consecutiva) en la cual las células-T reguladoras se identifican y enriquecen (ya sea usando marcadores convencionales para células-T reguladoras no activadas, como CD25, CTLA4 o GITR, o a través del etiquetado con un marcador para células Treg activadas como CD137, TGF-beta latente (LAP), GARP (LRRC32), CD121a/b), la pureza y rendimiento de las células-T reguladoras activadas puede aumentar grandemente, lo cual es un pre-requisito para muchas aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

Como se usa en la presente descripción, los términos "depleción", "depletar" y similares, en el contexto del aislamiento, purificación o enriquecimiento celular, tienen el significado normal en la materia, y se refiere a la eliminación de las células especificadas (por ejemplo, células CD154⁺) de una mezcla o población de partida de células. Los métodos para la depleción se conocen bien en la materia y se describen en la presente descripción, e incluyen, por ejemplo, clasificación por FACS o MACs en los cuales células especificadas en una población (por ejemplo, células CD154⁺) se etiquetan y eliminan de la población de células lo que resulta en una nueva población en la cual las células especificadas están ausentes o presentes en una proporción más baja que en la población de partida. Se reconocerá que "depleción" no requiere que las células especificadas se eliminen completamente o que la nueva población esté enteramente libre de las células especificadas. Típicamente, depletar células especificadas de una población significa reducir la representación de tales células (medida como un porcentaje de todas las células en la población) en al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%.

Como se usa en la presente descripción, el término "selección positiva", en el contexto del aislamiento, purificación y enriquecimiento celular, tiene el significado normal en la materia, y se refiere al enriquecimiento de células especificadas (por ejemplo, células CD137⁺) de una mezcla o población de células de partida. Los métodos para la selección positiva se conocen bien en la materia y se describen en la presente descripción, e incluyen, por ejemplo, clasificación por FACS o MACS en los cuales las células especificadas en una población (por ejemplo, células CD137⁺) se etiquetan y aíslan de una población de células en que las células aisladas resultan en una nueva población en la cual las células especificadas están presentes en una proporción más alta que en la población de partida.

Por lo tanto, la invención se refiere a la enseñanza de que las células-T convencionales activadas, particularmente, las activadas específicamente por el antígeno se pueden separar de Treg CD4⁺ CD25⁺ que además se activaron usando el marcador CD154 a través de la depleción de las células CD154⁺ de la mezcla, a partir de que las Treg no expresan ningún CD154.

Además, las células reguladoras se pueden identificar y/o separar positivamente a través de la expresión de uno y/o varios marcadores. Para esto, se pueden usar todos los marcadores conocidos a un experto en la materia para identificar y/o separar Treg de Treg activadas. Preferentemente, los marcadores CD137, CD25, CTLA-4 (antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos), GITR (receptor de TNF inducido por glucocorticoide), FoxP3, IL-10, CD69, ICOS, OX40 y TGFbeta se pueden usar solos o en combinación. Para esto, todos los marcadores conocidos a un experto en la materia para excluir o depletar células no-reguladoras se pueden usar en combinación. Particularmente preferido es el uso de CD137 como un marcador para células reguladoras activadas, vivas. Las células-T reguladoras activadas ya sea se identifican o separan directamente, o la activación se induce a través de células, proteínas, péptidos, patógenos u otras sustancias adicionales.

El método puede usarse para el enriquecimiento de las células-T reguladoras activadas en una mezcla de células.

Una modalidad preferida del método es la separación de las células-T reguladoras activadas de una mezcla que comprende las células-T reguladoras activadas y células-T convencionales activadas al poner en contacto la mezcla de células con una molécula que se une a CD154 y la depleción de las células-T CD154+ de la mezcla y se obtiene así una población de células-T reguladoras activadas.

Otra modalidad preferida del método es la separación de las células-T reguladoras activadas de una mezcla que comprende las células-T reguladoras activadas y células-T convencionales activadas, el método comprende las etapas:

1. poner en contacto la mezcla de células con

- a. una molécula que se une al CD154 y la depleción de las células-T CD154+ de la mezcla; o
- b. una molécula que se une a un marcador para las células-T reguladoras o para las células-T reguladoras activadas y la selección positiva de las células que se unen a dicha molécula de unión;

2. poner en contacto

- a. las células de la etapa 1) a) con una molécula que se une al marcador para las células-T reguladoras o para las células-T reguladoras activadas y la selección positiva de las células que se unen a dicha molécula de unión y se obtiene así una población de células-T reguladoras activadas; o
- b. las células de la etapa 1) b) con una molécula que se une a CD154 y la depleción de las células-T CD154+ y se obtiene así una población de células-T reguladoras activadas.

La invención se relaciona a células-T de mamíferos, en particular, humanos, ratones, ratas, conejos o perros. El ADN y las secuencias de proteínas de las moléculas que se refieren aquí se conocen por un experto en la materia y están disponibles públicamente en las bases de datos. Cuando sea necesario, las secuencias pueden obtenerse además usando técnicas de laboratorio de rutina.

La invención además se relaciona al uso de CD154 así como sus homólogos y fragmentos. Los homólogos pueden mostrar, por ejemplo, una homología de al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % con el CD154 humano. Los fragmentos de CD154 son sin limitación, es decir cada fragmento de la molécula CD154 de origen natural se puede usar de acuerdo a la invención. Los anticuerpos, por ejemplo, solamente se unen a una parte de la molécula CD154.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la sorprendente enseñanza de que el uso de CD154 como un marcador de selección negativo aumenta grandemente la ventana de tiempo para el uso del marcador CD137 para la selección positiva de Treg y que de 2 a 24 horas después de la activación, las células-T reguladoras pueden aislarse con gran pureza y rendimiento.

Las células separadas pueden recogerse en un recipiente adecuado, por ejemplo, un tubo de recolección que permita la supervivencia y /o crecimiento de las células. Diferentes medios están comercialmente disponibles y se pueden usar en base a las necesidades del tipo de célula identificada y/o separada. Tales medios pueden ser, por ejemplo DMEM, HBSS, DPBS, RPMI, medio de Iscove, X-VIVO™ etc., los cuales se pueden a menudo suplementar con suero fetal de ternera, suero humano o sustitutos de suero.

Las poblaciones de células identificadas y/o separadas se pueden usar inmediatamente o se pueden cultivar *in vitro* después del aislamiento. Posteriormente, las células se pueden congelar o se pueden concentrar antes de separarse. En caso de que las células tengan que almacenarse por períodos de tiempo más largos se prefiere hacer esto a aproximadamente - 80 °C o en nitrógeno líquido para asegurar que las células se pueden usar nuevamente después de descongeladas. Para este propósito, las células normalmente se almacenan en DMSO y/o FCS/HS junto con un medio, glucosa etc. Inmediatamente después de que las células se descongelan, las células pueden ya sea usarse directamente para propósitos terapéuticos o en experimentos *in vitro* o se pueden expandir y/o diferenciar usando factores de crecimiento, antígenos, células etc.

Se prefiere identificar y aislar las células-Th reguladoras activadas a partir de una mezcla de células. Las células-Th reguladoras se identifican y/o separan de la muestra de células de mamíferos, en particular a partir de humanos y preferentemente a partir de pacientes. Las células pueden derivarse, por ejemplo, de muestras de sangre que contienen células inmunes (fluidos corporales como peritoneal, cerebral-espina, líquido pleural y/o líquido sinovial), lavados líquidos de órganos vacíos (vías respiratorias, pulmones), homogenados y aspirados de ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y/u otros tejidos linfáticos. Las células se pueden mover de tejidos animales (por ejemplo del bazo o ganglio linfático de un animal). Las células además pueden ser parte de una muestra de sangre, por ejemplo de un sujeto o un paciente humano, particularmente preferidas de una muestra de sangre periférica.

Además se proporcionan kits para practicar los métodos de la invención. Los kits pueden comprender un empaque con al menos un recipiente (por ejemplo, vial) que comprende un anticuerpo para la detección de CD154 para separar células T convencionales activadas y las instrucciones para tal separación, así como amortiguadores, etiquetas, etc. adecuados. El kit puede además incluir reactivos para separar una Th reguladora activada en base a los antígenos expresados por las células, un número de ejemplos de los cuales se describen en la presente descripción (por ejemplo CD137, CD25).

En algunas modalidades el marcador para las células-T reguladoras activadas es por ejemplo, CD137, TGF-beta latente (LAP), GARP (LRRC32) y CD121a/b. En algunas modalidades el kit comprende un primer recipiente que contiene anti-CD154 y al menos 1, al menos 2, o al menos 3 recipientes adicionales que cada uno contiene un anticuerpo que une células-T. En algunas modalidades cada uno de los anticuerpos del kit se etiqueta diferente de forma que se pueden distinguir.

Las células-Th reguladoras activadas son directamente capaces de suprimir la actividad de células-T. Se mostró en modelos animales que las células-T reguladoras activadas pueden prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes, de reacciones de rechazo de trasplante, y reacciones alérgicas. Se asume en analogía a ello que las células-T reguladoras activadas pueden además suprimir el desarrollo de reacciones inmunes crónicas en los humanos. Usando el marcador CD137, las células-Th reguladoras activadas se identifican y/o separan específicamente. Preferentemente, las células-Th reguladoras activadas con el fenotipo CD4+ CD25+ FoxP3+ se identifican y/o separan previamente. La activación ocurre preferentemente usando antígenos específicos, por ejemplo péptidos, proteínas, o patógenos o células o estímulos policlonales, por ejemplo compuestos químicos como PMA/ionomicina, superantígenos como SEB o PHA o anticuerpos estimuladores como CD3 (o mezclas de estos). En una modalidad adicional de la invención, las células-Th reguladoras vivas se identifican y/o se aíslan directamente ex-vivo.

Usando el marcador CD154, las células-Th convencionales activadas pueden preferentemente eliminarse de mezclas que comprenden células-T reguladoras, en particular, cuando se usan simultáneamente o posteriormente métodos de selección adicionales usando marcadores para células reguladoras activadas/no-activadas (CD25, CD137), lo cual permite un uso preferido de la invención para identificar aislar células-Th reguladoras específicas por el antígeno.

Después de obtener una mezcla de células de un paciente y/o un sujeto, las células-T reguladoras se pueden enriquecer usando, por ejemplo, CD25. Posteriormente, estas células pueden estimularse con un antígeno particular. Para este propósito se pueden usar, anticuerpos, péptidos, proteínas, sustancias químicas (o mezclas de estos), o patógenos o células. Después de un tiempo de activación particular, las células-Th reguladoras se identifican y/o separan, por ejemplo, a través del uso del marcador CD137. Así, células-Th reguladoras específicas por el antígeno se identifican y/o separan preferentemente.

Las células, las cuales se separan de acuerdo a la invención, usualmente provienen de una fuente in vivo y por lo tanto reflejan el estado inmunológico del donante con respecto al número, origen, y especificidad del receptor del antígeno de la célula-T de la célula Treg. Esta información se puede usar en diagnósticos que se refieren a trastornos inmunológicos, por ejemplo, la inmunosupresión relacionada con el cáncer, trastornos autoinmunes, estados atópicos, etc.

Adicionalmente, las células-Th del paciente se pueden poner en contacto in vitro con células, antígenos separados de extractos de células o proteínas de un donante de órgano antes o después del trasplante. Posteriormente, las células-Th reguladoras activadas se identifican y/o separan usando el marcador CD137 después de un período de activación adecuado.

Las células se pueden identificar y/o separar de acuerdo a todos los métodos conocidos por el experto en la materia. Se prefiere para la identificación de células en particular la clasificación de células (por ejemplo clasificación magnética de células (MACS)), clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), ELISA, PCR y/o todos los microscopios de fluorescencia conocidos en la materia. Particularmente se prefiere el uso de la citometría de flujo (FACS). Para la separación de las células, aquellos sistemas de separación en los cuales las células se clasifican usando un campo magnético (por ejemplo MACS) o a través de la citometría de flujo (FACS) se prefieren particularmente. Más aun, se prefiere que la expresión de CD137 se mida después de la estimulación.

Las células-Th reguladoras se estimulan por sustancias conocidas para un experto en la materia. La expresión de CD137 se mide 1 a 18 horas después de la estimulación.. Preferentemente, la expresión se mide 3 a 8 horas después de la estimulación.

De acuerdo con la invención, CD154 es un marcador para células-T convencionales activadas en un marco de tiempo de aproximadamente 0 a 18 horas después de la activación, preferido en aproximadamente 0 a 12 horas, particularmente preferido en aproximadamente 0 a 10 horas, especialmente preferido en aproximadamente 1 a 8 horas, con la mayor preferencia en aproximadamente 3 a 8 horas, en particular en 4 horas.

El momento óptimo preferido para la separación es el momento al cual un número máximo de las células-T reguladoras activadas expresa CD137 y al cual un número mínimo de las células no reguladoras expresa CD137. Este momento se puede determinar por un técnico con experiencia a través de un análisis de la expresión de CD137 a diferentes momentos después de la estimulación.

En una modalidad preferida adicional, las células-Th reguladoras se identifican y/o separan después de una estimulación de las células en la mezcla de células.

En un uso preferido de la invención, las células se estimulan por antígenos, proteínas, péptidos, sustancias químicas, células, factores de crecimiento, anticuerpos y/o ligandos.

El cultivo puede contener además factores de crecimiento adecuados. Los factores de crecimiento se definen como moléculas que estimulan la supervivencia, crecimiento y/o diferenciación de una célula ya sea en un cultivo o dentro de un tejido por interacción con un receptor de transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen factores polipéptidos y no-polipéptidos. Los factores de crecimiento particulares que se pueden usar para cultivar las células que se separan y/o usan incluyen las interleucinas, por ejemplo, IL -1, IL -2, IL -3, IL -4, IL -5, IL -6, IL -7, IL -8, IL-9, IL -10, IL -11, IL -12, IL -13, IL -14, IL -15, IL -16, IL -17, IL -18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 etc.; antígenos, por ejemplo, antígenos peptídicos, antígenos proteicos, como por ejemplo, aloantígenos, preferentemente junto con células presentadoras de antígenos, Lectinas, por ejemplo, ConA, [alfa]-CD3, LPs, etc.

El cultivo puede además contener anticuerpos o ligandos específicos (ligandos purificados, proteínas de fusión FC u otras formas recombinantes de "cremallera de leucina") para receptores de superficie celular que pueden estimular o inhibir la actividad de las Treg. Anticuerpos o ligandos que unen TNFR u otras moléculas co-estimuladoras en las Treg y estimulan y/o aumentan la actividad de las Treg, que contrarrestan la actividad de las Treg (y causan división celular) o que estimulan la apoptosis de las Treg pueden además estar presentes en el medio. Normalmente, los parámetros de cultivo específicos sirven un propósito particular, por ejemplo, el mantenimiento de la actividad de las células Treg, etc.

Se prefiere que se usen anticuerpos para detectar CD154.

Como se usa en la presente descripción, se pretende que el término "*anticuerpo*" incluya anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, haptenos y fragmentos de *anticuerpos*, y moléculas las cuales son equivalentes a *anticuerpos* en que se unen específicamente a un epítipo en el antígeno producto. El término "*anticuerpo*" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales de cualquier isotipo (IgA, IgG, IgE, IgD, IgM), o una porción de unión al antígeno de ellos, que incluye, pero no se limita a, F(ab) y fragmentos Fv tales como sc Fv, anticuerpos de simple cadena, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y una genoteca de expresión de Fab.

Un objetivo es tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción tal que la eficiencia de separación no se limita por muy pocos anticuerpos. La concentración necesaria se puede determinar a través de titulación.

Los medios para separar las células pueden ser cualquier medio que mantenga la actividad de las células. Un medio preferido es una solución salina amortiguada con fosfato que contiene 0.1 a 0.5 % de BSA o en cantidades iguales sueros autólogos agrupados o sustancias del suero sustitutas. Varios medios están disponibles comercialmente y se pueden usar en dependencia del tipo de célula y el experimento que se va a realizar. Medios disponibles son por ejemplo, Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Solución de sal básica de Hank (HBSS), Solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS), RPMI, medio de Iscove, X-VIVO™ PBS con 5 mM EDTA etc. a menudo suplementados con suero fetal de ternera BSA, HSA etc.

Las células convencionales etiquetadas después se separan en dependencia de la expresión de CD154. Las células reguladoras que no se separaron se pueden recoger por cualquier medio que mantiene la vitalidad de las células. Normalmente, las células se recogen en un tubo de recogida con suero. Varios medios están disponibles comercialmente y se pueden usar en dependencia de las células identificadas y/o separadas, por ejemplo, dMEM, HBSS lo que incluye dPBS, RPMI, medio de Iscove etc., frecuentemente suplementado con suero fetal de ternera, suero autólogo o agrupado o sustitutos de suero.

Se prefiere más aun que los antígenos para detectar CD137 se acoplen con un colorante fluorescente o a micropartículas magnéticas.

El anticuerpo se conjuga directamente o indirectamente a un reactivo magnético, tal como una micropartícula superparamagnética (micropartícula). La conjugación directa a una partícula magnética se alcanza por el uso de varios grupos enlazantes químicos, como se conocen en la materia. Alternativamente, el anticuerpo se acopla indirectamente a las partículas magnéticas. El anticuerpo se conjuga directamente a un hapteno, y anticuerpos de segunda etapa, específicos por el hapteno, se conjugan a las partículas. Los haptenos adecuados incluyen

digoxina, digoxigenina, FITC, dinitrofenilo, avidina, biotina, etc. Los métodos para la conjugación del hapteno a una proteína, es decir se conocen en la materia y los kits para tales conjugaciones están disponibles comercialmente.

Para la citometría de flujo, por ejemplo, FACS (clasificación de células activada por fluorescencia), y la clasificación de células magnética (por ejemplo, MACS) se usan anticuerpos que se pueden acoplar con marcadores fluorescentes o micropartículas magnéticas que se conocen por un experto en la materia, como FITC, ficoeritrina (PE), alofococianina (APC), cascada amarilla y proteína de clorofila peridina (PerCP). Los anticuerpos se pueden acoplar también a haptenos y pueden detectarse después con anticuerpos secundarios específicos a haptenos. Se puede usar una combinación de anticuerpos para detectar, analizar y/o aislar varias células con diferentes propiedades sobre la base de marcadores, como proteínas secretadas o moléculas de superficie características. En particular, los anticuerpos etiquetados con fluorescencia se pueden usar para los marcadores FoxP3, CD25 y/o CD4. Es particularmente preferido usar anticuerpos CD137 acoplados a colorantes fluorescentes o a micropartículas magnéticas. Las micropartículas magnéticas se pueden usar directamente o indirectamente (hapteno por ejemplo biotina y micropartícula anti-hapteno de fluorocromo, por ejemplo, PE o APC y micropartícula anti-fluorocromo).

En otra modalidad preferida, las células-Th reguladoras se identifican y/o separan directamente o se aíslan a partir de la sangre, células de la sangre mononucleares periféricas (PBMC), tejidos del cuerpo o células a partir de fluidos de tejidos.

Las células Th reguladoras normalmente se identifican y/o separan de muestras de células de mamíferos (Mamalia), pero especialmente de humanos y preferentemente de sujetos de ensayo y/o pacientes. Las células Th reguladoras se pueden derivar por ejemplo, de muestras de sangre que comprenden células inmunes (fluido corporal peritoneal, cerebral-espinal, pleural y/o sinovial), lavados fluidos de órganos vacíos (vías respiratorias, pulmones), homogenados y aspirados de ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y/u otros tejidos linfáticos. Las células Th reguladoras además se pueden obtener a partir de tejidos animales (por ejemplo, del bazo o el ganglio linfático de un animal). Las células Th además pueden ser parte de una muestra de sangre, por ejemplo, de un sujeto de ensayo o un paciente humano, particularmente preferentemente a partir de células de sangre mononucleares periféricas.

La invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo para detectar CD154 para separar células T convencionales activadas y/o reactivos para separar una célula Th reguladora activada (por ejemplo CD137).

Se prefiere que el anticuerpo CD154 en el kit se acople a una sustancia fluorescente, a un hapteno, o a micropartículas magnéticas.

El anticuerpo receptor A 4-1 BB el cual se acopla a un marcador fluorescente, un hapteno o micropartículas magnéticas se proporciona para identificar y/o separar las células Th reguladoras vivas, activadas. Los marcadores fluorescentes se conocen por el experto, tales como, por ejemplo, FITC, ficoeritrina (PE), alofococianina (APC), cascada amarilla y proteína de clorofila peridina (PerCP).

Es posible a través del uso del kit que comprende un anticuerpo CD154 acoplado a un marcador fluorescente, hapteno o micropartículas magnéticas identificar y/o separar células Th reguladoras activadas. Se prefiere particularmente la identificación y/o separación de células Th reguladoras activadas.

En esta modalidad, el método de la invención se puede usar, por ejemplo, para identificar y/o separar células Th de muestras de sangre (o de un derivado de la sangre) o de mezclas de células derivadas de órganos linfáticos o tumores de mamíferos.

Las células Th reguladoras activadas separadas se pueden usar antes y/o después de la clonación y/o crecimiento y/o concentración en mezclas de células en y/o como composiciones farmacéuticas en la terapia o prevención de enfermedades. Es posible además aislar las secuencias de genes codificadores del TCR (receptor de células T) de las células T reguladoras separadas y usarlas para propósitos terapéuticos adicionales tales como, por ejemplo, para terapias celulares. Es posible además emplear las células Th reguladoras activadas en la forma mencionada en investigaciones y análisis adicionales. La composición farmacéutica se puede usar para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en mamíferos, lo que posiblemente incluye la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición farmacéutica al mamífero.

La enfermedad puede ser cualquier enfermedad, la cual se puede tratar y/o prevenir a través de la presencia de una célula separada y/o a través del incremento de la concentración de la célula relevante dentro/en el lugar relevante, o en los sujetos mamíferos completos y/o pacientes. La célula puede ser por ejemplo una célula Th reguladora activada, y la enfermedad tratada y/o preventivamente tratada puede ser una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa, una alergia, enfermedad de trasplante contra huésped (o rechazo de trasplante alogénico) y/o cualquier otra enfermedad iniciada por hipersensibilidad.

Las enfermedades para las cuales el uso que se expone es particularmente adecuado son aquellas que surgen a través y/o durante una falta de regulación de la respuesta inmune. Estas enfermedades pueden ser rechazo de trasplante, condiciones alérgicas, ciertas enfermedades infecciosas y/o enfermedades autoinmunes.

En conexión con enfermedades autoinmunes se conoce que el sistema inmune ataca las estructuras endógenas, tales como, por ejemplo, en la artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), esclerosis múltiple (MS), aterosclerosis, soriasis, trasplante de células madres alogénicas, trasplante de órganos. Una terapia con células T reguladoras activadas es ventajosa aquí. El objetivo en enfermedades neoplásicas debe ser eliminar células T reguladoras específicas por antígenos tumorales de forma que el sistema inmune pueda iniciar respuestas inmunes anti-tumorales eficientes.

La descripción además se relaciona al uso de la composición de la invención y/o de la composición farmacéutica que se describe en la presente descripción para el tratamiento de enfermedades las cuales se asocian con una deficiencia de la inmunidad celular, por ejemplo en el defecto de acuerdo a código ICDIO: D.84.4. Las posibilidades en esta conexión son trastornos sépticos, reacciones inflamatorias y fiebre, enfermedades autoinmunes y enfermedades de deterioro de la división celular tales como, por ejemplo, el cáncer.

Por consiguiente, se describe en la presente descripción un método para tratar una de las enfermedades mencionadas en la presente descripción usando una población altamente pura de Treg activadas, así como un método para preparar un medicamento que comprende una población altamente pura de Treg activadas para el tratamiento de tales enfermedades, así como el uso de una población altamente pura de Treg para el tratamiento de tales enfermedades.

Las inflamaciones son la reacción que nace en el tejido conectivo y los vasos sanguíneos, del cuerpo a un estímulo inflamatorio inducido externamente o internamente con el propósito de eliminarlo o inactivarlo y reparar el daño tisular relacionado con el estímulo. Los efectos que se inducen se pueden ejercer por estímulos mecánicos (cuerpos extraños, presión, lesión) y otros factores físicos (radiaciones ionizantes, luz UV, calor, frío), sustancias químicas (álcalis, ácidos, metales pesados, toxinas bacterianas, alérgenos y complejos inmunes) y patógenos (microorganismos, gusanos, insectos) y productos metabólicos patológicos, enzimas disfuncionales, tumores malignos. Los eventos comienzan con una breve constricción arteriolar (a través de la acción de la adrenalina) con flujo sanguíneo inadecuado y alteración del tejido, seguido por el desarrollo de los signos clásicos de la inflamación (síntomas cardinales; de acuerdo con GALENO y CELSUS), es decir de enrojecimiento (=rubor; dilatación de los vasos sanguíneos debido a la histamina), calor (=calor; a través de un aumento local del metabolismo), inflamación (=tumor; a través del escape de líquido rico en proteínas de las paredes de los vasos las cuales se alteran --entre otros por la histamina--, asistida por una circulación de sangre lenta en el sentido de prestasis a estasis), dolor (=dolor; como consecuencia del aumento de la tensión en el tejido y productos inflamatorios inducidos por el dolor, por ejemplo bradiquinina) y deterioro funcional (=functio laesa). El proceso se suplementa por perturbaciones del balance de electrolitos (transmineralización), invasión de granulocitos neutrofilicos y monocitos a través de las paredes de los vasos (ver además leucotaxis), esto último con el propósito de eliminar los estímulos inflamatorios y el daño a células necróticas (fagocitosis); hay además invasión de células efectoras linfocitos las cuales conducen a la producción de anticuerpos específicos contra los estímulos inflamatorios (respuesta inmune), y eosinófilos (en la fase curativa o--muy temprano--en el evento alérgico-hiperérgico). La activación del sistema del complemento producida por la reacción libera fragmentos (C3a y C5a) de este sistema los cuales--como histamina y bradiquinina--actúan como mediadores de la inflamación, específicamente en el sentido de estimular la quimiotaxis de las citadas células de la sangre; hay además activación de la coagulación sanguínea. Esto está seguido por daño (distrofia y necrosis por coagulación) del parénquima del órgano relevante. El cuerpo completo responde en dependencia de la intensidad y naturaleza de la inflamación con fiebre, estrés, leucocitosis y alteraciones en la composición de las proteínas del plasma (reacción de fase-aguda), la cual lleva a incrementar el índice de sedimentación de eritrocitos. Las inflamaciones preferidas son las purulentas, las exudativas, las fibrinosas, las gangrenosas, las granulomatosas, las hemorrágicas, las catarrales, las necróticas, las proliferativas o productivas, las pseudomembranosas, las serosas, las específicas o las inflamaciones ulcerativas.

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades parcialmente atribuibles a la producción de auto-anticuerpos y su efecto nocivo en todo el cuerpo o sistemas de órganos, es decir auto-agresión. Además, las enfermedades autoinmunes pueden por otro lado ser enfermedades en las cuales las células T poseen un papel predominante en la patogénesis o iniciación. La clasificación como enfermedades autoinmunes órgano específicas, intermediarias y/o sistémicas es posible. Las enfermedades autoinmunes órgano-específicas preferidas son la tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis (enfermedad de Basedow), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, la miastenia gravis y/o diabetes mellitus juvenil. Las enfermedades autoinmunes intermediarias preferidas son el síndrome de Goodpasture, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, pénfigo vulgar, oftalmia simpática, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, colitis ulcerativa y/o síndrome de Sjogren. Las enfermedades autoinmunes sistémicas preferidas son la artritis reumatoide, la fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis /polimiositis, esclerosis sistémica progresiva, granulomatosis de Wegener, panarteritis nodosa y/o hipersensibilidad angitis. Enfermedades autoinmunes típicas son la tirotoxicosis, la tiroides relacionada con mixedema, tiroiditis de Hashimoto, endocrinopatía generalizada, anemia perniciosa, gastritis crónica de tipo A, enfermedades de uno o todos los elementos corpusculares de la sangre (por ejemplo anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia idiopática o; idiopatía, leucopenia idiopática o agranulocitosis), pénfigo vulgar y perfigoide, oftalmia simpática y algunos tipos de uveítis, cirrosis biliar primaria del hígado y hepatitis autoinmune crónica agresiva, diabetes mellitus de tipo I, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren,

enfermedad de Addison, lupus eritematoso diseminado y como forma discoide de esta enfermedad, como la dermatomiositis y la esclerodermia, artritis reumatoide (= poliartritis crónica primaria), nefritis de la membrana basal antiglomerular. Las bases son una respuesta inmune agresiva como resultado del colapso de la inmunotolerancia de determinantes propios y una preponderancia de las células T inflamatorias. La producción de autoantígenos es posible además, por ejemplo a través de la combinación de proteínas del huésped con haptenos (por ejemplo fármacos), a través de tejidos ontogenéticos los cuales se desarrollan solamente después del desarrollo de la tolerancia a lo propio y para componentes de proteínas desensmascarados a través de cambios en la conformación de las proteínas en conexión por ejemplo con infecciones por virus y bacterias; además para unas pocas proteínas las cuales surgieron en conexión con neoplasmas primero.

Las enfermedades sépticas son trastornos que resultan de invasiones periódicas o continuas de bacterias patógenas y/o sus toxinas de un foco de enfermedad y se extiende de él a través de la linfa o la sangre a infección general o local.

Las sepsis son preferentemente sepsis de heridas (flemones, tromboflebitis, linfangitis), sepsis puerperal (en la fiebre puerperal), sepsis otogénica (en la otitis media), sepsis de las amígdalas (en angina, periamigdalitis), sepsis colangítica (en colecistitis purulenta, colangitis), sepsis pifilebitis (en pifilebitis), sepsis umbilical (en onfalitis etc.), urosepsis y en granuloma dental. La sepsis puede ocurrir agudamente a altamente aguda (fulminantemente), subaguda (por ejemplo como endocarditis lenta) o crónica, pero por supuesto además como sepsis neonatal. Las sepsis son por lo tanto todas las alteraciones patógenas en un paciente las cuales se pueden asociar con fiebre y escalofríos intermitentes, y con tumor de bazo, con reacciones tóxicas o daños de la médula ósea o la sangre (leucocitosis polinuclear, anemia, hemolisis, trombocitopenia) o cualquier otra con reacciones patógenas en el corazón y nervios vasomotores (taquicardia, centralización de la circulación, edema, oliguria, posiblemente infarto) o del tracto digestivo (seco, lengua recubierta, diarreas) o cualquier otra con septicopiemia (piemia con formación de infarto séptico y abscesos metastásicos).

Los trastornos preferidos que se asocian con una deficiencia del sistema inmune celular además son:

SIDA, acné, albuminuria (proteinuria), el síndrome de abstinencia de alcohol, alergias, alopecia (pérdida de pelo), ALS (esclerosis lateral amiotrófica), enfermedad de Alzheimer, AMD (degeneración macular relacionada con la edad), anemia, trastornos de ansiedad, el ántrax, la esclerosis de la aorta, enfermedad arterial oclusiva, calcificación arterial, oclusión arterial, arteritis temporal, aterosclerosis, fistulas arteriovenosas, artritis, artrosis, asma, insuficiencia respiratoria, enfermedad autoinmune, bloqueo AV, acidosis, disco prolapsado, peritonitis, cáncer de páncreas, la distrofia muscular de Becker, la hiperplasia benigna de próstata (HBP), carcinoma de vejiga, hemofílico, el carcinoma bronquial, cáncer de mama, la BSE, síndrome de Budd -Chiari, la bulimia nerviosa, bursitis, síndrome de Byler, derivación coronaria, la infección por clamidia, dolor crónico, cirrosis, conmoción, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, el carcinoma intestinal, cáncer intestinal, tuberculosis intestinal, depresión, diabetes insípida, diabetes mellitus, diabetes mellitus juvenil, retinopatía diabética, la distrofia muscular de Duchenne, carcinoma duodenal, distrofia muscular progresiva, distrofia, ébola, eczema, disfunción eréctil, obesidad, fibrosis, cáncer cervical, cáncer de útero, hemorragia cerebral, encefalitis, pérdida de cabello, anemia hemolítica, hemofilia, alergia del animal doméstico (alergia al pelo del animal), cáncer de piel, herpes zoster, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, inflamación de las válvulas del corazón, metástasis cerebral, infarto, tumor cerebral, cáncer testicular, isquemia, enfermedad de Kahler (plasmocitoma), parálisis infantil (poliomielitis), atrofia del hueso, eczema por contacto, parálisis, cirrosis del hígado, leucemia, fibrosis pulmonar, cáncer de pulmón, edema pulmonar, cáncer de nódulos linfáticos (enfermedad de Hodgkin), linfogranulomatosis, linfoma, rabia, carcinoma gástrico, carcinoma de mama, meningitis, ántrax, mucoviscidosis (fibrosis quística), esclerosis múltiple (MS), infarto de miocardio, neurodermatitis, neurofibromatosis, tumores neuronales, cáncer renal (carcinoma de células renales), osteoporosis, carcinoma pancreático, neumonía, polineuropatías, impedimentos de potencia, esclerosis sistémica progresiva (PSS), cáncer de próstata, urticaria, síndrome transversario, carcinoma rectal traumático, pleuresia, trauma craneocerebral, cáncer de vagina (carcinoma vaginal), sinusitis, cáncer de esófago, temblor, tuberculosis, dolor tumoral, carcinoma vaginal, quemaduras/escaldaduras, envenenamiento, meningitis viral, menopausia, sarcoma de tejido blando, tumor de tejidos blando, deterioro del flujo sanguíneo cerebral y /o tumores del SNC.

El cáncer o el tumor que se trata o previene se selecciona del grupo de cánceres o enfermedades neoplásicas de la región del oído / nariz / garganta, de los pulmones, del mediastino, del tracto gastrointestinal, del sistema urogenital, del sistema ginecológico, de la mama, del sistema endocrino, de la piel, hueso y sarcomas de tejidos blandos, mesoteliomas, melanomas, neoplasias del sistema nervioso central, cánceres o enfermedades neoplásicas en la infancia, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis sin tumor primario conocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneales, malignidades relacionadas con la inmunosupresión y/o metástasis tumorales .

Los tumores pueden ser, en particular, de los siguientes tipos de cáncer: adenocarcinoma de mama, de la próstata y del colon; todos los tipos de cáncer de pulmón derivados de los bronquios, cáncer de la médula ósea, el melanoma, el hepatoma, neuroblastoma, papiloma, apudoma, coristoma, branchioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinoma (por ejemplo, carcinoma de Walker , carcinoma de células basales, el carcinoma basoescamoso, carcinoma de Brown-Pearce, carcinoma ductal, tumor de Ehrlich, carcinoma in situ, carcinoma Krebs-2, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de la mucosa, carcinoma bronquial de células no pequeñas,

carcinoma de células en avena, carcinoma papilar, carcinoma escirro, carcinoma bronquiolo-alveolar (carcinoma bronquial, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células de transición); disfunción histiocítica, leucemia (por ejemplo en relación con leucemia de células B, leucemia de células mezcladas, leucemia de células nulas, leucemia de células T, leucemia crónica de células T, leucemia asociada a la HTLV II , leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de célula principal y leucemia mieloide), histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, tumor solitario de células plasmáticas; reticuloendoteliosis, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma; fibrosarcoma, tumores de células gigantes; histiocitoma, lipoma, liposarcoma, leucosarcoma; mesotelioma, mixoma, mixosarcoma; osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing; sinovioma; adenofibroma; adenolinfoma; carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma; mesenquimoma; mesonefoma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma; odontoma, teratoma, timoma, corioblastoma, adenocarcinoma, adenoma; colangiomas; colesteatoma; cilindroma; cistadenocarcinoma, cistadenoma, tumor de células granulosas; ginecomioma; hidradenoma; tumor de células de los islotes, tumor de células de Leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumores de células Theka, leiomioma, leiomiomasarcoma, mioblastoma; mioma; miosarcoma; rhabdomyoma; rhabdomyosarcoma; ependinoma; ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma; neurilemmoma; neuroblastoma; neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma no cromafines, angioqueratoma, hiperplasia con eosinofilia angiolinfocítica; angiomas esclerosados, angiomas; glomangioma; hemangioendelioma; hemangioma; hemangiopericitoma, hemangiosarcoma; linfangioma, linfangioma, linfangiosarcoma; pinealoma; cistosarcoma filodes; hemangiosarcoma; linfangiosarcoma; mixosarcoma, carcinoma de ovario, sarcoma (por ejemplo sarcoma de Ewing, experimentalmente, sarcoma de Kaposi y sarcoma de células maestas) , neoplasias (por ejemplo neoplasias óseas, neoplasias de mama, neoplasias del sistema digestivo, neoplasias colorrectales, neoplasias hepáticas, neoplasias pancreáticas, neoplasias pituitarias, neoplasias testiculares, neoplasias orbitales, neoplasias de la cabeza y el cuello, del sistema nervioso central, neoplasias del órgano de la audición, de la pelvis, del tracto respiratorio y del tracto urogenital); neurofibromatosis y displasia celular escamosa cervical.

El cáncer o tumor que se trata o previene se selecciona del grupo: tumores de la región oídos nariz y garganta lo que incluye tumores del interior de la nariz, de los senos paranasales, de la nasofaringe, de los labios, de la cavidad oral, de la orofaringe, de la laringe, de la hipofaringe, del oído, de las glándulas salivales y paragangliomas, tumores de pulmón lo que incluye carcinomas bronquiales de células no pequeñas, carcinoma bronquial de células pequeñas, tumores del mediastino, tumores del tracto gastrointestinal lo que incluye tumores del esófago, del estómago, del páncreas, del hígado, de la vesícula biliar, del tracto biliar, del intestino delgado, carcinomas del colon y el recto, carcinomas anales, tumores urogenitales, que incluyen tumores de riñones, de los uréteres, de la vejiga, de la próstata, de la uretra, del pene, y de los testículos, tumores ginecológicos que incluyen tumores de cérvix, de vagina, de la vulva, carcinoma del cuerpo, enfermedad trofoblástica maligna, carcinoma de ovario, tumores del tubo uterino (tubos de falopio), tumores de la cavidad abdominal, carcinomas de mama, tumores de órganos endocrinos que incluyen tumores de la tiroides, de la paratiroides, de la corteza suprarrenal, tumores endocrinos pancreáticos, los tumores carcinoides y síndrome carcinoide, neoplasias endocrinas múltiples, sarcomas de hueso y de tejidos blandos, mesoteliomas, tumores de piel, melanomas, que incluyen melanomas cutáneos e intraoculares, tumores del sistema nervioso central, tumores en la infancia, que incluyen retinoblastoma, tumor de Wilms, neurofibromatosis, neuroblastoma, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, linfomas que incluyen linfomas no Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfomas primarios del sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin, leucemias que incluyen leucemias agudas, leucemias linfáticas y mieloides crónicas y, neoplasias de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, síndromes paraneoplásicos, metástasis sin tumor primario conocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneal, la inmunosupresión relacionada con malignidad lo que incluye malignidades relacionadas con el SIDA tales como el sarcoma de Kaposi, linfomas asociados con el SIDA , linfomas del sistema nervioso central asociados con el SIDA , enfermedad de Hodgkin asociada con el SIDA y tumores anogenitales asociados con el SIDA, malignidades relacionadas con trasplante, tumores metastásicos lo que incluye las metástasis cerebrales, metástasis pulmonares, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis pleurales y pericardiales y ascitis malignas.

El cáncer o el tumor el cual se trata o previene se selecciona del grupo que incluye cánceres o enfermedades neoplásicas de los carcinomas de la mama, de tumores gastrointestinales, que incluyen carcinomas de colon, carcinomas gástricos, carcinomas pancreáticos, cáncer de colon, cáncer del intestino delgado, de los carcinomas de ovario, de los carcinomas cervicales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales y/o metástasis del hígado.

Las reacciones inmunopatológicas causan la pérdida de función de un tejido particular y pueden destruir el tejido. El uso que se describe en la presente descripción permite aislar células Th reguladoras activas de un paciente con estas enfermedades con el objetivo de tratar la respuesta inmune que daña los tejidos. En el caso de las enfermedades neoplásicas, el uso que se describe en la presente descripción se pretende que haga posible específicamente eliminar Treg específicas por el tumor in vitro o ex vivo. Si las células Th reguladoras activadas se presentan en un número demasiado pequeño, ellas se pueden separar y concentrar y/o crecer en cultivos de células. En ambos casos, el paciente se puede tratar con un número de células Th reguladoras aumentado por concentración y/o crecimiento, lo cual puede llevar a la esperada supresión de la respuesta inmunopatológica y así a un mejoramiento y/o cura de la enfermedad. Las enfermedades autoinmunes para las cuales se pudiera usar el CD137 como marcador para identificar y/o aislar y posteriormente concentrar las Th reguladoras activas y sería

esperado que fuera una terapia exitosa incluyen, pero no se restringen solamente a ellas, la diabetes mellitus (IDDM), esclerosis múltiple (MS), aterosclerosis (AS), soriasis, inflamaciones del intestino, anemia hemolítica relacionada con autoinmunidad, síndrome de Sjogren, tiroiditis relacionada con autoinmunidad y lupus eritematoso sistémico.

El experto está consciente de que las células Th reguladoras son capaces en conexión con los trasplantes de suprimir una respuesta inmune, la cual puede llevar al rechazo del trasplante. El tratamiento de un paciente y/o sujeto con las células Th reguladora activadas específicamente inicialmente aisladas y concentradas puede prevenir y/o impedir el rechazo del trasplante. Los rechazos de trasplantes se inducen por una respuesta inmune del aceptor del trasplante. En este caso, las células inmunes del aceptor atacan los tejidos exógenos. Usadas en esta forma, las células Th del paciente objetivo serían expuestas in vitro a células, extractos de células, antígenos aislados o proteínas del donante del órgano antes o después del trasplante. Después de esto, las células Th reguladoras activas podrían, después de un tiempo de crecimiento apropiado, identificarse y/o separarse por medio del marcador CD137. Las células Th reguladoras identificadas y/o separadas usando el método de la invención se devolverían al aceptor del trasplante. El resultado de esto es que las células tratadas por este método suprimen la respuesta inmune al trasplante, y el rechazo del trasplante se demora o previene. El uso del marcador CD137 se puede emplear entre otros para trasplantes alogénicos y/o heterotrasplantes tales como, por ejemplo, para los trasplantes de corazón, pulmones, intestinos, cornea, riñones y médula ósea.

En el caso de una alergia, las células Th reguladoras se identificarían y/o separarían ya sea antes de la activación policlonal de las células T o después del cultivo con alérgenos específicos. Las células identificadas y/o separadas se retornarían entonces, después de una posible propagación, al paciente. Se espera después que las células Th reguladoras tratadas de esta forma suprimirán la respuesta inmune, y los síntomas que se correlacionan con los antígenos que se usan mejorará.

El tratamiento de alergias por medio de la identificación y/o el aislamiento de células Th reguladoras activas con el marcador CD137 y el método descrito serían adecuados entre otros para erupciones cutáneas, dermatitis atópica, asma, rinitis alérgica, toxinas de insectos y alergia a los alimentos tales como, por ejemplo, hacia el gluten, productos lácteos, nueces y/o antígenos del pescado.

En el caso de las enfermedades infecciosas es importante fortalecer la respuesta inmune que debilitarla. En ciertas enfermedades es apropiado modular la respuesta inmune con el objetivo de alterar la progresión de la enfermedad. Tales casos de modulación ocurren en enfermedades donde las reacciones inmunopatológicas ocurren a través de infecciones y destruyen tejidos, y en aquellas donde las respuestas inmunes no protegen el cuerpo. Sería posible a través de la identificación y/o aislamiento de células Th reguladoras activas suprimir la respuesta inmune y aminorar y/o prevenir el daño inmunopatológico.

Una alternativa adicional sería el tratamiento con células Th reguladoras, las cuales se aislaron a partir de pacientes y se expusieron a un antígeno particular con el objetivo de obtener células Th reguladoras las cuales pudieran redirigir la respuesta inmune en una dirección definida, particular.

Se pueden introducir genes en las células antes de cultivarlas o trasplantarlas para una diversidad de propósitos, por ejemplo, con el objetivo de prevenir o reducir la susceptibilidad a una infección, reemplazar genes los cuales están sujetos a la pérdida de una mutación funcional, incrementar la habilidad de las Treg de inhibir células Th etc. Es además posible introducir vectores, los cuales expresan ARNm antisentido o ribosomas, y así bloquear la expresión de un gen no deseado. Otros métodos de terapia génica son la introducción de genes de resistencia a fármacos, por ejemplo, el gen de resistencia a fármaco (MDR) o genes antiapoptosis tal como bcl-2. Una posibilidad adicional es usar técnicas conocidas al experto para transfectar células objetivo, por ejemplo, por electroporación, ADN precipitado por calcio, fusión, transfección o lipofección. La forma particular por la cual se introduce el ADN no es crucial para el uso descrito.

El experto está consciente de muchos vectores, los cuales se pueden usar con el objetivo de transferir genes exógenos en células de mamíferos. Los vectores pueden ser episomales, por ejemplo plásmidos, vectores de virus tales como, por ejemplo, citomegalovirus, adenovirus, etc. Los genes además se pueden integrar en el genoma de la célula objetivo por recombinación homóloga o por integración al azar, tal como, por ejemplo, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, HIV-1, ALV, etc.

Los factores activos de las células Treg se pueden analizar por medio de ensayos o tamizaje in vitro. Además es posible llevar a cabo ensayos de co-cultivo con el objetivo de estudiar las alteraciones en las Tregs, las cuales suprimen la multiplicación de células T normales que incluyen T CD4 y T CD8. Las interacciones con células dendríticas y otras células determinadas por el antígeno pueden igualmente investigarse. Las células reguladoras separadas de acuerdo a la invención pueden ser el material de partida para una gran diversidad de diferentes análisis, por ejemplo de inmunoensayos para estudios de unión de proteínas, determinaciones de crecimiento de células, actividad funcional y de diferenciación, producción de hormonas etc.

Ejemplos

La presente invención se describe en más detalles a través de los siguientes ejemplos, los cuales no son limitantes de la invención.

Ejemplo 1 (No de acuerdo con la invención)

Figura1: Poco después de la estimulación, una larga fracción de Treg CD137+ también expresa CD154. Descripción de la figura: Células Th periféricas (A) se aislaron usando FACS o MACS a partir de PBMC y se cultivaron con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (moDC) por 0 a 20 horas. En los momentos indicados, la expresión de CD137 contra CD154 se determinó usando citometría de flujo. Después de 8 horas, ya el 20 % de las células T CD137+ expresaban CD154. Después de 16 horas, a las cuales se detecta la máxima expresión de CD137, 30 % de las células son además positivas para CD154. Esto muestra que, las células-T contaminantes están ya presentes en el cultivo en los primeros momentos, pero que el máximo número de células objetivo expresa el marcador después de 16 horas. Las células contaminantes se pueden depletar por el método de la invención.

Ejemplo 2

Figuras 2 y 3: Dentro de la mezcla de células-T CD137⁺, las células-T CD154⁻ aisladas de acuerdo al método de la invención expresan más FoxP3. Descripción de las figuras:

Figura 2: Células-Th periféricas se aislaron a partir de PBMC usando FACS o MACS y/o se cultivaron por 16 horas con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (moDC). La expresión de CD137 contra CD154 se determinó usando citometría de flujo. Usando la clasificación por FACS, las células CD137+ se separaron en células CD154 positivas y negativas y se tiñeron intracelularmente contra FoxP3. El 80 % de las células positivas a FoxP3 son parte de la fracción CD137+CD154- mientras que la fracción CD137+CD154+ consiste de un 90 % de células-T FoxP3⁻ convencionales

Figura 3: Alternativamente, las Treg se aislaron usando "MACS Treg isolation Kit" y se estimularon policlonalmente con MACSiBeads cargadas con CD3/CD28 por 6 horas. Posteriormente, se determinaron CD137 y CD154 así como la expresión de FoxP3 y se correlacionaron uno con el otro. Aun después de la activación policlonal, las Treg CD137+ CD154- contienen altas frecuencias de Treg positivas para FoxP3, mientras, por ejemplo, las Treg simple positivas para CD154 mostraron muy baja frecuencia de Treg positivas para FoxP3+.

Ejemplo 3

Figura 4: Dentro de la mezcla de células T CD137+, solamente las células-T CD154+ expresan citocinas efectoras. Las células-T que expresan citocinas efectoras no son deseadas y se pueden depletar con el método de la invención. Descripción de la figura: Células Th periféricas se aislaron usando FACS o MACS y se cultivaron por 16 horas con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (moDC). La expresión de CD137 contra CD154 se determinó usando citometría de flujo. Usando FACS, CD137+ se separaron en células positivas y negativas para CD154 y se tiñeron intracelularmente contra IFN-gamma.

Ejemplo 4

La Figura 5 y la Figura 6 muestran que el uso combinado de CD154 (depletar CD154+) y CD137 (enriquecer CD137+) permite el aislamiento de Treg activadas incluso en momentos tardíos de la estimulación.

La Figura 5 muestra la ventana de tiempo para clasificar y reanalizar las células-T doble- y simple positivas para CD137/CD154. Descripción de la figura: Las células Th periféricas se aislaron de PBMC usando FACS o MACS y se cultivaron por 16 horas con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (moDC). La expresión de CD137 contra CD154 se determinó usando citometría de flujo. Usando FACS, las células-T CD137+ CD154-, CD137+ CD154+, y CD137- CD154+ se separaron y se ensayaron en un ensayo de supresión individual para propiedades supresoras (ver la figura 4).

Figura 6: Solamente las células Treg CD154- muestran propiedades supresoras Descripción de la figura: Las poblaciones de células-T clasificadas que se muestran en la figura 4 se co-incubaron con células T CFDA vírgenes (1:10 Treg:naive) y se estimularon con moDC alogénicas (1:20 DC:T) por 4 a 6 días. Se muestra la proliferación (pérdida de CFDA) de las células objetivos vírgenes. En presencia de Treg depletadas de CD154, la proliferación con respecto al aloantígeno de DC se inhibe completamente, mientras que en presencia de células-T CD154+, ocurre una fuerte proliferación.

Ejemplo 5

Las Figuras 7- 9 demuestran que las células-T las cuales co-expresan CD154 contienen además células-T Foxp3+. Sin embargo, estas células T CD154+ Foxp3+ en contraste con su contraparte CD154- no representan verdaderas

Treg con expresión estable de Foxp3 ya que ellas no expresan el factor de transcripción Helios y no muestran desmetilación del gen Foxp3. Esto indica que CD154 se puede usar como un marcador de discriminación entre Treg estables y Treg que no muestran un fenotipo regulador y por lo tanto pueden ser menos útiles para aplicaciones en terapias basadas en Treg.

Figura 7: Treg CD25⁺⁺ FoxP3⁺ contienen células-T CD154⁺. Descripción de la figura: Las Treg CD4⁺ se clasificaron a partir de PBMC usando FACS basado en la fuerte expresión de CD25 con una alta pureza (94 % FoxP3⁺). Posteriormente, las células se estimularon policlonalmente con PMA/ionomicina y se tiñeron para CD137 y CD154. Como se puede ver en la figura, Treg altamente purificadas contienen hasta un 45 % de células CD154⁺, las cuales en parte además expresan CD137.

Figura 8: Helios se expresa casi exclusivamente por las Treg CD137⁺ CD154⁻. Descripción de la figura: Helios es un factor de transcripción que se expresa por las Treg que se generaron "naturalmente" en el timo pero no por las Treg que se "inducen" en la periferia (Thornton y otros, J. Immunol. 2010 184(7): 3433-41). Las Treg activadas policlonalmente que se muestran en la figura 6 se clasificaron de acuerdo a la expresión de CD154 y CD137 (A) y se examinaron para las cuatro poblaciones diferentes de ARNm de helios (B). Análogamente, la expresión de la proteína helios en células-T se determinó en productoras simples o dobles CD137/CD154 que se activaron por 16 horas con alo-DC a través de tinción intracelular (C). Como se muestra, el ARNm y la proteína de helios se expresan casi exclusivamente por las Treg CD137⁺CD154⁻, mientras las Treg FoxP3⁺ CD154⁺ no expresan helios.

Figura 9: Las Treg CD137⁺ CD154⁻ muestran una fuerte de-metilación del promotor FoxP3. Descripción de la figura: Las células-T CD4 se estimularon con alo-DC por 16 horas y las células simple-/doble-positivas para CD137 y/o CD154 se clasificaron. De las células clasificadas, la de-metilación de los motivos CpG en la región promotora del gen FoxP3 se analizó (región TSDR). La de-metilación en estas regiones es un indicador de expresión estable de FoxP3 y por lo tanto de identidad Treg estable (Baron et al Eur J Immunol. 2007 37(9):2378-89). Como se muestra en la figura, la de-metilación del promotor de FoxP3 se encontró exclusivamente en Treg CD154⁻ CD137⁺ y no en células CD154⁺.

Ejemplo 6

Figura 10: CD137 y CD154 además se expresan en Treg expandidas a partir de varias poblaciones. Descripción de la figura: Las Treg humanas se purificaron a partir de PBMC con "CD127 - Treg Isolation Kit" (Miltenyi Biotec GmbH) y se expandieron usando partículas magnéticas cargadas con CD3/CD28 (Treg MACSiBeads) por 14 days. Posteriormente, las Treg se estimularon por los períodos de tiempo indicados usando Treg MACSiBeads y se tiñeron para CD137 y CD154. Ambas, Treg simple- y doble-positivas para CD137 y CD154 se identificaron.

Ejemplo 7

Figuras 11 y 12: La depleción de Treg CD154⁺ a partir de un cultivo de expansión de Treg aumenta la pureza de FoxP3 y la estabilidad a largo plazo de la expresión de FoxP3. Descripción de la figura:

Figura 11: Las Treg CD127⁻ se expandieron por 14 días usando Treg CD3/CD28 MACSiBeads y posteriormente se re-estimularon por 6 horas con Treg MACSiBeads. Después de 6 horas, las MACSiBeads se eliminaron y posteriormente las Treg se separaron a través de depleción magnética (MACS). Las poblaciones separadas entonces se expandieron *in vitro* por otros 6 días con Treg MACSiBeads y después la expresión de FoxP3 se midió nuevamente usando FACS. Como se muestra, a través de la depleción de Treg CD154⁺ a) la pureza de FoxP3 aumentó, e b) incluso después de la expansión repetida, se obtiene una concentración más alta de FoxP3, lo que indica que las no-Treg y Treg no-estables se pueden separar a través de la depleción de CD154.

Figura 12: Efecto de la depleción de CD154 en la pureza de FoxP3 en cinco donantes diferentes. Las Treg de cinco donantes sanos se expandieron como se describió anteriormente, y se determinó la expresión de FoxP3 antes y después de la depleción de CD154. Los datos muestran que la depleción de CD154 es adecuada para eliminar células efectoras contaminantes incluso de cultivos de Treg altamente purificadas.

Ejemplo 8

Obtención de células-T reguladoras policlones para el tratamiento de autoinmunidad, rechazo de trasplante de órganos e inflamaciones crónicas.

Las células-T reguladoras se pueden obtener a partir de material biológico humano, como sangre, PBMC, leucoféresis, muestras de tejido ya sea directamente o por enriquecimiento de las células con un marcador general para células-T reguladoras (por ejemplo usando CliniMACS (Miltenyi Biotec GmbH). Aislamiento de células CD25⁺ con o sin depleción anterior de otras células (CD127⁺, CD8, CD19)).

La mezcla así obtenida se puede purificar adicionalmente a través de la estimulación de células-T, usando todos los antígenos conocidos (por ejemplo, anticuerpos CD3/CD28 acoplados a materiales portadores macroscópicos, super

antígenos), los cuales provocan una activación policlonal de todas las células-T (la estimulación de 10^5 - 5×10^{10} células se lleva a cabo en medio de cultivo celular, hacia 10^5 - 10^7 células por ml, a 37 °C). Se añaden estimulantes en las concentraciones usuales, (por ejemplo partículas magnéticas "MACSiBeads" (Miltenyi Biotec GmbH) cargadas con CD3/CD28 se pueden usar que se mezclan con células-T en una relación de entre 1:10 a 10:1) y la estimulación puede durar a partir de 2 a 24 horas.

Después de la estimulación de, por ejemplo, 2 a 24 horas, las células-T positivas a CD154 se pueden separar de una mezcla por el etiquetado de las células, por ejemplo, usando micropartículas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos por CD154 y eliminarlas de la mezcla usando una columna de separación magnética, y de ese modo obtener Treg activadas puras.

Además, se pueden usar marcadores para Treg activadas (por ejemplo, CD137, TGF-beta latente (LAP), GARP (LRRC32), CD121a/b) con el objetivo de enriquecer posteriormente Treg adicionalmente, por ejemplo, a través de la clasificación magnética de las células o clasificación por FACS.

Las Treg CD154 negativas o CD154 negativas/CD137 positivas se pueden aplicar directamente a un paciente o se pueden expandir en un cultivo de células, por ejemplo con métodos de estimulación de células-T policlonales. Este procedimiento se puede repetir en cualquier momento del cultivo de expansión con el objetivo de mejorar más aun la pureza y eliminar eventualmente las células-T convencionales que se pudieron expandir además.

Ejemplo 9

Obtención de Treg específicas por el antígeno.

Un uso adicional de la invención es la purificación de Treg específicas por el antígeno. Para este uso, células-T no separadas, por ejemplo, PBMC, leucoféresis, muestras de tejido, células-T separadas o Treg, las cuales se pre-enriquecieron siguiendo otro método (por ejemplo células CD25+ separadas magnéticamente), se ponen en contacto con un antígeno específico (proteínas, péptidos, células presentadoras de antígeno cargadas con antígeno (APC), APC alogénicas, etc.) por 2 a 24 horas. Un experto en la materia está consciente de cómo se puede realizar el contacto en varias concentraciones, medios y densidades celulares. Un ejemplo es el co-cultivo de células-T con APC alogénicas (por ejemplo, células dendríticas generadas de monocitos u otras células dendríticas alogénicas) en una relación de T:DC 1:1 - 20:1 con una densidad celular de entre 10^5 - 10^7 células por ml.

Posteriormente, usando el etiquetado con anticuerpos específicos que se acoplan con partículas magnéticas, las células-T convencionales activadas no deseadas se pueden eliminar al eliminar las células CD154+ usando columnas de separación magnéticas (por ejemplo, CliniMACS (Miltenyi Biotec GmbH)). Las Treg específicas para el antígeno se pueden obtener con alta pureza a través del enriquecimiento posterior a través de una molécula que es específica por Treg activadas (por ejemplo, CD137, TGF-beta latente (LAP), GARP (LRRC32), CD121a/b). Esto además se puede lograr a través del etiquetado con anticuerpos específicos (0,1 a 20 mg/ml) que se acoplan a micropartículas magnéticas, donde se puede lograr un enriquecimiento nuevamente usando una columna de separación magnética (por ejemplo, CliniMACS (Miltenyi Biotec GmbH)). Alternativamente, se pueden usar además anticuerpos marcados con fluorocromos, en cuyo caso la eliminación se puede llevar a cabo usando clasificación de células activada por fluorescencia.

Las Treg purificadas se pueden aplicar directamente a un paciente u opcionalmente expandirse en cultivo o activarse más aun. Este procedimiento se puede repetir en cualquier momento en el cultivo o se puede combinar con la purificación descrita anteriormente después de la activación policlonal con el objetivo de aumentar la pureza del cultivo. Las Treg específicas por el antígeno tienen una actividad supresora selectiva en las inmunoreacciones contra estos antígenos específicos y son por lo tanto particularmente adecuadas para tratar todas las inmunoreacciones (autoantígenos), rechazos de trasplantes (aloantígenos) u otras enfermedades inmunes que involucran reacciones contra antígenos específicos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de separación de células-T reguladoras activadas de una mezcla que comprende las células-T reguladoras activadas y células-T convencionales activadas al poner en contacto la mezcla de células con una molécula que se une a CD154 y la depleción de las células-T CD154+ de la mezcla y obtener así una población de células-T reguladoras activadas.
- 10 2. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el método comprende las etapas:
 - 1) poner en contacto la mezcla de células con
 - a) una molécula que se une al CD154 y la depleción de las células-T CD154+ de la mezcla; o
 - b) una molécula que se une a un marcador para las células-T reguladoras o para las células-T reguladoras activadas y la selección positiva de las células que se unen a dicha molécula de unión. ;
 - 15 2) poner en contacto
 - a) las células de la etapa 1) a) con una molécula que se une al marcador para las células-T reguladoras o para las células-T reguladoras activadas y la selección positiva de las células que se unen a dicha molécula de unión y se obtiene así una población de células-T reguladoras activadas; o
 - 20 b) las células de la etapa 1) b) con una molécula que se une a CD154 y la depleción de las células-T CD154+ y se obtiene así una población de células-T reguladoras activadas.
- 25 3. Método de la reivindicación 2, en donde el marcador para las células-T reguladoras se selecciona del grupo de marcadores CD25 y GITR; y en donde el marcador para las células-T reguladoras activadas se selecciona del grupo de marcadores CD137, TGF-beta latente (LAP), GARP (LRRC32) y CD121a/b.
- 30 4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 en donde las moléculas que se unen a CD154 o a un marcador para las células-T reguladoras o para las células-T reguladoras activadas son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
- 35 5. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 en donde la mezcla que comprende las células-T reguladoras activadas y las células-T convencionales activadas se obtiene al estimular in-vivo las células-T.
6. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 en donde la mezcla que comprende las células-T reguladoras activadas y las células-T convencionales activadas se obtiene al estimular in-vitro las células-T.
- 40 7. Método de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6 en donde las células se estimulan a través de sus antígenos específicos o por estímulo policlonal.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 6 en donde las células T reguladoras activadas se separan después y/o durante la estimulación de las células en la mezcla de células.
- 45 9. Método de acuerdo con cualquier reivindicación de procedimiento en donde la separación se lleva a cabo usando citometría de flujo o clasificación celular magnética.
- 50 10. Método de acuerdo con cualquier reivindicación de procedimiento en donde la molécula que se une a CD154 y/o la molécula que se une al marcador de células T para las células T reguladoras o para las células-T reguladoras activadas se acopla a un colorante fluorescente, un hapteno y/o una partícula magnética.
- 55 11. Kit para las células-T reguladoras activadas a partir de una mezcla que comprende las células-T reguladoras activadas y células-T convencionales activadas para proporcionar una población de células de las células-T reguladoras activadas, que comprende una molécula que se une a CD154 y una molécula que se une a un marcador para las células-T reguladoras activadas, en donde la molécula que se une a CD154 y la molécula que se une al marcador para las células-T reguladoras activadas son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se acoplan a colorantes fluorescentes, un hapteno y/o a una micropartícula magnética, y en donde el marcador para las células-T reguladoras activadas se selecciona del grupo de marcadores CD137, TGF-beta latente (LAP), GARP (LRRC32) y CD121a/b.

Cinética 4-1BB contra CD40L

Estimulación moDC alógenas: células T CD4+ (1:20) -> células T CD4+ (seleccionadas por DAPI)

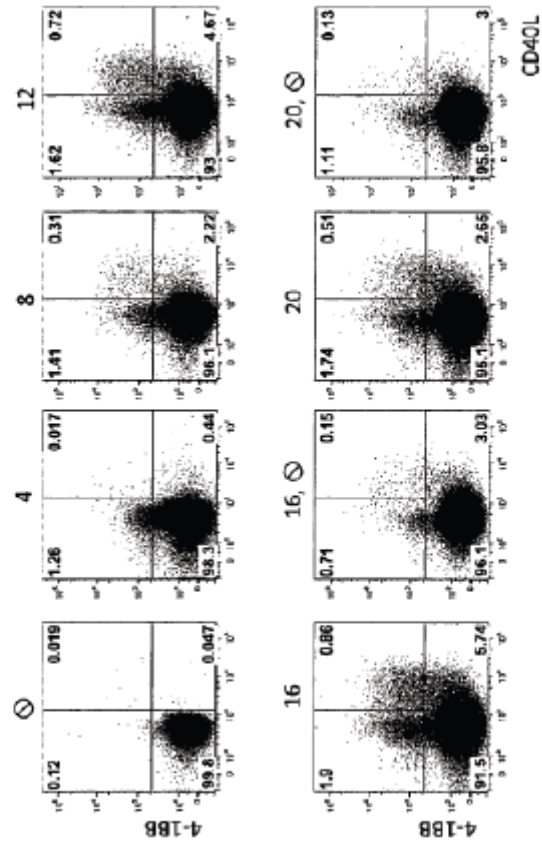


Fig. 1

Cinética 4-1BB contra CD40L

Estimulación moDC alogénicas: células T CD4+ (1:20) -> células T CD4+ (seleccionadas por DAPI)

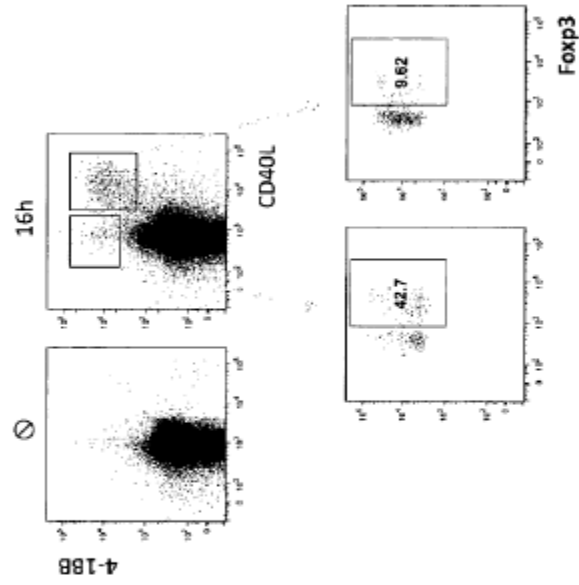


Fig. 2

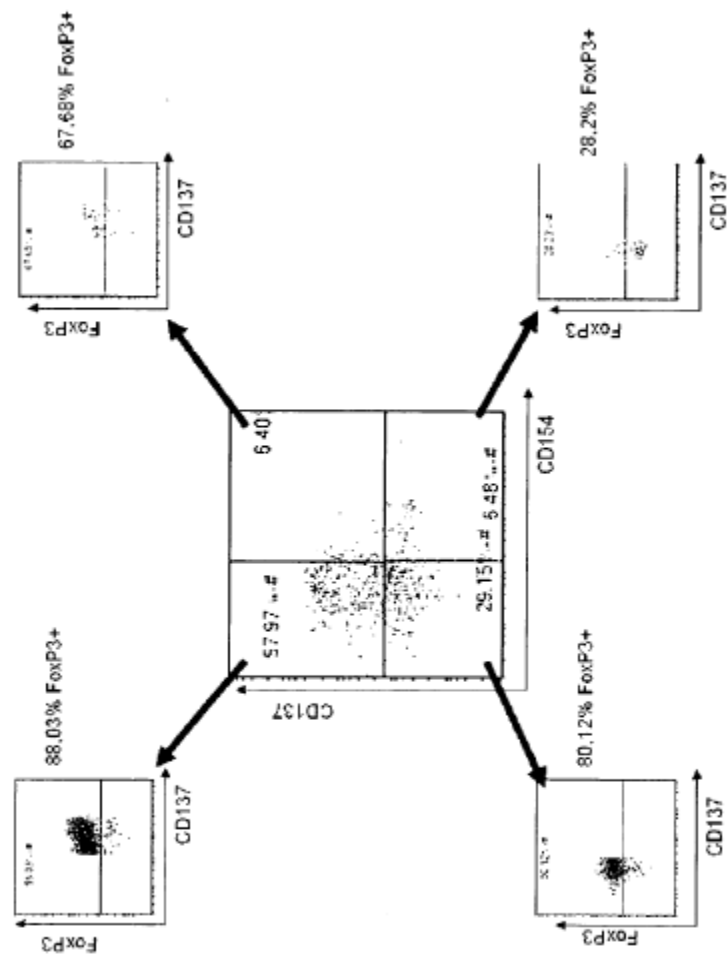


Fig. 3

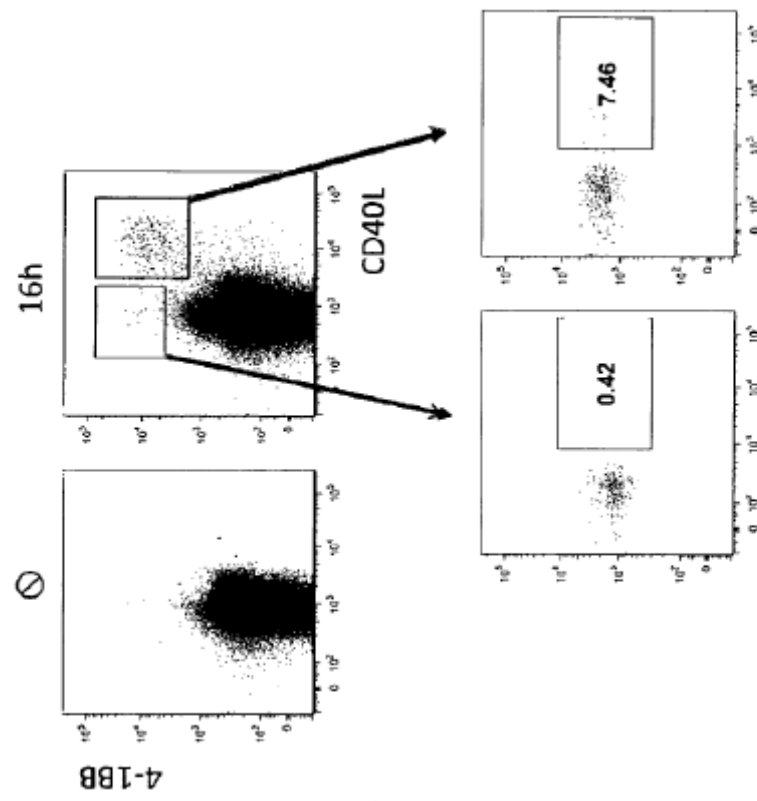


Fig. 4

Clasificación por FACS para ensayo de supresión

Estimulación moDC alógenicas: células T CD4+ (1:20) -> células T CD4+ (seleccionadas por DAPI)

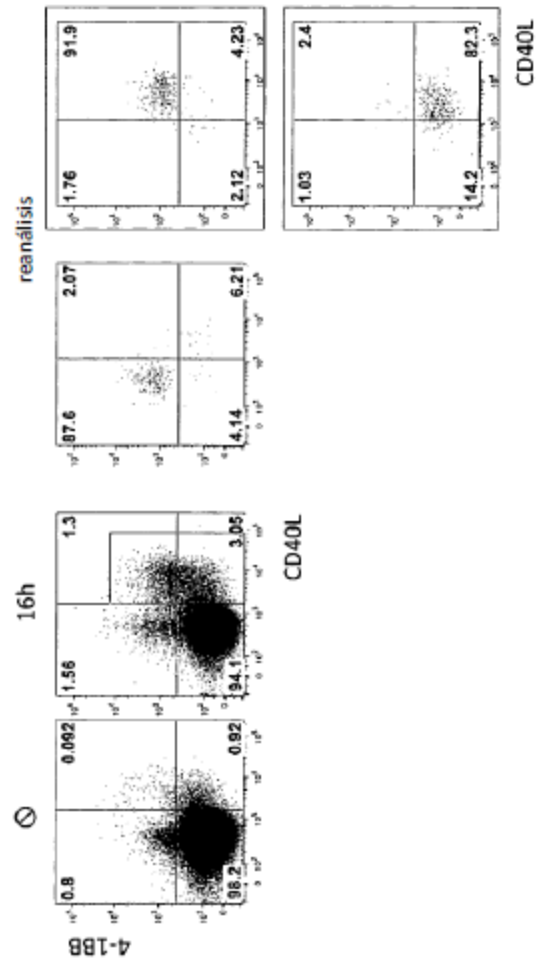


Fig. 5

Ensayo de supresión

moDC alógenas (donante B): células T CD4⁺ vírgenes (donante A): Treg (donante A) / (1:20:2)

-> células T CD4⁺ (seleccionadas por DAPI)

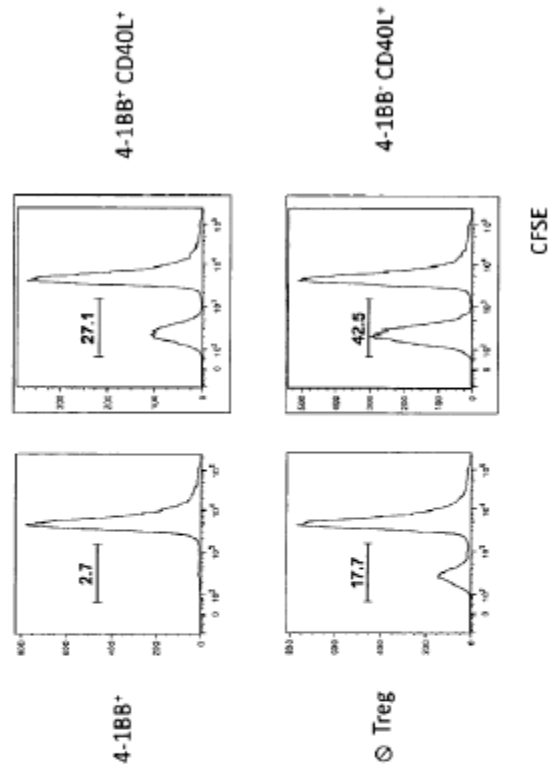


Fig. 6

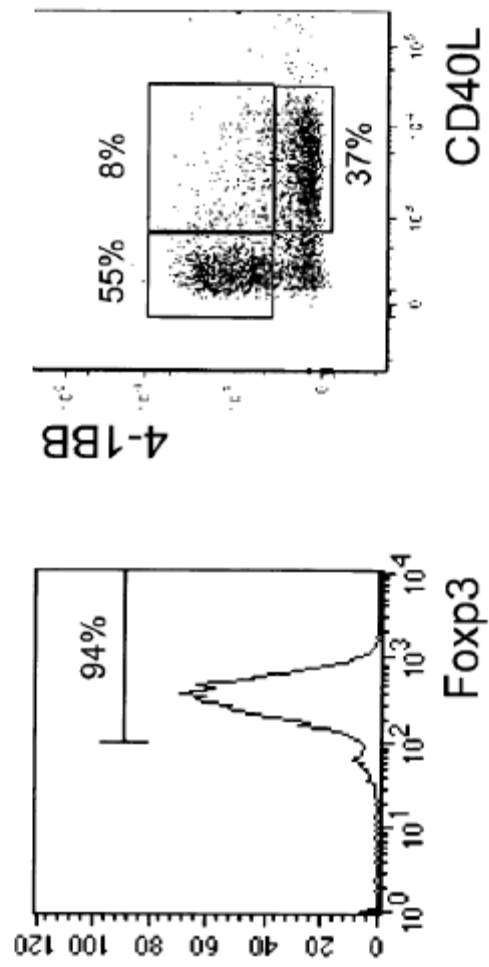


Fig. 7

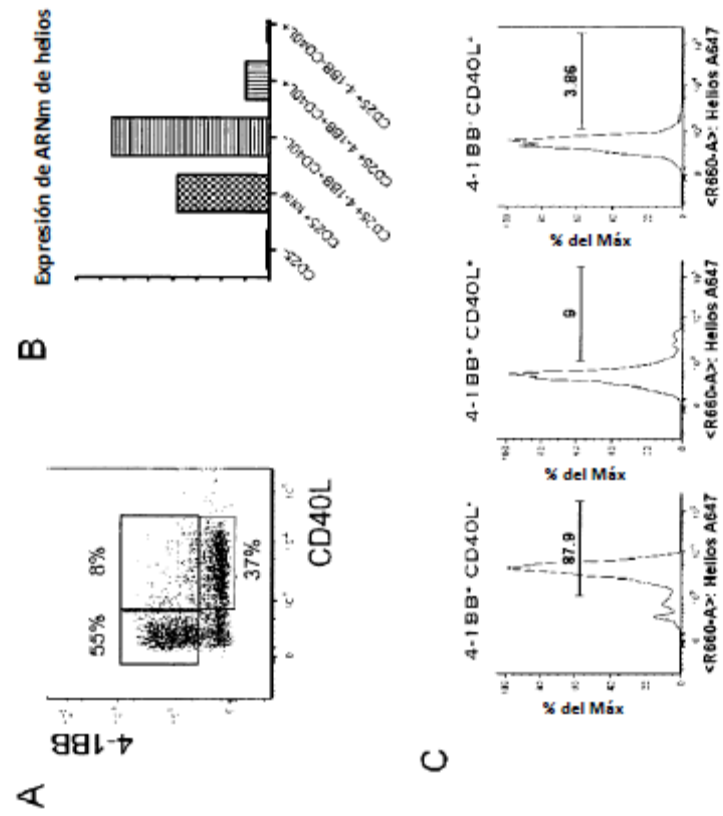


Fig. 8

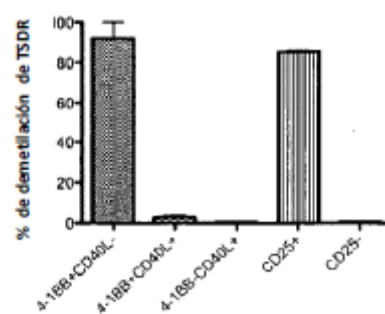


Fig. 9

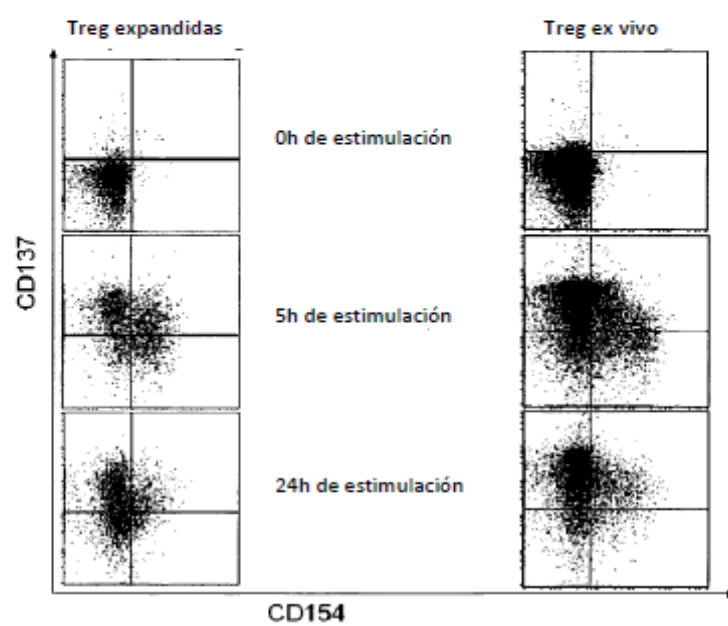


Fig. 10

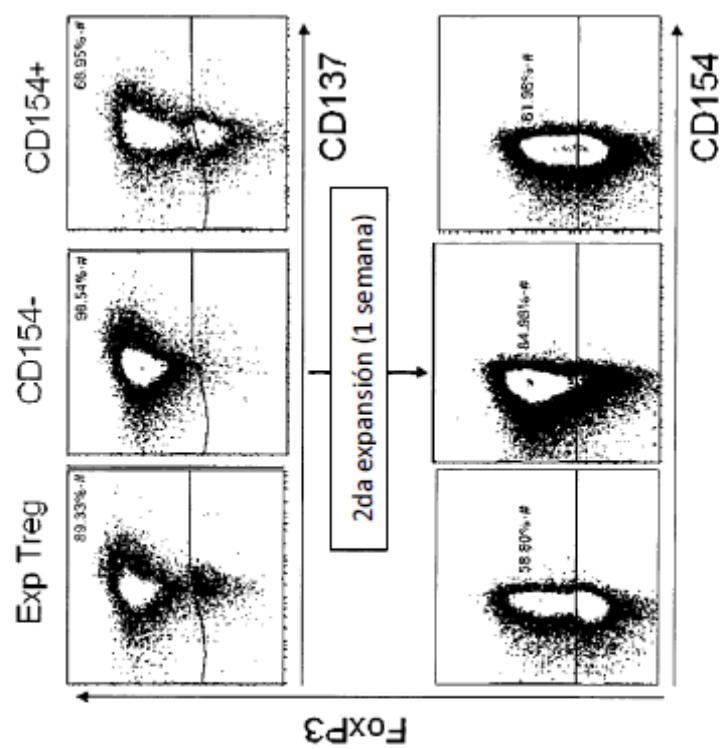


Fig. 11

