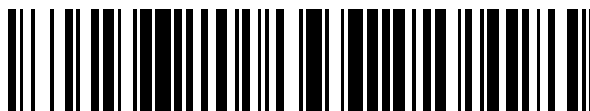


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 955**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006** **E 06760937 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016** **EP 1913387**

54 Título: **Método para identificar linfocitos T reguladores**

30 Prioridad:

02.08.2005 AU 2005904145

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

16.03.2016

73 Titular/es:

**CENTENARY INSTITUTE OF CANCER MEDICINE
& CELL BIOLOGY (100.0%)
ROYAL PRINCE ALFRED HOSPITAL,
MISSENDEN ROAD, BUILDING 93
CAMPERDOWN, NSW 2050, AU**

72 Inventor/es:

**SASSON, SARAH CHRISTINA;
SEDDIKI, NABILA;
ZAUNDERS, JOHN JAMES;
FAZEKAS DE ST GROTH, BARBARA DENISE;
KELLEHER, ANTHONY DOMINIC y
LANDAY, ALAN LEE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 563 955 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

Método para identificar linfocitos T reguladores

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos y a kits para la identificación, cuantificación y aislamiento de linfocitos T reguladores, a métodos y a kits para el diagnóstico o la monitorización de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoinflamatorias, enfermedades alérgicas, predisposiciones a las mismas, enfermedades infecciosas, del cáncer, del tratamiento del cáncer y/o del trasplante de órganos, basados en la cantidad de linfocitos T reguladores, a métodos y a kits para la predicción de las respuestas al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, de enfermedades inmunoinflamatorias, de enfermedades alérgicas, de predisposiciones a las mismas, de enfermedades infecciosas, del cáncer y/o del trasplante de órganos, basados en la cantidad de linfocitos T reguladores, y a métodos y kits para la terapia mediante el uso de linfocitos T reguladores aislados.

Antecedentes de la invención

La identificación de los tipos celulares específicos presentes en una muestra biológica comprende un aspecto fundamentalmente importante del empeño científico, diagnóstico y médico. El medio mediante el cual puede llevarse a cabo dicha identificación a menudo implica averiguar el tipo de moléculas expresadas en la superficie de las células. Dichos patrones de expresión de la superficie de las células pueden ser determinados mediante el uso de los métodos habituales conocidos por los expertos en la materia, normalmente implica la exposición de las células a anticuerpos que son específicos para ciertas moléculas de la superficie de las células. Los anticuerpos usados con este fin pueden ser conjugados directa o indirectamente con un fluorocromo que emite una señal tras una excitación con luz de una cierta longitud de onda. De esta forma puede determinarse la presencia y cuantificar las poblaciones celulares en particular en una muestra biológica.

Dichas técnicas han encontrado una aplicación en particular en el campo de la inmunología, donde pueden identificarse diferentes poblaciones de células inmunitarias en una muestra biológica basándose en su patrón de expresión de la superficie celular. Por ejemplo, se sabe que muchos linfocitos expresan el CD45 en su superficie, y que una población en particular de linfocitos, conocida como linfocitos T, también puede expresar otras diversas moléculas en la superficie celular que incluyen CD4 y CD25, dependiendo de su nivel de activación y de desarrollo.

Los linfocitos T CD4⁺ comprenden una población heterogénea de linfocitos T que tienen una importancia fundamental tanto en la generación de respuestas inmunitarias como en la supresión de enfermedades autoinmunitarias. Una subpoblación distinta de linfocitos T CD4⁺ también expresa el CD25 y el factor de transcripción Foxp3. Esta subpoblación, ampliamente definida como linfocitos T reguladores (Treg), juega un papel fundamental en el mantenimiento de la autotolerancia (I). Aunque las mejores pruebas de la importancia de los Treg proceden de modelos de ratón, un número creciente de informes ha detallado alteraciones en el número y/o en la función de los Treg en pacientes humanos con una gran diversidad de enfermedades autoinmunitarias (2 - 8), inmunoinflamatorias (9) y alérgicas (10, 11), además del muy grave síndrome IREK (desregulación inmunitaria, poliendocrinopatía, enteropatía y herencia ligada al cromosoma X), en el que el propio factor de transcripción regulador maestro Foxp3 es defectuoso (12). También se ha informado de alteraciones en las cifras de los Treg en cánceres tales como el carcinoma hepatocelular (13) y el cáncer de cabeza y cuello (14). Cupedo et al 2005 (Eur J Immunol, 35 (2) págs. 383 - 390) describe el desarrollo y la activación de los linfocitos T reguladores en el feto humano.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de un medio para identificar y cuantificar de forma precisa las poblaciones de Treg en una muestra biológica. Sin embargo, ha resultado ser difícil distinguir de forma precisa los Treg de los linfocitos T CD25⁺ activados y de memoria, particularmente en la sangre periférica humana, en la que hasta el 20 % de los linfocitos T CD4⁺ con exposición previa a un antígeno también expresan el CD25 (15). Dicha confusión en la identificación de la identidad precisa de las poblaciones de linfocitos T ha dado como resultado que diversos estudios comuniquen unos resultados ambiguos. Por ejemplo, algunos estudios han mostrado una aparente reducción en las cifras de los Treg en afecciones autoinmunitarias (2, 3, 8, 16), mientras que otros han mostrado unas cifras normales o incluso aumentadas de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ (17 - 20).

Los inventores han demostrado que una subpoblación de linfocitos humanos adultos sin exposición previa a Treg CD4⁺CD25⁺ derivados del timo puede distinguirse de la gran población de linfocitos T CD25⁺ convencionales con exposición previa a un antígeno sobre la base de la expresión de CD45RA⁺ / RO⁻ (21). Esta población de Treg sin exposición previa está reducida en los pacientes jóvenes con una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), lo que es coherente con la existencia de una deficiencia primaria en la producción de Treg en estos pacientes (22). Sin embargo, el ensayo de los inventores con 38 anticuerpos monoclonales diferentes no consiguió proporcionar ningún medio para separar los Treg CD45RA⁻ / RO⁺ de los linfocitos T activados / de memoria CD45RA⁺ / RO⁺ (21). Muchos de estos anticuerpos monoclonales habían sido reivindicados previamente por proporcionar un medio preciso para la identificación de los Treg CD45RA⁻ / RO⁺ (15, 23). Por lo tanto, es evidente que existe una necesidad de unos métodos mejorados para la identificación de las poblaciones de Treg.

Dado que tanto los linfocitos T CD4⁺ con exposición previa a un antígeno como los Treg CD4⁺ también pueden expresar el CD25, los métodos convencionales para la identificación de los Treg sobre la base del estado CD4 / CD25 son inadecuados, dando lugar a una potencial mala interpretación de los datos y a una incorrecta asociación de poblaciones de linfocitos T en particular con estados patológicos en particular. De hecho, al menos parte de la controversia que rodea a la cuestión de si los pacientes con enfermedades alérgicas, autoinmunitarias e inmunoinflamatorias tienen unas deficiencias primarias en las cifras o en la función de los Treg se basa en la dificultad de la identificación precisa de los Treg. El abanico de expresión constitutiva del CD25 por parte de los Treg humanos se solapa con el de los linfocitos CD4⁺ activados / de memoria con exposición previa a un antígeno. Además, aunque el Foxp3 es crucial para el desarrollo de los Treg, también es expresado por los linfocitos T activados, y por lo tanto no consigue proporcionar una clara separación de los Treg y de los linfocitos CD4⁺ activados / de memoria (24). Por lo tanto, existe una clara necesidad de un método mejorado para la identificación y la cuantificación precisa de las poblaciones de Treg.

La presente invención se fundamenta en el sorprendente e inesperado hallazgo por parte de los inventores de que las poblaciones de Treg pueden ser definidas de forma precisa mediante la evaluación del nivel del CD127 expresado en la superficie de dichas poblaciones.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para la identificación de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, en el que dicho linfocito o linfocitos T reguladores se distinguen de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ convencionales activados y de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ de memoria basándose en el nivel de expresión del CD127 en las células CD4⁺CD25⁺, método que comprende:

- (a) (i) el análisis de al menos una célula en una muestra biológica de un primate para la determinación del nivel de expresión celular de CD127, de CD4 y de CD25; o
- (ii) el análisis de al menos una célula en una muestra biológica de un primate para la determinación del nivel de expresión celular de CD127, en el que la al menos una célula de la muestra ha sido ensayada previamente para comprobar la expresión de CD4 y CD25 y se ha encontrado que es CD4⁺ y CD25⁺; y
- (b) la identificación de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores basada únicamente en la célula o las células con una expresión CD127^{low}CD4⁺CD25⁺.

La muestra biológica de un primate puede comprender una línea celular o un fluido o un tejido del cuerpo. El fluido o el tejido del cuerpo pueden comprender sangre, linfa, timo, nódulo linfático, bazo o amígdala. La muestra biológica de un primate puede comprender al menos un linfocito aislado. La muestra biológica de un primate puede comprender al menos un linfocito T.

La etapa de análisis puede comprender un inmunoensayo. El inmunoensayo puede comprender un inmunoensayo de adsorción enzimática o un radioinmunoensayo. Adicionalmente o como alternativa, la etapa de análisis puede comprender una citometría de flujo. Adicionalmente o como alternativa, el análisis por citometría de flujo puede comprender una clasificación celular activada por fluorescencia.

Adicionalmente o como alternativa, el nivel de expresión celular puede medirse mediante una reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa puede ser una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. Opcionalmente la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo después de la clasificación celular activada por fluorescencia.

El método puede usarse para el aislamiento de los linfocitos T reguladores.

El método puede usarse para el diagnóstico o la monitorización de enfermedades autoinmunitarias, de enfermedades inmunoinflamatorias, de enfermedades alérgicas, de predisposiciones a las mismas, de enfermedades infecciosas, del cáncer, del tratamiento del cáncer y/o del trasplante de órganos.

El método puede usarse para la predicción de la respuesta a una terapia para enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoinflamatorias, enfermedades alérgicas, predisposiciones a las mismas, enfermedades infecciosas, cáncer y/o trasplante de órganos.

Definiciones

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "que comprende" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente únicamente". Adicionalmente, las variaciones de la expresión "que comprende", tales como "comprender" y "comprende", tienen los correspondientemente variados significados.

El término "expresión", según se usa en el presente documento, se refiere indistintamente a la expresión de un gen o de un producto génico, incluyendo el polipéptido o la proteína codificada. La expresión de un producto génico puede determinarse, por ejemplo, mediante un inmunoensayo, mediante el uso de uno o más anticuerpos que se unen al

polipéptido. Como alternativa, la expresión de un gen puede determinarse, por ejemplo, midiendo los niveles de ARNm (ARN mensajero).

Según se usa en el presente documento, el término "polipéptido" significa un polipéptido formado por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Consecuentemente, el término "polipéptido" incluye en su ámbito una proteína completa y fragmentos de la misma.

Según se usa en el presente documento el término "polinucleótido" significa un ácido nucleico formado por residuos de nucleótidos unidos entre sí por un esqueleto de fosfodiéster. Consecuentemente, un polinucleótido incluye en su ámbito ADN, ARN, y en particular ARN mensajero ARN (ARNm).

Según se usa en el presente documento el término "oligonucleótido" significa un ácido nucleico monocatenario capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ácidos nucleicos dirigida por un molde. Un oligonucleótido es un ácido nucleico monocatenario con una longitud que normalmente varía desde 2 hasta aproximadamente 500 bases. La longitud precisa de un oligonucleótido variará dependiendo de la aplicación en particular, pero normalmente varía desde 15 hasta 30 nucleótidos. No es necesario que un oligonucleótido refleje la secuencia exacta del molde, pero debe ser lo suficientemente complementario como para hibridar con el molde, facilitando así la amplificación preferente de una secuencia objetivo. Por lo tanto, una referencia a que un nucleótido es "específico" para un gen o un producto génico en particular, tal como el ARNm, incluye en su ámbito un oligonucleótido que comprende una complementariedad de secuencia suficiente como para hibridar preferentemente con el molde, sin reflejar necesariamente la secuencia exacta del polinucleótido objetivo.

Según se usa en el presente documento el término "Treg" se refiere a los linfocitos T reguladores, tanto en singular como en plural.

Según se usa en el presente documento, los términos "low" o "lo" se usan indistintamente y se refieren a un nivel de expresión de una molécula o de un polinucleótido en particular, tal como CD127, CD4 o CD25, por parte de una célula o de una población de células en particular de una muestra, que es bajo cuando se compara con el nivel de expresión de esa molécula o polinucleótido por parte de la población de células que comprende la totalidad de la muestra que se está analizando. Por ejemplo, el término "CD127^{low}" se refiere al nivel de expresión de CD127 por parte de una célula o de una población de células en particular en la misma muestra que es bajo cuando se compara con el nivel de expresión del CD127 por parte de la población de células que comprende la totalidad de la muestra que se está analizando. Más particularmente, el término "low" puede referirse a una población de células distinta que expresa una molécula en particular a un nivel que es menor que el que es expresado por una o más poblaciones distintas diferentes en una muestra. De forma análoga, los términos "high" o "bright" se usan indistintamente y tienen un significado correspondiente. El término "int" puede referirse a una población de células distinta que expresa una molécula, en particular a un nivel que está entre el que es expresado por dos o más de otras poblaciones distintas de una muestra. Esto es, el nivel de expresión es menor que el que es expresado por otra población de células distinta, y mayor que el expresado por otra población de células distinta.

Según se usa en el presente documento, el término "+" , cuando se usa en relación con los niveles de expresión de una molécula o de un polinucleótido en particular, se refiere a un nivel de expresión de una molécula o de un polinucleótido en particular, tal como CD127, CD4 o CD25, por parte de una célula o de una población de células en particular de una muestra, que es elevado o intermedio cuando se compara con el nivel de expresión de esa molécula o polinucleótido por parte de la población de células que comprende la totalidad de la muestra que se está analizando. Por ejemplo, el término "CD4⁺" se refiere a un nivel de expresión de CD4 por parte de una célula o de una población de células en particular de la muestra que es relativamente alto o intermedio cuando se compara con el nivel de expresión de CD4 por parte de la población de células que comprende la totalidad de la muestra que se está analizando.

Según se usa en el presente documento, el término "" cuando se usa en relación con los niveles de expresión de una molécula o de un polinucleótido en particular, se refiere a un nivel de expresión de una molécula o de un polinucleótido en particular, tal como CD127, CD4 o CD25, por parte de una célula o de una población de células en particular de una muestra que es bajo cuando se compara con el nivel de expresión de esa molécula o polinucleótido por parte de la población de células que comprende la totalidad de la muestra que se está analizando. Por ejemplo, el término "CD4⁺" se refiere a un nivel de expresión de CD4 por parte de una célula o de una población de células en particular de una muestra que es bajo cuando se compara con el nivel de expresión de CD4 por parte de la población de células que comprende la totalidad de la muestra que se está analizando.

Según se usa en el presente documento, los términos "low" o "lo" pueden referirse a una cantidad de células en particular en una muestra biológica, tales como células CD127^{low}CD4⁺CD25⁺, que es baja en comparación con la cantidad de células que comprende la totalidad de la muestra que se va a analizar. Adicionalmente o como alternativa, el término "low" puede referirse a una cantidad de células en particular en una muestra, tales como células CD127^{low}CD4⁺CD25⁺, cuya proporción en relación con la totalidad de la muestra que se va a analizar es baja cuando se compara con una muestra de control. Normalmente, una muestra de control puede ser una muestra de un sujeto sin ninguna enfermedad autoinmunitaria, inmunoinflamatoria o alérgica ni predisposición a las mismas. Los

términos "high" o "bright" pueden tener los significados correspondientes.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Ahora se describirán las formas de realización de la presente invención únicamente a modo de ejemplo, mediante referencia a los dibujos anexos:

Figura 1: comparación de la expresión en la superficie celular de CD4 frente a CD25 en leucocitos de sangre periférica humanos y de ratón y en células de nódulos linfáticos mediante una citometría de flujo.

10 Los leucocitos de la sangre periférica y las células de los nódulos linfáticos (LN) se tiñeron mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra CD4 y CD25, y se seleccionaron las células vivas que expresaban el CD4. (a) En ratones, el número de linfocitos T CD4⁺ convencionales activados que expresan el CD25 es bajo en comparación con el número de linfocitos CD4⁺CD25⁺ reguladores, incluso cuando un gran número de linfocitos T CD4⁺ está proliferando activamente (gráficos "estimulados"). (b) En la sangre periférica humana de un ser humano adulto, hasta un 20 - 30 % de los linfocitos T CD4⁺ expresan el CD25, y muchos de estos linfocitos parecen ser linfocitos efectores y de memoria resultantes de un encuentro con antígenos foráneos. Por el contrario, el perfil sanguíneo de cordón umbilical humano se parece al de los ratones. El perfil del nódulo linfático de un humano adulto es similar al de la sangre periférica de un humano adulto. (c) Comparación de la expresión de CD38, de CD44, de CD62L, de OX40 y de CTLA-4 entre los linfocitos T CD4⁺ de la sangre periférica de ratón y de humano. Se seleccionan las células vivas que expresan el CD4. El patrón de expresión de las células humanas no puede ser predicho de forma precisa sobre la base de los datos murinos. (d) La tinción para 8 marcadores no consiguió distinguir los linfocitos T CD4⁺CD25^{high} de sangre periférica humana de los linfocitos T activados / de memoria. Los leucocitos de la sangre periférica se tiñeron para la expresión de CD4, de CD25 y de cualquiera de HLA-DR, CD71, CCR7, CD45RA, CD27, CD58, CD95 o CD45RO. Los perfiles se clasifican según las células vivas que expresan el CD4. Mientras que todos los CD45RA⁺, CD45RO⁺, CD58⁺ y CD95⁺ revelaron una segunda población de linfocitos T CD45RA⁺ CD4⁺, cada uno de estos anticuerpos fracasó al distinguir entre los Treg CD45RO⁺ CD4⁺ y los linfocitos T activados / de memoria convencionales que expresan el CD25.

Figura 2: expresión de CD127 y de FoxP3 en sangre de adulto, en nódulo linfático, en sangre de cordón umbilical y en timo. (a) Se seleccionan los gráficos para los linfocitos T CD4⁺CD8⁻. Los linfocitos T CD25⁺CD127^{lo} están encuadrados y se muestra el % de células en el cuadro. En la muestra del nódulo linfático también están encuadrados los linfocitos CD25⁺CD127^{lo}. (b) Se seleccionan los gráficos para los linfocitos T CD4⁺CD8⁻. Los linfocitos FoxP3⁺CD127^{lo} están encuadrados y en el cuadro se muestra el % de células. (c) Correlación entre los fenotipos FoxP3⁺CD25⁺ y CD25⁺CD127^{lo} en sangre periférica. Se muestra la selección de los linfocitos CD4⁺ para cada subconjunto, seguida de la distribución de las células seleccionadas de acuerdo con el subconjunto recíproco. (d) Correlación entre los fenotipos FoxP3⁺ y CD25⁺CD127^{lo} en el timo.

Figura 3: correlación entre la expresión del fenotipo FoxP3 y CD127^{lo}. (a) Los leucocitos de sangre de adulto, de nódulo linfático y de sangre de cordón umbilical fueron seleccionados según las poblaciones CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ y CD45RA⁻. Los linfocitos FoxP3⁺ están encuadrados y se muestra el % de linfocitos en el cuadro, junto con la expresión de CD25 frente a CD127 en la ventana de adquisición de FoxP3⁺. (b) Correlación entre los porcentajes de linfocitos CD25⁺CD127^{lo} y CD25⁺FoxP3⁺ en las poblaciones CD4⁺CD45RA⁺ y CD45RA⁻ en muestras de sangre periférica 9 de voluntarios sanos.

Figura 4: porcentajes de los linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} en la sangre periférica de 43 voluntarios sanos. (a) Estrategia de clasificación para los linfocitos CD4⁺ subdivididos en las subpoblaciones CD45RA⁻ y CD45RA⁺. Los cuadros indican la ubicación de las ventanas de adquisición del análisis para cada población celular. (b) Linfocitos CD45RA⁻ y CD45RA⁺ CD25⁺CD127^{lo}, expresados en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ totales. Los porcentajes totales de los Treg se derivaron mediante la adición entre sí de los valores para los subconjuntos de Treg CD45RA⁻ y CD45RA⁺. Las barras horizontales representan las medias del grupo. (c) Relación entre varias subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y la edad.

Figura 5: análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de Foxp3 en poblaciones clasificadas de linfocitos T CD4⁺. (a) Estrategia de clasificación para el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ a partir de sangre humana y de cordón umbilical. Los puntos de las gráficas están seleccionados para los linfocitos que expresan el CD4, junto con el CD45RA en el caso de la sangre de adulto. Los cuadros numerados indican la ubicación de las ventanas de adquisición de la clasificación de flujo para cada población celular. (b) Se llevó a cabo una RT qPCR para Foxp3 por duplicado mediante el uso del ARN preparado a partir de poblaciones celulares clasificadas. Se compararon los linfocitos CD45RA⁻ clasificados a partir de 4 donantes, mientras que los linfocitos CD45RA⁺ suficientes sólo están disponibles a partir de 2 donantes. (c) RT qPCR para T-bet y GATA3 mediante el uso del ARN preparado a partir de poblaciones celulares clasificadas procedentes de 2 donantes adultos.

Figura 6: supresión de la proliferación *in vitro* por parte de los Treg de sangre de adulto y de cordón umbilical. (a) Estrategia de clasificación para el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T CD4⁺. Los puntos de las gráficas están seleccionados para los linfocitos que expresan el CD4, junto con el CD45RA en el caso de la sangre de adulto. Los cuadros numerados indican la ubicación de las ventanas de adquisición de la clasificación de flujo para cada población celular. (b) Supresión por parte de poblaciones clasificadas mediante flujo (1 - 5) de sangre de adulto y de poblaciones (6 - 8) de sangre de cordón umbilical. Las células respondedoras se clasificaron como linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻ autólogos (población 5) para la sangre de adulto, y linfocitos CD4⁺ CD25⁻ autólogos (población 8) para la sangre de cordón umbilical. Las proporciones entre los linfocitos

supresores y los respondedores se muestran por encima de la figura. Las barras representan la media $\pm$ EEM de 3 - 4 cultivos replicados. Los ensayos de la sangre de adulto son representativos de dos experimentos independientes, y los datos de la sangre de cordón umbilical derivan de un único experimento. (c) Estrategia para el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T CD4⁺CD127^{lo} a partir de sangre de adulto, clasificados sobre la base de la expresión del CD25. (d) Supresión y producción de citocinas por parte de poblaciones clasificadas mediante flujo (9 - 14) a partir de sangre de adulto. Las células respondedoras era linfocitos clasificados CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻ autólogos (población 14). El límite de detección en los ensayos de citocinas está indicado por la línea punteada. nd: no detectado. (e) Cultivos transpocillo de las poblaciones clasificadas mediante flujo (9, 13 - 14 y ninguno) en una proporción de 1:1.

Figura 7: comparación de las cifras de los Treg en los controles y en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino mediante el uso de varias estrategias de clasificación. Se purificaron las PBMC de 43 pacientes de control y de 38 con enfermedad inflamatoria del intestino (que comprenden 19 pacientes con enfermedad de Crohn (CD) y 19 pacientes con colitis ulcerosa (UC)) a partir de la sangre y se tiñeron con anticuerpos monoclonales (mAbs) contra CD4, CD25, CD127 y CD45RA. (a, a) Los linfocitos que expresan el CD4 fueron analizados de acuerdo con las ventanas de adquisición A hasta D, y los puntos de datos individuales se representaron en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺. (c) Los linfocitos que expresan el CD4 fueron subdivididos en las poblaciones CD45RA⁺ y CD45RA⁻, analizados de acuerdo con las ventanas de adquisición E y F y los puntos de datos individuales se representaron en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺. Los valores del cuadrado lejano de la derecha fueron derivados mediante la adición de los valores individuales derivados a partir de las ventanas de adquisición E y F. Las barras horizontales representan las medias del grupo. La media $\pm$ EEM en forma del % de los linfocitos T CD4⁺ para las ventanas de adquisición E, F y E + F fueron las siguientes: Treg sin exposición previa (ventana de adquisición E), control 2,05 $\pm$ 0,14, CD 1,34 $\pm$ 0,14, UC 1,16 $\pm$ 0,13; Treg efectores / de memoria (ventana de adquisición F), control 4,29 $\pm$ 0,24, CD 6,05 $\pm$ 0,69, UC 4,19 $\pm$ 0,32; Treg totales (ventanas de adquisición E + F), control 6,35 $\pm$ 0,26, CD 7,39 $\pm$ 0,72, UC 5,34 $\pm$ 0,38. El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos usó las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn, que comparan los valores medios de CD y de UC con los de los grupos de control. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Figura 8: correlación de las diferentes estrategias de selección para los Tregs de acuerdo con las ventanas de adquisición mostradas en la Fig. 7, mediante el uso de los datos agrupados de 81 pacientes y controles. (a) Ventana de adquisición A frente a la ventana de adquisición E. (b) Ventana de adquisición B frente a la ventana de adquisición E. (c) Ventana de adquisición C frente a la ventana de adquisición E. (d) Ventana de adquisición D frente a la ventana de adquisición F. Las ecuaciones de regresión lineal se muestran en cada cuadrado. La significación de los coeficientes de correlación se estimó mediante el uso de una prueba de Spearman no paramétrica.

Figura 9: relación entre los Treg CD4⁺ y otras subpoblaciones y la edad en pacientes de control y con enfermedad inflamatoria del intestino. Los datos derivan del análisis presentado en la Fig. 7 c. Se llevó a cabo una regresión lineal para los grupos de control (N = 43) y de pacientes (N = 38). La significación de los coeficientes de correlación se estimó mediante el uso de una prueba de Spearman no paramétrica.

Figura 10: comparaciones de los porcentajes de Treg en los controles, en pacientes con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerosa, divididos en cohortes de 3 edades. Los datos derivan del análisis presentado en la Fig. 7 c. (a) Linfocitos CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺CD127^{lo} (ventana de adquisición F, Fig. 7 c) en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ totales. (b) Linfocitos CD4⁺CD25⁺CD45RA⁻CD127^{lo} (ventana de adquisición E, Fig. 7 c) en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ totales. (c) Linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} totales (datos derivados mediante la adición de los datos individuales de las ventanas de adquisición E y F, Fig. 7 c) en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ totales. Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn para comparar los valores medianos de CD y de UC con los de los grupos de control. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Figura 11: ningún efecto sobre la actividad patológica ni la terapia en las cifras de los Treg sin exposición previa en la cohorte de pacientes de 15 - 30 años. Los datos derivan del experimento mostrado en la Figura 7. Las muestras de los pacientes se dividieron entre aquellas que manifiestan una enfermedad activa frente a una inactiva sobre la base del aspecto macroscópico en el momento de la colonoscopia o de la cirugía, junto con el análisis histopatológico. La terapia incluía tratamientos con corticosteroides, análogos de ADN, aminosalicilatos y/o antibióticos. Los pacientes sin "ninguna terapia" no estaban recibiendo ningún tratamiento.

Figura 12: no hay ninguna diferencia significativa entre el porcentaje de los Treg CD25⁺CD127^{lo} en los linfocitos T CD4⁺ en la mucosa intestinal y en los nódulos linfáticos drenantes en los pacientes con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerosa. Los datos indican que el porcentaje de Treg en la mucosa de los nódulos linfáticos es generalmente mayor que en la sangre periférica (compárese con la Figura 4).

Figura 13: estrategia de selección convencional para distinguir los Treg en controles normales de diferentes edades. Paneles superiores: ejemplos de tinción con CD4 y CD25. Panel inferior: aumento en las cifras de los Treg a lo largo de la vida, evaluado mediante el uso de una tinción convencional de CD4 y de CD25. *** $P < 0,001$. CB = sangre de cordón umbilical; 20 - 25 a = controles entre las edades de 20 y 25 años; > 60 a = controles con una edad mayor de 60 años.

Figura 14: nueva estrategia para distinguir los Treg en controles normales de diferentes edades, mediante el uso de una tinción con CD4, CD25, CD127 y CD45RA. Paneles superiores: clasificación de los linfocitos CD4⁺. Paneles inferiores: clasificación de los linfocitos CD4⁺CD45RA⁻ o CD45RA⁺.

Figura 15: comparación de las cifras de los Treg mediante el uso de una clasificación de los linfocitos CD25⁺FoxP3⁺ en comparación con los linfocitos CD25⁺CD127^{lo}. Se calcularon los porcentajes de linfocitos en la sangre de cordón umbilical y en la sangre periférica de grupos de adultos entre 20 - 25 años y mayores de 60 años de edad mediante el uso de las ventanas de adquisición indicadas. * P < 0,05; ns, no es estadísticamente significativo.

Figura 16: cambios en las cifras de los Treg CD45RA⁺ y CD45RA⁻ con la edad. Las muestras de leucocitos sanguíneos se tiñeron con anticuerpos contra CD4, CD25 CD45RA y CD127, y se clasificaron como en la Figura 14, paneles inferiores. Se aprecia una disminución recíproca en los Treg CD45RA⁺ y un aumento en los Treg CD45RA⁻ con la edad. *** P < 0,001, **P < 0,01, * P < 0,05.

Figura 17: la supresión está confinada a los linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} clasificados a partir de donantes de todas las edades. A) Estrategia de clasificación para distinguir los Treg en controles normales de diferentes edades, mediante el uso de una tinción con CD4, CD25 y CD127. B) Supresión por parte de poblaciones clasificadas mediante flujo procedentes de sangre de adulto y de cordón umbilical. Se seleccionaron los linfocitos respondedores autólogos CD4⁺CD127^{hi}CD25⁻. Las proporciones entre los linfocitos supresores y los respondedores se muestran debajo de las figuras. Se aplicaron pulsos a los cultivos con timidina a las 72 h y se recogieron 16 h después. Las barras representan los recuentos medios +/- EEM por minuto de 3 - 4 cultivos replicados. C) Los cultivos replicados de las mismas poblaciones seleccionadas se establecieron mediante el uso de células respondedoras marcadas con CFSE y se calculó el % de proliferación con respecto al número medio de células divididas en los cultivos que contienen únicamente células respondedoras. Las barras representan los recuentos medios +/- EEM por minuto de 3 - 4 cultivos replicados.

Figura 18: comparación de las cifras de Treg circulantes en pacientes con enfermedad de Alzheimer frente a controles ancianos sanos. Las muestras de leucocitos sanguíneos se tiñeron con anticuerpos contra CD4, CD25 CD45RA y CD127, y se clasificaron como en la Figura 14, paneles inferiores. Los 4 pacientes de control tenían entre 75 y 90 años de edad y tenían una función cognitiva normal. Los 5 pacientes con enfermedad de Alzheimer tenían una edad de entre 83 y 92 años. Los Tregs sin exposición previa se clasificaron como CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}CD45RG⁻, y los Tregs activados / de memoria se clasificaron como CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}CD45RG⁺. No se observó ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

Figura 19: ejemplo de clasificación de los Treg en la sangre periférica de un paciente con eccema, teñidos con CD4, CD25, CD127 y FoxP3. Los gráficos de puntos están seleccionados para los linfocitos CD4⁺. El patrón de expresión de FoxP3 y de CD127 es similar al de los controles (por ejemplo, en la Figura 3). Por lo tanto, los linfocitos FoxP3⁺ son CD25⁺ y se corresponden con la población CD127^{lo} CD25⁺.

Figura 20: comparación de las cifras de Treg entre pacientes con eccema y controles sanos, mediante el uso de diferentes estrategias de clasificación. (A) Selección convencional CD4⁺CD25⁺. La diferencia no es estadísticamente significativa. (B) Ventana de adquisición CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}, según se ilustra en la Figura 19. Los resultados de (B) fueron confirmados mediante el uso de una tinción FoxP3. Los pacientes con eccema tenían significativamente más Treg que los controles emparejados por edades (P < 0,001).

Figura 21: frecuencia de Tregs totales (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}) y de Tregs sin exposición previa (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁺CD127^{lo}) en la sangre de sujetos no atópicos, de sujetos atópicos sin asma y de sujetos atópicos con asma. Los datos se muestran como gráficos de cajas (entre el 25 % y el 75 %) con la mediana y el intervalo. No había ninguna diferencia significativa entre los 3 grupos.

Figura 22: frecuencia de los Tregs en la sangre de sujetos no atópicos (prueba intraepidérmica negativa (SPT-ve)) y los sujetos atópicos se dividen de acuerdo con su respuesta de la IL5 a los ácaros del polvo del hogar (HDM) en cultivo. Paneles superiores: Tregs totales (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}) y Tregs CD45RA⁺ (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁺CD127^{lo}). Panel inferior: proporción entre los Tregs CD45RA⁺ sin exposición previa y los Tregs CD45RA⁺ activados / de memoria. Tanto el porcentaje de Tregs sin exposición previa como la proporción de Tregs efectores / de memoria estaba significativamente aumentado en forma de una proporción de linfocitos T CD4⁺ en pacientes que muestran una IL-5 detectable en respuesta a los HDM en cultivo, mientras que no se produjo un aumento global en los Treg totales en este grupo.

Figura 23: frecuencia de Tregs sin exposición previa, activados y totales en la sangre de pacientes con síndrome de Sjogren primario. Las muestras de leucocitos sanguíneos se tiñeron con anticuerpos contra CD4, CD25, CD45RA y CD127, y se clasificaron como en la Figura 14, paneles inferiores. Los controles estaban emparejados por edades y sexo. Se produjo un aumento significativo tanto en los Tregs sin exposición previa como en los totales en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ en el grupo de pacientes, en comparación con los controles emparejados por edades.

Figura 24: ejemplo de expresión del CD127 en 3 grupos diferentes de pacientes con VIH. (a) Los gráficos están seleccionados según los linfocitos T CD4⁺CD8⁻. Los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} están encuadrados y se muestra el % de linfocitos en el cuadro. (b) Los gráficos están seleccionados según los linfocitos T CD4⁺CD8⁻CD45RO⁺ o RO⁻. Los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} están encuadrados. IRD = enfermedad de reconstitución inmunitaria.

Figura 25: correlación entre la expresión del fenotipo FoxP3 y CD127^{lo} en un paciente VIH⁺ con enfermedad de reconstitución inmunitaria. Se seleccionaron las PBMC de un paciente VIH⁺IRD⁺ según los linfocitos CD3⁺CD4⁺. Los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} están encuadrados y se muestra la correlación entre los porcentajes de linfocitos CD25⁺Foxp3⁺ y CD127^{lo}FoxP3⁺ en la misma ventana de adquisición.

Figura 26: cifras de los Treg en pacientes VIH⁺, divididos en seroconvertidores, pacientes con una enfermedad avanzada (+/- terapia antirretrovírica) y pacientes con enfermedad avanzada, terapia antirretrovírica y enfermedad de reconstitución inmunitaria. El número medio de Tregs totales en los

seroconvertidos era de 8,68 $\pm$ 0,83 % (media $\pm$ EEM), en los pacientes con una enfermedad avanzada con o sin terapia era de 6,68 $\pm$ 0,68 y de 8,78 $\pm$ 2,3 % respectivamente, y en los pacientes con enfermedad de reconstitución inmunitaria era de 16,64 $\pm$ 2,66 %. Los pacientes con enfermedad de reconstitución inmunitaria tenían un porcentaje significativamente mayor de Treg CD45RO⁺ y de linfocitos Treg totales, mientras que el número de Tregs sin exposición previa había aumentado significativamente en los seroconvertidos en comparación con los de VIH crónico tratado con antirretrovíricos.

Figura 27: estudio longitudinal de las cifras de Treg en pacientes con melanoma, comparación entre la tinción de CD127 / CD25 / CD4 y la tinción con FoxP3 / CD25 / CD4 de tomas de muestras tres veces por semana. El número de Tregs era generalmente estable mediante el uso de cualquiera de las técnicas, con una buena correlación entre los dos métodos (panel del lado derecho).

Figura 28: estudio de vacunación en pacientes con melanoma. Se obtuvieron muestras sanguíneas de los pacientes antes de la primera vacunación y, a continuación, después de cada vacunación posterior. No hubo cambios significativos en las cifras de los Treg con la vacunación.

Figura 29: comparación entre los Treg activados en circulación frente a los sin exposición previa en pacientes con insuficiencia renal crónica (CRF), con insuficiencia renal crónica en diálisis y con trasplante renal. Los pacientes trasplantados tenían significativamente menos Treg CD45RA⁺ como resultado del tratamiento con fármacos inmunosupresores.

Figura 30: ejemplo de clasificación de los Treg en macacos, mediante el uso de anticuerpos anti-humanos que presentan una reacción cruzada con los antígenos del macaco. Paneles superiores: gráficas de puntos de los linfocitos T CD4⁺ que muestran la selección para la expresión de CD25 frente a CD45RO y CD127. Se indican los porcentajes de linfocitos en las ventanas de adquisición. Paneles inferiores: selección de los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} entre los linfocitos CD45RO⁺ y CD45RO⁺, según se indica. Los cuadrados representan las ventanas de adquisición y el porcentaje está indicado en la ventana de adquisición. Además, el porcentaje de los Tregs se calcula en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ totales (indicado en negrita).

Figura 31: subconjuntos de Treg en la sangre periférica de macacos, clasificados como en la Figura 30. El intervalo de los Tregs totales estaba entre el 4,39 % y el 11,42 %, y no había cambios significativos después de la inmunización.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Mediante el ensayo de un gran grupo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficie expresadas por los linfocitos T CD4⁺ humanos, los inventores han demostrado, mediante el uso de una citometría de flujo, de una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y de una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), que la expresión del CD127 divide a los linfocitos T humanos CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ en dos poblaciones con las características de los linfocitos Treg y de los activados / de memoria, respectivamente. La clasificación según la expresión del CD127 también aporta más claridad en la separación de los Treg CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ de los linfocitos T convencionales activados que todavía no han sido convertidos en la expresión de CD45RO. Este sorprendente e inesperado hallazgo parece contrastar con los ensayos previos de los inventores de 38 marcadores, muchos de los cuales segregan efectivamente los Treg en muestras murinas, pero que no consiguen proporcionar una separación entre los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ y los CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ activados / de memoria (Figura 1 y ref. 20). Además, mientras que los estudios previos han sugerido un bajo nivel de expresión del CD127 en la superficie de los linfocitos T reguladores murinos (25, 26), los marcadores normalmente muestran de forma distinta diferentes patrones de expresión entre las muestras de linfocitos T murinos y humanos (véase la Fig. 1 C), haciendo así que la extrapolación entre especies sea impredecible. Además, y al contrario que el punto de vista aceptado, los inventores han demostrado que la diferencia publicada en la expresión del CD127 entre los Treg CD4⁺ y los no Treg murinos es claramente insuficiente para clasificar de forma precisa las dos poblaciones mediante el uso de únicamente el CD127, y además, que el uso de CD25 y de CD127 para teñir conjuntamente los linfocitos T CD4⁺ murinos no presenta ninguna ventaja sobre el uso de únicamente el CD25 en términos de distinguir entre los Treg y los no Treg (25, 26).

La presente invención se refiere por lo tanto de forma general a una estrategia para aislar los Treg a partir de linfocitos T convencionales CD25⁺ CD4⁺ en primates sobre la base de la expresión del CD127. Como se ejemplifica en el presente documento, podría aplicarse la tinción de la superficie celular para la expresión del CD127 junto con una selección para CD4 y CD25, o con la adición de una selección para las isoformas del CD45. La validez de la estrategia de clasificación se confirmó mediante tres métodos. En primer lugar, los ensayos de supresión *in vitro* indicaron que la expresión del CD127 divide a los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en dos poblaciones, teniendo los linfocitos CD127^{lo} la actividad supresora, mientras que los linfocitos CD127^{hi} no la tienen. En segundo lugar, la tinción con anticuerpos dirigidos contra el FoxP3 indicó que existía una correlación de más del 85 % entre los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} y los linfocitos CD25⁺FoxP3⁺ en la población de linfocitos T CD4⁺ en múltiples muestras derivadas de tejidos linfoides periféricos humanos. En tercer lugar, la RT-qPCR indicó unos elevados niveles de expresión del ARNm de Foxp3 en muestras consideradas como representativas de las poblaciones de Treg. Mediante el uso de esta estrategia, los presentes inventores han demostrado que los Treg CD127^{low}CD4⁺CD25⁺ tanto en los linfocitos CD45RA⁺ positivos como negativos expresaban al menos 10 veces más ARNm de Foxp3 que los linfocitos T CD127^{hi}CD4⁺CD25⁺ emparejados según la expresión de la isoforma del CD45.

La presente invención proporciona por lo tanto métodos para la identificación de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, para la cuantificación de la cantidad de linfocitos T reguladores y para la separación de los linfocitos T reguladores viables para un estudio adicional o para su uso en terapia. Los métodos pueden comprender ensayos para comprobar el nivel de expresión celular de CD127, de CD4 y/o de CD25, en los que la expresión $CD127^{low}CD4^{+}CD25^{+}$ es indicativa de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores.

Los métodos pueden usarse para el aislamiento de los linfocitos T reguladores. Los linfocitos T reguladores aislados pueden usarse para diversos fines, que incluyen, pero no se limitan a, un cultivo celular para la amplificación de la cantidad de linfocitos T reguladores para una transferencia de linfocitos T adoptivos o una transferencia de linfocitos T autólogos, que pueden implicar o no la selección de subconjuntos de linfocitos T en particular procedentes del cultivo celular amplificado o preamplificado. Los linfocitos T reguladores aislados también pueden ser almacenados para la terapia de un sujeto en una fecha posterior.

Los métodos pueden usarse para el diagnóstico o la monitorización de enfermedades autoinmunitarias, de enfermedades inmunoinflamatorias, de enfermedades alérgicas, de predisposiciones a las mismas, de enfermedades infecciosas, del cáncer, del tratamiento oncológico y/o del trasplante de órganos.

Los métodos pueden usarse para predecir las respuestas a la terapia de enfermedades autoinmunitarias, de enfermedades inmunoinflamatorias, de enfermedades alérgicas, de predisposiciones a las mismas, de enfermedades infecciosas, del cáncer y/o del trasplante de órganos.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente con los métodos inventivos pueden ser modificados para dar cuenta que la naturaleza precisa de la muestra biológica que se está ensayando. Por ejemplo, cuando la muestra biológica comprende una población de linfocitos T que no sido previamente ensayada para comprobar la expresión de ninguna proteína ni polinucleótido, los métodos pueden comprender el ensayo para comprobar la expresión de al menos CD127, CD4 y CD25. Sin embargo, cuando la muestra biológica comprende una población de linfocitos T que ha sido ensayada previamente para comprobar la expresión de CD4 y/o de CD25, los métodos pueden comprender el ensayo únicamente de CD127 y de CD25, o de CD127 y de CD4, respectivamente. En todos los casos, los métodos inventivos pueden usarse junto con otros métodos para confirmar adicionalmente la identidad o la cantidad de los linfocitos T reguladores, por ejemplo, mediante el ensayo del nivel de expresión celular de otras proteínas o polinucleótidos, tales como CD45RA, CD45RO, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95.

Los expertos en la materia también apreciarán fácilmente que los métodos inventivos pueden usarse junto con otros métodos para confirmar adicionalmente la identidad o la cantidad de linfocitos T reguladores, por ejemplo, mediante el ensayo del nivel de expresión celular de otras proteínas o polinucleótidos, tales como CD45RA, CD45RO, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95.

Además, los inventores han aplicado la estrategia de clasificación de CD4 / CD25 / CD45RA / CD127 a 38 pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) en comparación con 43 controles. El alto grado de variabilidad entre los Treg $CD25^{+}CD4^{+}$ clasificados convencionalmente, que es particularmente apreciable en los pacientes que padecen afecciones inmunoinflamatorias, se redujo mediante la identificación de los linfocitos $CD127^{hi}CD4^{+}CD25^{+}$ contaminantes, particularmente en pacientes con colitis ulcerosa. El uso de la estrategia de clasificación y de tinción de CD4 / CD25 / CD45RA / CD127 para la comparación entre los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino y los controles normales demostró que no sólo había un mayor número de linfocitos identificados como Treg, sino que los pacientes mostraban coherentemente una disminución en el subconjunto de los Treg $CD45RA^{+}$. Esta disminución era particularmente evidente en los pacientes de entre 15 y 30 años de edad, lo que se corresponde con el pico de edad de aparición de la enfermedad inflamatoria del intestino. El uso de la estrategia de tinción del CD127 de la superficie celular eliminó mucha de la variabilidad interpaciente que previamente había resultado de la contaminación de la selección de CD25 por linfocitos activados, y permitió una estimación precisa de las cifras reales linfocitos T reguladores directamente *ex vivo*.

Además, los inventores han comparado el número y la función de los Treg entre muestras de sangre de cordón umbilical, de sangre periférica de adultos jóvenes y de ancianos, y demostraron, mediante el uso de la tinción del CD127, que la actividad funcional de los Treg permanece inalterada durante el cambio desde la expresión de CD45RA a la expresión del fenotipo $CD45RO^{+}RA^{-}$.

Los inventores también han demostrado un apoyo experimental adicional para el uso del CD127 en la identificación de los Treg mediante el uso de otros diversos modelos patológicos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, el eccema atópico grave, el asma, el síndrome de Sjogren, el VIH y el melanoma, demostrando así el uso del CD127 en el diagnóstico de un amplio abanico de estados patológicos.

Importantemente, los inventores también han medido el número de Treg en circulación en pacientes trasplantados renales frente a aquellos con insuficiencia renal crónica, con o sin diálisis, basándose en la identificación de los Treg mediante el uso del CD127, demostrándose adicionalmente el uso del CD127 en la monitorización del grado de respuesta a la terapia.

En particular, los inventores han aplicado la estrategia de selección de CD4 / CD25 / CD45RA / CD127 a leucocitos de sangre periférica de 18 pacientes con síndrome de Sjogren primario y 17 controles emparejados por edades y sexo, y han demostrado un aumento en las cifras de los Treg tanto sin exposición previa como totales en el grupo con síndrome de Sjogren primario, independientemente de la edad. En 9 pacientes con asma que dieron positivo en la prueba intraepidérmica y que secretaron interleucina 5 en respuesta a la estimulación con antígeno de ácaros del polvo domésticos *in vitro*, el porcentaje de Tregs sin exposición previa había aumentado significativamente. El uso de la estrategia de selección de CD4 / CD25 // CD127 en 6 pacientes con eccema atópico grave y 7 controles indicó un aumento de 2,5 veces en los linfocitos Treg totales. El síndrome de Sjogren primario, el eccema atópico y el asma implican, todos, una producción anormal de anticuerpos frente a sustancias específicas. Por lo tanto, las enfermedades inmunopatológicas relacionadas con la producción de anticuerpos pueden estar asociadas por lo tanto con unas cifras anormalmente altas de linfocitos Treg, particularmente de linfocitos Treg sin exposición previa.

Adicionalmente, los inventores han aplicado la estrategia de clasificación de CD4 / CD25 / CD45RO / CD127 a leucocitos de sangre periférica de pacientes infectados por el VIH. Se examinaron cuatro grupos de pacientes - aquellos con una infección primaria (seroconvertidores) y aquellos con una enfermedad crónica, subdivididos en grupos que no reciben tratamiento, en tratamiento con agentes antirretrovíricos, y aquellos tratados con agentes antirretrovíricos que desarrollaron una enfermedad de reconstitución inmunitaria (IRD). El número de Treg CD45RO⁺ estaba aumentado en los pacientes con enfermedad de reconstitución inmunitaria, y esto puede estar relacionado con la patología de la enfermedad. Además, los Tregs sin exposición previa estaban sobrerrepresentados en los pacientes con una enfermedad primaria aguda. Por lo tanto, el método puede usarse para definir anomalías en las cifras de los Treg en enfermedades infecciosas.

En los receptores de trasplantes renales que están bajo una terapia inmunosupresora, la estrategia de selección de CD4 / CD25 / CD45RA / CD127 demostró que el número de Treg CD45RA⁺ había disminuido significativamente, mientras que el número de CD45RA⁺ no lo había hecho. Por lo tanto, el método puede usarse para monitorizar las cifras de Treg en pacientes que reciben un trasplante y una terapia inmunosupresora.

En los pacientes con melanoma se aplicó la estrategia de clasificación de CD4 / CD25 / CD127 para el seguimiento de las cifras de Treg a lo largo del transcurso de los ensayos de vacunación.

También se usó la misma combinación de anticuerpos para la cuantificación de los Tregs en primates no humanos, tales como macacos, demostrando así la aplicabilidad de los métodos divulgados en el presente documento no sólo a seres humanos, sino también a otros primates.

Los métodos de la invención pueden usarse para diagnosticar en un sujeto la superproducción o la subproducción de linfocitos T reguladores, en los que la cantidad de linfocitos de una muestra biológica que expresan CD127^{low}CD4⁺CD25⁺ es indicativa de la superproducción o de la subproducción de linfocitos T reguladores en el sujeto.

Los métodos de la invención pueden usarse para diagnosticar a un sujeto una enfermedad autoinmunitaria, inmunoinflamatoria o alérgica, o una enfermedad que está relacionada con un cambio en la cantidad de los linfocitos T reguladores, o que tenga una predisposición a las mismas, comprendiendo los métodos el análisis de una muestra biológica procedente del sujeto para determinar la cantidad de linfocitos de una muestra biológica que expresan CD127^{low}CD4⁺CD25⁺, en los que una baja cantidad de linfocitos CD127^{low}CD4⁺CD25⁺ en la muestra es indicativa de una enfermedad autoinmunitaria, inmunoinflamatoria o alérgica, o de una enfermedad que está relacionada con un cambio en la cantidad de linfocitos T reguladores, o una predisposición a las mismas.

Los métodos de la invención pueden usarse para la monitorización de la cantidad de linfocitos T reguladores en un sujeto durante el transcurso de una patología, de una infección o de una terapia, comprendiendo el método la obtención de una muestra biológica a partir de dicho sujeto y el análisis de los linfocitos de la muestra para determinar el nivel de expresión celular de CD127, de CD4 y de CD25, en los que la cantidad de linfocitos CD127^{low}CD4⁺CD25⁺ en la muestra es indicativa de la cantidad de linfocitos T reguladores en la muestra,

Los métodos de la invención pueden usarse para la predicción de una respuesta a la terapia para una patología o una infección en un sujeto basada en la cantidad de linfocitos T reguladores en el sujeto, comprendiendo el método la obtención de una muestra biológica a partir de dicho sujeto y el análisis de los linfocitos de la muestra para determinar el nivel de expresión celular de CD127, de CD4 y de CD25, en los que la cantidad de linfocitos CD127^{low}CD4⁺CD25⁺ en la muestra es indicativa de la cantidad de linfocitos T reguladores en la muestra,

También se divulgan kits para la identificación de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, que comprende un(os) agente(s) para el análisis de al menos una célula en una muestra biológica para determinar el nivel de expresión celular de al menos el CD127. Los kits pueden comprender agentes adicionales para confirmar adicionalmente la identidad de los linfocitos T reguladores, por ejemplo, mediante el ensayo del nivel de expresión celular de otras proteínas o polinucleótidos celulares, tales como CD45RA, CD45RO, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95. Los kits también pueden ser modificados para dar cuenta de la naturaleza precisa de la muestra biológica que se está ensayando. Por ejemplo, la muestra biológica puede comprender una población de linfocitos T que

puede haber sido ensayada previamente o no para comprobar la expresión de CD4 y/o de CD25.

Los kits pueden usarse para el aislamiento de los linfocitos T reguladores. Los linfocitos T reguladores aislados pueden usarse para diversos fines, que incluyen, pero no se limitan a, un cultivo celular para la amplificación de la cantidad de linfocitos T reguladores para una transferencia de linfocitos T adoptivos o una transferencia de linfocitos T autólogos, que pueden implicar o no la selección de subconjuntos de linfocitos T en particular procedentes del cultivo celular amplificado o preamplificado. Los linfocitos T reguladores aislados también pueden ser almacenados para la terapia de un sujeto en una fecha posterior.

Los kits pueden usarse para el diagnóstico o la monitorización de enfermedades autoinmunitarias, de enfermedades inmunoinflamatorias, de enfermedades alérgicas, de predisposiciones a las mismas, de enfermedades infecciosas, del cáncer, del tratamiento oncológico y/o del trasplante de órganos.

Los kits pueden usarse para predecir las respuestas a la terapia de enfermedades autoinmunitarias, de enfermedades inmunoinflamatorias, de enfermedades alérgicas, de predisposiciones a las mismas, de enfermedades infecciosas, del cáncer y/o del trasplante de órganos.

También se divulgan kits para su uso en el diagnóstico de la superproducción o de la subproducción de linfocitos T reguladores, de una enfermedad autoinmunitaria, inmunoinflamatoria o alérgica, de una enfermedad está relacionada con un cambio en la cantidad de linfocitos T reguladores o una predisposición a una enfermedad autoinmunitaria, inmunoinflamatoria o alérgica, o de una enfermedad que está relacionada con un cambio en la cantidad de linfocitos T reguladores, comprendiendo el kit uno o más agentes para efectuar el análisis de la expresión de al menos el CD127 en al menos una célula de una muestra biológica.

También se divulgan kits para su uso en la monitorización de la cantidad de linfocitos T reguladores en un sujeto durante el transcurso de una patología, de una infección o de una terapia, en el que dicho kit comprende al menos un agente para el análisis del nivel de expresión celular de al menos el CD127.

También se divulgan kits para su uso en la predicción de la respuesta a la terapia para una patología o una infección en un sujeto basada en la cantidad de linfocitos T reguladores en el sujeto, en el que dicho kit comprende al menos un agente para el análisis del nivel de expresión celular de al menos el CD127.

Los métodos de la invención pueden usarse para el aislamiento de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, comprendiendo el método el análisis de al menos una célula de una muestra biológica para determinar el nivel de expresión celular de CD127, de CD4 y de CD25, en los que la expresión $CD127^{low}CD4^{+}CD25^{+}$ es indicativa de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, y el aislamiento de dicha al menos una célula, en los que dicha al menos una célula es $CD127^{low}CD4^{+}CD25^{+}$.

La etapa de análisis puede comprender adicionalmente la determinación del nivel de expresión celular de al menos un polipéptido o un polinucleótido celular adicional. El al menos un polipéptido o polinucleótido celular adicional puede estar asociado a la superficie de la célula, o ser intracelular. El al menos un polipéptido o polinucleótido celular adicional puede comprender CD45RA, CD45RO, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95.

Las personas expertas en la materia reconocerán que los linfocitos T reguladores aislados pueden usarse para una diversidad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, manipulaciones *in vitro* tales como la expansión de las cifras de los Treg, transfección y/o transformación. Otras aplicaciones de los Treg aislados pueden incluir la infusión de los Treg en sujetos para la terapia de enfermedades que implican una subexpresión o una expresión aberrante de los Treg endógenos. Por lo tanto será evidente que los Treg aislados pueden usarse para una transferencia de Treg autólogos y/o una transferencia de Treg adoptivos como parte de dichas terapias.

Adicionalmente, las personas expertas en la materia reconocerán que los Treg aislados también pueden usarse para la definición de los transcriptomas de los Treg, el análisis del ARNm o en la preparación de anticuerpos para la identificación y/o la inhibición funcional de los Treg.

Los métodos de la invención pueden usarse para el aislamiento de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, comprendiendo el método el análisis de al menos una célula de una muestra biológica para la determinación del nivel de expresión celular de CD127, en los que la al menos una célula de la muestra ha sido ensayada previamente para comprobar la expresión de CD4 y/o de CD25, y se ha encontrado que es $CD4^{+}$ y/o $CD25^{+}$, y en los que la expresión $CD127^{low}CD4^{+}CD25^{+}$ es indicativa de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, y el aislamiento de dicha al menos una célula, en los que dicha al menos una célula es $CD127^{low}CD4^{+}CD25^{+}$. Cuando la al menos una célula ha sido ensayada previamente para comprobar la expresión de CD4, la etapa de análisis comprende adicionalmente la determinación del nivel de expresión celular de CD25. Cuando la al menos una célula ha sido ensayada previamente para comprobar la expresión de CD25, la etapa de análisis comprende adicionalmente la determinación del nivel de expresión celular de CD4.

La etapa de análisis puede comprender adicionalmente la determinación del nivel de expresión celular de al menos un polipéptido o polinucleótido celular adicional. El al menos un polipéptido o polinucleótido celular adicional puede estar asociado a la superficie de la célula, o ser intracelular. El al menos un polipéptido o polinucleótido celular adicional puede comprender CD45RA, CD45RO, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95.

También se divulga al menos un linfocito T regulador cuando es aislado mediante los métodos divulgados en el presente documento.

También se divulgan métodos para la terapia con linfocitos T reguladores mediante el uso de al menos un linfocito T regulador cuando es aislado mediante los métodos divulgados en el presente documento.

Los expertos en la materia apreciarán que los linfocitos T reguladores pueden ser identificados, cuantificados y/o aislados en una diversidad de líneas celulares o de fluidos o de tejidos corporales, que incluyen, pero no se limitan a, la sangre, la linfa o el timo.

Algunas formas de realización en particular de la invención proporcionan el uso de uno o más anticuerpos creados contra CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 tanto libres como en asociación con otras moléculas, para la detección de la expresión de CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 y la determinación de los niveles de los Treg. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden crearse mediante el uso de CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 o de un fragmento o una porción antigénica de los mismos como antígeno. La unión del anticuerpo puede ser detectada en virtud de un marcador detectable en el anticuerpo primario CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95. Alternativamente, el anticuerpo anti-CD127, -CD4, -CD25, -Foxp3, -CTLA-4 y/o -CD95 puede ser detectado en virtud de su unión con un anticuerpo secundario o un reactivo que está apropiadamente marcado para permitir la detección. En la materia se conocen diversos métodos para la detección de la unión en un inmunoensayo, y están en el ámbito de la presente invención. Por ejemplo, las determinaciones de los niveles de CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 pueden llevarse a cabo mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la materia que incluyen, por ejemplo, ensayos de inmuoadsorción enzimática (ELISA); inmunoensayos en sándwich, ensayos inmunoradiométricos (IRMA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunolectroforesis, inmunoensayos *in situ*, ensayos de inmunodifusión, ensayos de inmunofluorescencia, inmunotransferencias Western, ensayos de unión del ligando, y similares. Alternativamente, la determinación de los niveles de CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 puede llevarse a cabo mediante el uso de anticuerpos anti-CD127, -CD4, -CD25, -Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 como se ha descrito anteriormente mediante una citometría de flujo, que puede implicar o no una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Los anticuerpos adecuados para su uso en los métodos de la presente invención pueden ser creados contra el CD127 mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Algunos anticuerpos adecuados incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena única, fragmentos Fab y una biblioteca de expresión de Fab.

Los anticuerpos adecuados pueden ser preparados a partir de regiones individuales o de fragmentos de un polipéptido CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95. Un polipéptido antigénico CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 contiene al menos aproximadamente 5, y normalmente al menos aproximadamente 10, aminoácidos.

Los métodos para la generación de los anticuerpos adecuados serán fácilmente apreciados por los expertos en la materia. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD127, -CD4, -CD25, -Foxp3, -CTLA-4 y/o -CD95, que normalmente contiene porciones Fab, puede ser preparado mediante el uso de la tecnología de hibridoma descrita en *Antibodies - A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1988). En esencia, en la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra HbA1, un fragmento o un análogo del mismo, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas del anticuerpo por parte de líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen la técnica del hibridoma, desarrollada originalmente por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 - 497 (1975), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos [Kozbor et al., *Immunology Today*, 4: 72 (1983)] y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, páginas 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., (1985)]. Las líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos pueden crearse mediante técnicas distintas a la fusión, tales como una transformación directa de los linfocitos B con ADN oncogénico, o una transfección con el virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980).

Un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención puede producirse iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta las moléculas del anticuerpo con la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene en unas condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para que el hibridoma secreta las moléculas de anticuerpo en el medio. Después se recoge el medio que contiene el anticuerpo. Las moléculas del anticuerpo pueden ser adicionalmente aisladas mediante técnicas bien conocidas.

De forma análoga, existen diversos procedimientos conocidos en la materia que pueden usarse para la producción de anticuerpos policlonales o de fragmentos o análogos de los mismos. Para la producción de anticuerpos policlonales pueden inmunizarse varios hospedadores animales mediante la inyección con un polipéptido CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95, o de un fragmento o un análogo del mismo, que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. Además, un polipéptido CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 o un fragmento o un análogo del mismo puede conjugarse con un portador inmunógeno, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLM). También pueden usarse varios coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, que incluyen, pero no se limitan a, de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

El cribado del anticuerpo deseado también puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Los ensayos de unión inmuno-específica de los anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo sándwich, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ*, inmunotransferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de la proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, y similares (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Adicionalmente o como alternativa, las determinaciones de los niveles de CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 pueden llevarse a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo una PCR cuantitativa en tiempo real, en la que los cebadores específicos para los polinucleótidos que codifican los CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 pueden ser fácilmente diseñados por una persona experta en la materia para su uso en dichas PCR.

Normalmente, de acuerdo con los métodos de la invención, el análisis de la expresión del polinucleótido se lleva a cabo a través de una amplificación mediante una PCR. Los productos amplificados pueden ser analizados adicionalmente mediante la secuenciación de los ácidos nucleicos. La amplificación mediante PCR puede llevarse a cabo sobre los polinucleótidos extraídos de las células, o como alternativa, pueden amplificarse directamente las secuencias sin la necesidad de etapas de purificación previas del polinucleótido.

Los métodos y los reactivos para su uso en las reacciones de amplificación de PCR, la posterior resolución del fragmento y la secuenciación del ácido nucleico, son bien conocidos por los expertos en la materia. En cada caso, los protocolos y los reactivos adecuados dependerán ampliamente de las circunstancias individuales. Puede obtenerse una guía en diversas fuentes, tales como, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, y en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. y Wiley-Intersciences, 1992. Una persona experta en la materia apreciará fácilmente que los diversos parámetros de estos procedimientos pueden ser alterados sin que ello afecte a la capacidad para conseguir el producto deseado. Por ejemplo, en el caso de la amplificación mediante una PCR, la concentración salina puede modificarse, o puede modificarse el tiempo y/o la temperatura de una o más de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión. De forma análoga, la cantidad de polinucleótido usado como molde también puede variarse dependiendo de la cantidad de polinucleótido disponible o de la cantidad óptima de molde necesaria para una amplificación eficaz.

Los oligonucleótidos para su uso en los métodos y en los kits de la presente invención son normalmente oligonucleótidos con una longitud de, generalmente, entre 15 y 30 bases. Dichos oligonucleótidos pueden ser preparados mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, una síntesis química directa o la clonación y restricción de las secuencias apropiadas. No todas las bases del oligonucleótido necesitan reflejar la secuencia de la molécula de molde con la cual hibridará el oligonucleótido, sólo es necesario que el oligonucleótido contenga las suficientes bases complementarias como para permitir que el oligonucleótido hibride con el molde. Un oligonucleótido también puede incluir bases desapareadas en una o más posiciones, que son bases que no son complementarias de las bases del molde, sino que más bien están diseñadas para incorporar cambios en el polinucleótido tras la extensión de bases o la amplificación. Un oligonucleótido puede incluir bases adicionales, por ejemplo, en forma de una secuencia reconocimiento de una enzima de restricción en el extremo 5', para facilitar la clonación del polinucleótido amplificado.

Los métodos de la invención usados para la determinación de los niveles de los Treg pueden incluir la etapa de la comparación del nivel de los Treg en una muestra obtenida a partir del sujeto de interés, por ejemplo, de un individuo sospechoso de padecer, o que presenta una predisposición a, una enfermedad autoinmunitaria, inmunoinflamatoria o alérgica, o a una enfermedad que está relacionada con un cambio en la cantidad de los Treg, con el nivel de los Treg con respecto a una o más muestras de control. Normalmente, la muestra de control puede ser una muestra de un sujeto con unos niveles normales de Treg.

También se divulgan kits para la determinación del nivel de los Treg, en los que los kits facilitan el empleo de los métodos de la invención. Normalmente, los kits para llevar a cabo un método de la invención contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el método. Por ejemplo, en una forma de realización, el kit puede comprender un primer recipiente que contiene un anticuerpo creado contra CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 y un segundo recipiente que contiene un conjugado que comprende un compañero de unión del anticuerpo, junto con un marcador detectable.

Normalmente, los kits descritos anteriormente también contendrán uno o más recipientes que contienen, por ejemplo, reactivos de lavado y/u otros reactivos capaces de detectar cuantitativamente la presencia de los anticuerpos unidos. Preferiblemente, los reactivos de detección incluyen anticuerpos marcados (secundarios) o, cuando el propio anticuerpo creado contra CD127, CD4, CD25, Foxp3, CTLA-4 y/o CD95 está marcado, los compartimentos comprenden los reactivos de unión al anticuerpo capaces de reaccionar con el anticuerpo marcado.

En el contexto de la presente divulgación, un kit compartimentalizado incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes individuales, y puede incluir pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o de papel. Dichos recipientes pueden permitir la eficaz transferencia de los reactivos desde un compartimento a otro compartimento, evitando la contaminación cruzada de las muestras y de los reactivos, y la adición de agentes o de soluciones de cada recipiente desde un compartimento a otro de una forma cuantitativa. Dichos kits también pueden incluir un recipiente que aceptará la muestra de prueba, un recipiente que contiene el (los) anticuerpo(s) usado(s) en el ensayo, recipientes que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, y similares), y recipientes que contienen el reactivo de detección.

Normalmente, un kit también incluirá instrucciones para el uso de los componentes del kit para llevar a cabo los métodos apropiados.

Los métodos y los kits divulgados en el presente documento son igualmente aplicables a cualquier animal, incluyendo seres humanos y otros animales y, por ejemplo, incluyendo especies de primates no humanos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, leporinos, aves, felinos y caninos. Consecuentemente, para su aplicación en las diferentes especies, puede ser aplicable un único kit de la invención, o como alternativa, pueden ser necesarios diferentes kits, por ejemplo, que contienen reactivos específicos para cada especie individual.

Los métodos y los kits divulgados en el presente documento hallan aplicación en cualquier circunstancia en la que sea deseable la determinación de los niveles de los Treg. La invención también halla aplicación en el diagnóstico de la subexpresión o de la sobreexpresión de los Treg, o de predisposiciones a las mismas, tales como enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con una inmunodeficiencia, enfermedades causadas por unas respuestas inmunitarias inapropiadas frente a los antígenos medioambientales, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria con una implicación inmunitaria, enfermedades infecciosas en las que la propia respuesta inmunitaria provoca la enfermedad, enfermedades por trasplante, cáncer e infecciones víricas.

De forma análoga, los métodos y los kits divulgados en el presente documento también pueden aplicarse en el ensayo y el cribado en animales, incluyendo, pero no se limitan a, primates y otras especies contempladas en el presente documento.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente con más detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplos

Métodos generales

Muestras

La sangre periférica se obtuvo partir de donantes adultos sanos y de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (Centenary Institute y the Royal Prince Alfred Hospital, Camperdown, NSW, Australia). Las capas leucocitarias se obtuvieron en el Australian Red Cross Blood Service (Sydney, NSW, Australia). Las muestras sanguíneas de cordón umbilical del Nepean Hospital, Penrith, NSW, Australia, se obtuvieron a partir de las venas del cordón umbilical inmediatamente después de la expulsión de la placenta. Los neonatos eran a término y no presentaban anomalías hematológicas ni complicaciones infecciosas. Las muestras de timo normal eran de niños con unas edades de entre 1 y 7 meses que habían experimentado una cirugía cardíaca correctora en el Children's Hospital, Westmead, NSW, Australia. El estudio se llevó a cabo con la aprobación del Central and Western Sydney Area Health Services y del Royal Alexandra Hospital for Children Ethics Committee.

Todas las demás muestras de sangre periférica humana se obtuvieron con el total consentimiento del paciente y la aprobación de los apropiados comités éticos. El estudio con macacos se llevó a cabo con la aprobación del University of Melbourne y del CSIRO Livestock Industries Animal Experimentation and Ethics Committees.

Aislamiento de los linfocitos T CD4 a partir de las muestras

Los linfocitos mononucleares de sangre periférica, de la capa leucocitaria y del cordón umbilical se prepararon mediante una centrifugación en gradientes de Ficoll-Paque (Lymphoprep, Nycoprep, Oslo, Noruega).

Se diseccionaron las muestras de operaciones recientes de timo mediante una separación a través de una malla de acero inoxidable de calibre 80 y dispersando los grumos mediante un suave pipeteo. Se identificaron los nódulos linfáticos en muestras de operaciones de intestino, se diseccionaron de la pared del intestino y se disociaron mediante una separación en una malla de acero inoxidable de calibre 80 y dispersando los grumos mediante un suave pipeteo. Todas las suspensiones de células individuales se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido y se tiñeron por lotes para el análisis mediante citometría de flujo.

Anticuerpos y citometría de flujo

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-GD4, anti-GD26 y anti-GD46RG (clones OKT4, 7GB6 y UCHL1-1 respectivamente) se marcaron con Alexa488 (Molecular Probes, Oregón, USA) y RTC (Sigma) mediante los protocolos habituales. En este estudio se usaron los siguientes mAbs de ratón con especificidad por las moléculas humanas: conjugados de biotina-, Alexa488-, RTC-, PE-, PerGp o PEGy5- anti-GD3, -GD4, -GD5, -GD8, -GD38, -CD40L, -GD44, -GD45RA, -GD45RG, -GD54, -GD56, -GD57, -GD58, -GD62L, -GD69, -CD71, -GD74, -GD84, -GD95, -GD95L, -GD103, -CD122, -GD134, -GD152, -HLA-DR, GXGR4, GXGR5 (PharMingen, San Diego, GA), -GD21, -GD23, -GD25, -G1TR (BD Biosciences, San José, GA), -GD27 (Ansell, Bayport, MN), -GD28, -GD30 (Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Alemania), -GD70, -GD127, -GD244 (Immunotech, Marseille, Francia), -GD148, -GD150 (DNAX Research Institute, Palo Alto, GA), GD11a (Galtag, Burlingame, GA) y Fox P3 (eBioscience o Biolegend). Los conjugados de biotina se desarrollaron con estreptavidina conjugada con Alexa594 (Molecular Probes) o PerGp (PharMingen). Los mAbs anti-ratón conjugados con PE y FITG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) usados detectaron el anti-GGR7 no conjugado (PharMingen).

Las suspensiones de células individuales se lavaron con PBS que contenía un 5 % de FGS y azida de sodio 5 mM (lavado FACS). Se tiñeron alícuotas de 5×10^5 células en placas de microtitulación de PVG de fondo redondo de 96 pocillos (IGN, Costa Mesa, GA) en lavado FACS. Las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 1 % si fue necesario. La tinción intracelular se llevó a cabo después de la fijación en paraformaldehído al 2 %, seguido de una permeabilización y una tinción en tampón que contiene un 0,1 % de saponina. La tinción para FoxP3 se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recogió un total de 1×10^5 eventos, clasificados para los linfocitos sobre la base de los perfiles de dispersión hacia delante y lateral, mediante el uso de un FACSGalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, GA) o de un FACSVantage™ (BD Biosciences). El análisis se llevó a cabo mediante el uso del programa FlowJo (Treestar, San Carlos, GA).

Clasificación celular activada por fluorescencia

Los linfocitos mononucleares de la capa leucocitaria (5×10^8) se tiñeron con una combinación de anticuerpos monoclonales GD4-FITG, GD25-APG, GD127-PE y GD45RA-biotina desarrollados con estreptavidina-Alexa594 o con estreptavidina-PerGP. La clasificación positiva con microesferas anti-FITG (Miltenyi Biotec GmbH) se llevó a cabo mediante el uso de un AutoMacs™ (Miltenyi Biotec) antes de la clasificación. Los timocitos (5×10^8) se tiñeron con una combinación de los mAbs GD4-PE-Gy5.5, GD3-PE, GD8-APG GD25-Alexa488 y GD45RA-biotina. La clasificación se llevó a cabo mediante el uso de un clasificador celular FACSVantage™ o FACSria™.

qPCR en tiempo real

Se extrajo el ARN total a partir de entre 1 y 5×10^5 células seleccionadas después de un lisado con Trizol (Invitrogen, Life Technologies) para la extracción del ARN. Toda la muestra se sometió a transcripción inversa con la transcriptasa inversa Superscript II y el cebador oligo(dT)₂₋₁₈ (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. Para la PCR cuantitativa en tiempo real (RT qPCR), la mezcla de reacción (18 µl) contenía 2 µl de ADNc, 10 µl de Platinum SYBR Green SuperMix UDG (Invitrogen) y 0,25 pmoles de cebador directo e inverso. La qPCR se llevó a cabo con un sistema Rotor-Gene 3000 (Corbett research). Los cebadores se diseñaron de forma que los amplicones abarcaran las proximidades del intrón / exón para minimizar la amplificación del ADN. Las secuencias de los cebadores eran las siguientes: Foxp3 sentido, GGGAAATGGTGTGTGGAAGTG (SEQ ID NO: 1) y antisentido, GGATGATGGGAGAGATGAAGG (SEQ ID NO: 2). Las secuencias de los cebadores para otros genes eran: GATA3 sentido AAGTGTGAGAGGAGGAGAAGGAGAG (SEQ ID NO: 3); GATA3 antisentido GGATGGGTTGGTTGTTGATAGTGAGG (SEQ ID NO: 4); T-bet sentido GAGTAGAGGATGTTTGT- GGAGGTG (SEQ ID NO: 5); T-bet antisentido GGGGTTGTTGTTTGTGAGGTTTAG (SEQ ID NO: 6). Los cebadores fueron suministrados por Invitrogen. Para la β-actina, los cebadores eran los siguientes: sentido TGGAGAAGGGGTGGGGGATGTGGAAG (SEQ ID NO: 7) y antisentido AGGGAGAGGGAGGTGATTGTAGAAG (SEQ ID NO: 8) (Sigma Genosys, Australia).

La RT-qPCR para Foxp3, T-bet y GATA-3 se llevó a cabo en las siguientes condiciones: fase 1: a 94 °C durante 5 min; fase 2: a 94° durante 20 s, a 58 °C durante 20 s y a 72 °C durante 20 s. Se añadió una etapa adicional a 75 °C

durante 15 s para reducir el fondo de dímero de cebador. Se realizaron 45 ciclos de amplificación. La expresión relativa de Foxp3, de T-bet y de GATA-3 fue determinada mediante una normalización con respecto a la β -actina.

Ensayos de supresión *in vitro*

Los ensayos de supresión *in vitro* se llevaron a cabo en placas de fondo redondo de 96 pocillos en un medio que consiste en RPMI 1640 complementado con un 5 % de FCS inactivado por calor, L-Glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Todos los pocillos contenían 5×10^4 APC, 2×10^4 células respondedoras (células clasificadas como $GD4^+GD25-GD45RA^+$ o $GD4^+GD25^-$) y 0,25 μ g/ml de anti-GD3 (UCHT-1 o Hit3a, PharMingen). El número de supuestas células supresoras añadidas a cada pocillo era de 2×10^4 , de $0,5 \times 10^4$, de 2×10^3 o nulo, proporcionando unas proporciones finales entre supresoras y respondedoras de 1:1, de 0,25:1, 0,1:1 o de 0:1 respectivamente. En los cultivos de control se añadieron respondedoras en lugar de supresoras. Para los ensayos de CFSE, las respondedoras se marcaron con CFSE y se determinó la división celular después de 72 horas mediante el uso de una citometría de flujo. El porcentaje de proliferación se calculó con respecto al número medio de células divididas en los pocillos de control que contienen únicamente células respondedoras. Para los ensayos de timidina, los experimentos preliminares en los que los cultivos fueron tratados con pulsos después de 3, 4 o 5 días de cultivo indicaron que el grado de supresión era estable durante ese periodo, por lo que todos los cultivos posteriores fueron tratados con pulsos de 3H TdR a las 72 horas y recogidos 16 horas después, para permitir una comparación directa entre CFSE y los ensayos de timidina.

Las citocinas (IFN- γ , IE-4, IE-5, IL-10) se midieron mediante el uso de kits OptEIA (BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos transpocillo se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos según se ha descrito previamente (15).

Ejemplo 1: expresión del CD25 por parte de los linfocitos T $CD4^+$ humanos y de ratón y estrategias alternativas para su identificación y aislamiento

Las Figs. 1 A y B ilustran la diferencia en la expresión del CD25 por parte de los linfocitos T $CD4^+$ de ratón y humanos. En la sangre periférica murina es claramente distinguible una población distinta de un 6 % de linfocitos que expresan el CD25 con respecto a la población negativa (Fig. 1 A). Se observa un perfil de expresión similar por parte de un 10 % de los linfocitos T $CD4^+$ en la sangre de cordón umbilical humano. Sin embargo, el perfil de los linfocitos T $CD4^+$ de sangre de humano adulto es bastante diferente, distinguiéndose únicamente un 1 - 2 % de células que expresan unos mayores niveles de CD25 como una subpoblación individual, mientras que el nivel de expresión del otro 98 % de las células varía desde el intermedio hasta el verdaderamente negativo. El establecimiento de una ventana de adquisición al nivel de indicado por el perfil de la sangre de cordón umbilical (línea punteada, Fig. 1 B) corta transversalmente a la mayoría de la población de linfocitos T $CD4^+$ en la sangre periférica de adulto. Se presenta un dilema de clasificación similar en los nódulos linfáticos humanos, pero no en los de ratón. El principal contribuyente a la diferencia entre especies a este nivel de expresión intermedio de una gran proporción de los linfocitos T $CD4^+$ de la sangre periférica humana, que se corresponde con linfocitos $CD4^+$ con exposición previa a un antígeno "convencionales". Incluso en los ratones, en los que una gran fracción de los linfocitos T $CD4^+$ está dividiéndose activamente (Fig. 1 A "estimulados", que ilustra una población en división homeostática que reconstituye los animales RAG $^{-/-}$), el nivel medio de expresión de CD25 en los linfocitos T activados convencionales no interfiere notablemente con la identificación de los Treg $CD25^+$. La significación fisiológica de la expresión de receptores de alta afinidad de la IL-2 en la mayoría de los linfocitos $CD4^+$ con exposición previa a un antígeno humanos "convencionales" sigue sin ser clara.

Un aspecto adicional del patrón de tinción mostrado en las Figs. 1 A y B es que una población distinta de linfocitos $CD25^{bright}$ en la sangre de humano adulto muestra una ligera disminución en la expresión de CD4. Esta disminución también es apreciable en la totalidad de la población de Treg $CD25^+$ en ratones. Desafortunadamente, la disminución no es lo suficientemente importante como para permitir su uso en una estrategia de clasificación para distinguir los Treg de los linfocitos T con exposición previa a un antígeno convencionales. Sin embargo, nuestros estudios con modelos de ratón han indicado que, al igual que la expresión constitutiva de CD25, la disminución en la expresión de CD4 representa un marcador fenotípico muy estable de los Treg. Por el contrario, los linfocitos T convencionales regulan por aumento la expresión de CD4 tras una activación *in vivo*.

Se llevó a cabo el ensayo de los 39 marcadores con objeto de determinar la capacidad de las subpoblaciones identificadas en los linfocitos $CD4^+$ que expresan el CD25 a unos niveles entre intermedios y altos ($CD25^{int-hi}$), como se identifica mediante la línea punteada de la Fig. 1). Para ensayar si los marcadores que son útiles en los ratones podrían distinguir de forma precisa los Treg en los seres humanos, se compararon los patrones de tinción de ratón y humano (Fig. 1C). Los datos indican que no es posible la predicción de los patrones humanos sobre la base de los datos de ratón. Se ensayaron marcadores humanos adicionales en sangre de adulto. La expresión de CD45RA identificó una población de Treg "sin exposición previa" que está presente en el timo, en la sangre del cordón umbilical, en la sangre de adulto, en los nódulos linfáticos y en el timo. Sin embargo, en la población de $CD45RA^-$ RO^+ , ninguno de los marcadores fue expresado diferencialmente por los Treg ni por los linfocitos con exposición previa a un antígeno (Fig. 1 D), aparte del CD127 (Fig. 2). Al contrario que con $CD45RO$, $CD58$ y $CD95$, el nivel de expresión de CD127 en los Treg era menor que con los linfocitos T sin exposición previa, mientras que la expresión

de los linfocitos con exposición previa a un antígeno era mayor. Por lo tanto, el perfil de los linfocitos CD127 con respecto a los CD25 se asemejaba al de los CD4 con respecto a los CD25, pero el intervalo de expresión de CD127 era mayor, permitiendo la separación de los Treg de la sangre de humano adulto mediante una clasificación por citometría de flujo. Particularmente interesante era el perfil de la sangre del cordón umbilical, en el que lo que pareció una población individual en la Fig. 1 estaba claramente separada en 2 poblaciones después de una tinción para la expresión de CD127.

Ejemplo 2: la expresión de CD127 distingue entre 2 poblaciones de linfocitos T CD25⁺CD4⁺ humanos

Se ensayó la capacidad de la expresión de CD127 para distinguir entre dos poblaciones de linfocitos T CD25⁺CD4⁺ en diversos tejidos linfoides mediante la tinción de muestras de sangre de adulto normal, de nódulo linfático, de sangre de cordón umbilical y de timo, con mAbs contra CD4, CD25 y CD127.

La sangre de adulto contenía una población de linfocitos CD25⁺CD127^{lo} distinta de la mayoría de la población de linfocitos CD127^{hi} (Fig. 2 a). Además de la población CD25⁺CD127^{lo}, los nódulos linfáticos también contenían un número significativo de linfocitos T CD25⁺CD127^{lo}, lo que destacaba en la sangre de una minoría de adultos normales (no mostrado). En la sangre del cordón umbilical, la tinción con anti-CD127 reveló que la población de CD25⁺ no era homogénea, como se ha reivindicado previamente (27), sino que más bien consistía en una mezcla de linfocitos CD25⁺CD127^{lo} y CD25⁺CD127^{hi}. En el timo, donde los linfocitos con exposición previa a un antígeno que expresan el CD25 están ausentes, los linfocitos con los mayores niveles de CD25 conservaban una expresión intermedia del CD127 (Fig. 2 a).

Ejemplo 3: correlación inversa entre la expresión de FoxP3 y de CD127 en los linfocitos T CD4⁺CD25⁺

Para medir la expresión de la proteína Foxp3 en la población de CD25⁺CD127^{lo}, se tiñeron conjuntamente los linfocitos de sangre de adulto y de cordón umbilical, de nódulo linfático y de timo, con los mAbs contra Foxp3 y CD127 (Fig. 2 b). En la sangre y en el nódulo linfático, la población de linfocitos FoxP3⁺ era CD127^{lo} y similar en tamaño a la de los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} de la Fig. 2 a. Por el contrario, la población de FoxP3⁺ del timo era considerablemente mayor que la población de CD25⁺CD127^{lo}. En la sangre periférica, el 87 % de los linfocitos CD4⁺CD127^{lo} (clasificados como en la Fig. 2 c, panel superior izquierdo) entraba en la ventana de adquisición de CD25⁺Foxp3⁺ (Fig. 2 c, panel inferior izquierdo), y por el contrario, el 84 % de los linfocitos CD25⁺Foxp3⁺ se detectaron en la ventana de adquisición de CD4⁺CD127^{lo} (Fig. 2 c, paneles derechos). Sin embargo, en los linfocitos T CD4⁺CD8⁺ del timo, el 45 % de los linfocitos Foxp3⁺ eran CD25⁺ (Fig. 2 d, panel inferior derecho), por lo que los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} comprendían una población significativamente menor que los linfocitos Foxp3⁺. No obstante, todos los linfocitos CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺ tímicos eran CD127^{lo}. Por lo tanto, la expresión de CD25, de CD127 y de FoxP3 difería entre el timo y la sangre periférica.

Ejemplo 4: correlación entre la expresión del fenotipo FoxP3 y CD127^{lo}

Para ensayar si un subconjunto de linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD25⁺ sin exposición previa con actividad reguladora también tenía un fenotipo FoxP3⁺CD127^{lo}, los inventores tiñeron linfocitos de sangre de adulto, de nódulo linfático y de cordón umbilical con mAbs contra CD3, CD4, CD45RA, CD25, CD127 y FoxP3 (Fig. 3 a). Los linfocitos CD3⁺CD4⁺ se separaron en los subconjuntos CD45RA⁻ y CD45RA⁺, y se calculó el porcentaje de linfocitos CD25⁺CD127^{lo} en la ventana de adquisición de Foxp3⁺. En todos los tejidos, más del 90 % de los linfocitos Foxp3⁺ totales eran CD25⁺CD127^{lo}, mientras el resto de los linfocitos eran CD25^{int}CD127^{hi}. Además, la proporción de linfocitos CD127^{hi} era similar en los subconjuntos CD45RA⁻ y CD45RA⁺Foxp3⁺.

Para determinar la fuerza de la correlación entre el porcentaje de linfocitos en las poblaciones CD25⁺CD127^{lo} y CD25⁺FoxP3⁺, se analizaron muestras de sangre periférica de 9 voluntarios sanos (Fig. 3 b). En ambos subconjuntos de CD45RA⁻ y CD45RA⁺, las cifras de linfocitos en las dos ventanas de adquisición eran muy similares, lo que indicaba que el número de linfocitos CD25⁺CD127^{lo} se correlaciona fuertemente con el número de linfocitos CD25⁺FoxP3⁺ en la sangre periférica.

Ejemplo 5: cifras de CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} en la sangre periférica de voluntarios sanos

Para definir los niveles normales de linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} circulantes, se examinaron muestras de sangre periférica de una cohorte de 43 voluntarios sanos (Fig. 4). El número medio (+/- EEM) de linfocitos CD45RA⁻CD25⁺CD127^{lo} en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ era de 4,29 +/- 0,24, mientras que el porcentaje de linfocitos CD45RA⁺CD25⁺CD127^{lo} era de 2,05 +/- 0,14, dando un total de 6,35 +/- 0,26 % de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 4 b). Esto era coherente con una figura de un 6,42 +/- 0,50 % de linfocitos T CD4⁺ en sangre murina, que previamente había sido observada por los inventores (Tan y Fazekas de St Groth, datos no publicados), y contrasta con la estimación convencional del 1 - 2 % en sangre periférica humana (19). Además, la proporción entre los Treg efectores / de memoria y los sin exposición previa (Fig. 4 a) era similar a la proporción de 2:1 entre los Treg efectores y los sin exposición previa que los inventores habían determinado previamente para los ratones (Higgins y Fazekas de St Groth, datos no publicados).

Los inventores demostraron por lo tanto, mediante el uso de una tinción de CD4 / CD25 / CD45RA, que el número de Treg sin exposición previa en la sangre periférica disminuye en función de la edad, lo que sugiere un efecto de involución tímica (Fig. 4 C). Esta disminución era únicamente parcialmente atribuible a la previamente descrita pérdida de linfocitos T CD45RA⁺ con la edad. Por el contrario, el porcentaje de Treg CD45RA⁺ era relativamente estable a lo largo de la vida, al igual que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ entre los leucocitos de la sangre periférica.

Ejemplo 6: medición del ARNm de los factores de transcripción en subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ clasificados sobre la base de la expresión de CD127 y de CD25

Los inventores midieron el nivel del ARNm de Foxp3 en subconjuntos clasificados de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica (Fig. 5 a). Los linfocitos CD25⁺CD45RA⁺CD127^{lo} (población 1) expresaban 100 veces más ARNm de Foxp3 que los linfocitos CD25⁺CD45RA⁺CD127^{hi} (población 4, Fig. 5 b). Había presentes unos niveles intermedios de ARNm de Foxp3 en los linfocitos CD25⁺CD45RA⁺CD127^{hi} (población 3) y en los linfocitos CD25⁺CD45RA⁺CD127^{lo} (población 2). Por otro lado, la población 2 expresaba los mayores niveles de ARNm para T-bet, un regulador maestro de la función efectora de Th1, mientras que GATA3 (un regulador maestro de la función de Th2) era igualmente expresado por todas las poblaciones (Fig. 5 c). Estos resultados indican que la población 2 contiene linfocitos CD127^{lo} efectores. En la fracción CD45RA⁺, los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} expresaban 100 veces más Foxp3 que los linfocitos CD25⁺CD127^{hi} sin exposición previa (Fig. 5 b).

En la sangre del cordón umbilical, los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} expresaban 500 más ARNm de Foxp3 que los correspondientes linfocitos CD4⁺CD25⁺ sin exposición previa (Fig. 5 b, panel derecho). La población CD25^{int}CD127^{hi} (población 8) de linfocitos T con exposición previa a un antígeno expresaba un nivel intermedio de Foxp3, según se demostró para que la correspondiente población adulta (población 3, Fig. 5 b).

Ejemplo 7: supresión *in vitro* por parte de subconjuntos clasificados sobre la base de la tinción del CD127

Se clasificaron los linfocitos T CD4⁺ de sangre adulta divididos en subconjuntos de CD45RA⁺ y CD45RA⁻ de acuerdo con las ventanas de adquisición mostradas en la Fig. 6 a (paneles izquierdos). Se usaron los linfocitos CD45RA⁺CD25⁻ autólogos clasificados (población 5) como células respondedoras en cultivos conjuntos, para medir la actividad supresora. Los ensayos mediante el uso de timidina (Fig. 6 b) o de CFSE (no mostrado) como indicador de la proliferación celular demostraron que únicamente los linfocitos T CD25⁺CD127^{lo} de cada subconjunto de CD45 (poblaciones 1 y 3, Fig. 6 b) mediaban en la supresión *in vitro*. Los Treg CD45RA⁺ eran tan potentes como sus homólogos CD45RA⁻. Para los ensayos con sangre de cordón umbilical, no se usó la expresión de la isoforma del CD45 para subdividir los linfocitos, ya que la gran mayoría de los linfocitos de la sangre del cordón umbilical expresan en cierto grado el CD45RA. Los subconjuntos CD25⁺CD127^{lo} y CD25⁺CD127^{hi} clasificados de acuerdo con las ventanas de adquisición de la Fig. 6 a (panel derecho) se cultivaron conjuntamente con los linfocitos respondedores autólogos CD4⁺CD25⁺CD127^{hi} (población 8). De nuevo, tanto los ensayos con timidina (Fig. 6 b) como con CFSE (no mostrado) indicaron que la actividad supresora de los linfocitos CD4⁺CD25⁺ estaba confinada en el subconjunto de CD127^{lo} (población 6, Fig. 6 b).

Algunos informes previos han indicado que los linfocitos CD25^{bright}, pero no los CD25^{int}, tienen una actividad supresora (19). Sin embargo, en estos estudios, la mayoría de los linfocitos de la ventana de adquisición CD25^{int} habían sido linfocitos T CD45RA⁺CD127^{hi} convencionales (población 2, Fig. 6 a, a), comprometiendo así la eficacia de la supresión en el ensayo. Para comparar la actividad supresora de los linfocitos CD45RA⁺CD127^{lo} que expresan diferentes niveles del CD25, los linfocitos T CD4⁺ de sangre adulta subdivididos en los subconjuntos CD45RA⁺ y CD45RA⁻ se clasificaron de acuerdo con las ventanas de adquisición ilustradas en la Fig. 6 c. Las tres poblaciones CD45RA⁺CD25⁺CD127^{lo} (poblaciones 9 - 11) manifestaron una actividad supresora (Fig. 6 d, panel inferior izquierdo), coherente con su elevado nivel de expresión de FoxP3 (Fig. 2). Además, las tres poblaciones suprimían la producción de IFN γ . Por parte de los linfocitos respondedores, y las poblaciones 10 y 11 secretaban una pequeña cantidad de IL-10. No se detecta ninguna secreción de IL-4 ni de IL-5 en ninguno de los cultivos (datos no mostrados). Interesantemente, los linfocitos CD45RA⁻CD25⁺CD127^{lo} (población 12) mostraron una cierta supresión de la proliferación y de la producción de IFN γ , y secretaban un nivel detectable de IL-10, aunque no expresaban la proteína FoxP3 (Figs. 2 y 3).

Para ensayar si era necesaria una interacción de la superficie celular entre los Treg y los linfocitos respondedores para la supresión por parte de los linfocitos CD25⁺CD127^{lo}, se realizaron cultivos transpocillo (Fig. 6 e). No se observó ninguna supresión cuando se impidió el contacto de célula a célula entre los linfocitos supresores y los respondedores, descartando el papel de los factores solubles tales como la IL-10 en la supresión por parte de los linfocitos CD25⁺CD127^{lo}. De hecho, en los cultivos transpocillo, la proliferación de los linfocitos respondedores había aumentado cuando se comparaba con los cultivos de control, que carecían de linfocitos supresores (Fig. 6 e).

Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la actividad supresora estaba restringida a los linfocitos CD25⁺CD127^{lo} en la sangre tanto de cordón umbilical como de adulto. Por el contrario, marcadores tales como HLA-DR, que divide a los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en dos poblaciones, distinguen los subconjuntos de Treg con diferentes espectros de actividad *in vitro* (28). Una pequeña proporción (menor del 10 %) de los linfocitos CD25⁺FoxP3⁺

conservaba una elevada expresión del CD127 (Fig. 3). La población de linfocitos CD25⁺CD127^{hi} como un todo no manifiesta una actividad supresora en los ensayos habituales *in vitro* (Fig. 6). Estos datos indican, por lo tanto, que la expresión de FoxP3 no siempre confiere una función supresora obligatoria a los linfocitos T humanos.

5 Ejemplo 8: comparación de las cifras de Treg entre pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino y sujetos de control

10 Habiendo demostrado que la estrategia de tinción de CD4 / CD25 / CD127 / CD45RA proporcionará una claridad adicional para distinguir los Treg de los linfocitos T activados, los inventores aplicaron el método a muestras de sangre periférica de una cohorte de 43 controles y 38 pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (Tabla 1).

Tabla 1: características del sujeto

Grupo de sujetos	Número			Edad	
	total	Mujeres	Varones	mediana	Intervalo
control	43	15	28	29	21 - 65
enfermedad de Crohn activa	12	6	6	32	17 - 65
enfermedad de Crohn inactiva	7	3	4	41	22 - 72
colitis ulcerosa activa	9	4	5	35	24 - 54
colitis ulcerosa inactiva	10	4	6	54,5	30 - 71

15 Los datos de la citometría de flujo fueron analizados mediante el uso de varias estrategias de clasificación, para destacar las ventajas del uso del método dependiente del CD127 (Fig. 7). Ambas estrategias "CD25^{bright}" convencional y "CD25^{int}" (ventanas de adquisición marcadas A y B, respectivamente en la Fig. 7 a) mostraron un intervalo de valores más amplio en los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino en comparación con los
20 controles, con un aumento estadísticamente significativo en los pacientes con enfermedad de Crohn. Los inventores habían usado previamente una estrategia basada en la expresión diferencial de las variantes de empalme de CD45, en la que la ventana de adquisición de CD45RO (ventana de adquisición C, Fig. 7 b) era similar a la ventana de adquisición de CD25^{bright}, mientras que la ventana de adquisición de CD45RA definía un nuevo subconjunto de Treg sin exposición previa (ventana de adquisición D, Fig. 7 b). La nueva estrategia de tinción de CD4 / CD25 / CD45RA / CD127 aquí descrita se aplicó según se indica en las ventanas de adquisición E y F (Fig. 7 c). Una vez más, los
25 pacientes con enfermedad de Crohn mostraron un aumento significativo en las cifras de los Treg CD45RA⁺. Se observaron unas disminuciones significativas en el porcentaje de Treg sin exposición previa tanto en los pacientes de enfermedad de Crohn como en los de colitis ulcerosa.

30 Para ilustrar las diferentes estimaciones de los porcentajes de Treg de las muestras individuales como resultado de la aplicación de las estrategias de clasificación de la Fig. 7, los inventores representaron gráficamente las correlaciones entre las diversas ventanas de adquisición para el grupo combinado de 81 pacientes y controles (Fig. 8). Las mejores correlaciones ($r > 0,85$) eran entre los datos derivados de la estrategia CD4 / CD25 / CD45RA (ventanas de adquisición C y D) y de las nuevas ventanas de adquisición E y F, respectivamente. Todas las
35 ventanas de adquisición excepto la ventana de adquisición B subestimaron el número de Treg CD127^{lo} debido a la exclusión de los Treg con la menor expresión del CD25, en un intento de reducir la contaminación por los linfocitos T convencionales. La ventana de adquisición B proporcionó una sobreestimación debido a una contaminación por los linfocitos T CD127^{hi}CD25⁺. Por lo tanto, los datos derivados de la nueva estrategia se correlacionan con los de las otras estrategias de clasificación, aunque los valores numéricos son significativamente diferentes.

40 Ejemplo 9: cambios relacionados con la edad en los Treg CD127^{lo}CD25⁺ en los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino

En contraste con los informes previos, que afirmaban que el número de Treg sin exposición previa en la sangre periférica disminuye en función del edad, los inventores han demostrado que los porcentajes de Treg sin exposición
45 previa eran esencialmente constantes para los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, por lo que el déficit en los Treg sin exposición previa en los pacientes jóvenes no era apreciable en los pacientes más mayores (Fig. 9 a). Parte del déficit en los pacientes jóvenes era debido a una disminución en el porcentaje de linfocitos CD4⁺CD45RA⁺ en los pacientes en comparación con los controles (Fig. 9 b), mientras que no había ninguna diferencia en los porcentajes de linfocitos CD4⁺ totales (Fig. 9 e).

50 En contraste con los Treg sin exposición previa, el número de Treg CD45RA⁺ (RO⁺) era estable a lo largo de la vida adulta tanto en los pacientes como en los controles (Fig. 9 c). Debido a que los Treg CD45RA⁺ comprenden la mayoría de los Treg totales, las cifras de los Treg totales también eran estables a lo largo de la vida. Se observó un aumento recíproco en los linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ en los pacientes en comparación con los controles (Fig. 9 d), lo que refleja un mayor grado de actividad inmunitaria global en los pacientes, y el porcentaje de los linfocitos T CD45RA⁺ aumentó con la edad tanto en los pacientes como los controles.

La Fig. 10 proporciona las comparaciones de los porcentajes de Treg en los controles, en los pacientes con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerosa divididos en cohortes de 3 edades, lo que indica que el déficit en los Treg sin exposición previa alcanzó una significación estadística en los pacientes con enfermedad de Crohn entre los 15 y los 45 años, y en los pacientes con colitis ulcerosa entre los 15 y los 30 años. En contraste, no había ninguna diferencia significativa en las cifras de los Treg activados y los totales entre los pacientes y los controles de cualquiera de estas tres cohortes.

Según se muestra en la Fig. 11, el déficit en los Treg sin exposición previa no estaba relacionado con la actividad patológica, y no se veía afectado por la terapia. Debido a que se correlacionaba con el pico de edad juvenil de la incidencia de enfermedad, puede representar una anomalía primaria que puede predisponer al desarrollo de la enfermedad.

Ejemplo 10: Treg CD127^{lo}CD25⁺ en la mucosa del intestino y en los nódulos linfáticos mesentéricos de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino y de controles

Además de estudiar la sangre, los inventores obtuvieron mucosa y nódulos linfáticos de muestras de colon recién extraídas de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino o de pacientes a los que se les había extirpado el colon por diverticulitis o incontinencia.

Según se muestra en la Fig. 12, no se observó ninguna diferencia significativa entre el porcentaje de Treg CD25⁺CD127^{lo} de los linfocitos T CD4⁺ en la mucosa del intestino y en los nódulos linfáticos de drenaje en los pacientes con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerosa. Los datos indican que el porcentaje de Treg en la mucosa y en los nódulos linfáticos es generalmente mayor que en la sangre periférica (según se ilustra en la Figura 4).

Ejemplo 11: comparación del número y la función de los Treg en la sangre de cordón umbilical y en la sangre periférica de adultos jóvenes y de ancianos.

Este estudio comparaba la tinción intracelular de FoxP3 frente a la combinación CD4 / CD25 / CD127 para evaluar los cambios en las cifras de los linfocitos T reguladores desde la infancia temprana hasta la vida adulta tardía. Los datos, según se muestra en las Figs. 13 - 17, indican que el conjunto de linfocitos Treg se mantiene en un estrecho intervalo lo largo de la vida, aunque la distribución entre los compartimentos CD45RA y CD45RO cambia notablemente. Este cambio es paralelo al de los linfocitos T convencionales.

Se obtuvo sangre periférica de donantes adultos sanos (grupos de edad 20 - 25 y > 60 años) mediante una punción venosa y se recogió en tubos de litio-heparina. Las muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos a término se adquirieron inmediatamente después del parto a partir del cordón umbilical pinzado en el Nepean Hospital. Los linfocitos mononucleares se aislaron mediante una centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). El Ethics Committees of the Western Sydney Area Health Services aprobó el estudio.

En la Figura 13, se aplicó una clasificación convencional para los CD4⁺CD25⁺ a las muestras de la sangre de cordón umbilical y de sangre periférica de donantes sanos jóvenes (20 - 25 años) y ancianos (> 60 años). Este análisis muestra un aumento significativo en los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ a lo largo de la vida. Mediante el uso de la nueva combinación de marcadores, ilustrada en la Figura 14 (panel superior), este aumento era bastante menos notable (Figura 15, panel derecho) y era comparable al observado con la tinción para CD4 y FoxP3 (Figura 15, panel izquierdo). Cuando se incluyó el CD45RA en el análisis, según se ilustra en los paneles inferiores de la Figura 14, fue evidente una relación recíproca entre el número de Tregs CD45RA⁺ y CD45RA⁻, con unas diferencias muy significativas en las cifras de las cohortes de las 3 edades (Figura 16).

Para ensayar si la función supresora de los Tregs cambia a lo largo de la vida, se llevaron a cabo ensayos de supresión mediante el uso de células clasificadas sobre la base de la tinción con CD4 / CD25 y CD127, según se indica en los paneles superiores de la Figura 17. Estos ensayos indicaron una función supresora equivalente para los linfocitos clasificados a partir de donantes en cada una de las tres cohortes de edades. Por lo tanto, el cambio desde la expresión de CD45RA hacia la expresión de un fenotipo CD45RO⁺RA⁻ no afecta a la actividad funcional *in vitro*.

Ejemplo 12: comparación del número de Treg circulantes en pacientes ancianos sanos frente a pacientes ancianos con enfermedad de Alzheimer

Se compararon los Treg de la sangre periférica de 4 individuos sanos con una edad superior a 75 años con los de 5 individuos de edades emparejadas que padecían enfermedad de Alzheimer. El estudio se llevó a cabo en el Rush University Medical School con la aprobación del Rush Institutional Review Board. Los detalles de los sujetos del estudio se proporcionan en la tabla 2.

Tabla 2: características del sujeto para el estudio con enfermedad de Alzheimer

ID	Sexo	Edad	Grupo de pacientes	% de CD45RO ⁻ CD127 ^{lo} CD25 ⁺ de los CD4 ⁺	% de CD45RO ⁺ CD127 ^{lo} CD25 ⁺ de los CD4 ⁺
12	M	85	NCI	0,79	2,02
15	F	84	NCI	2,22	4,49
18	F	90	NCI	1,83	1,08
21	M	75	NCI	0,21	3,03
14	M	90	AD	1,27	5,03
16	M	93	AD	0,34	5,31
17	F	91	AD	0,76	2,01
19	F	92	AD	2,27	3,99
20	M	83	AD	0,63	1,00

NCI = sin deterioro cognitivo
AD = enfermedad de Alzheimer

Según se muestra en la Figura 18, el número de linfocitos T en los compartimentos de Treg sin exposición previa (CD4⁺CD45RO⁻CD127^{lo}CD25⁺) y en los Treg activados / de memoria (CD4⁺CD45RO⁺CD127^{lo}CD25⁺) en individuos con una edad superior a 75 años era muy variable. No se observó ninguna diferencia entre los 2 grupos de sujetos.

Ejemplo 13: aumento en el número de Treg circulantes en pacientes con eccema atópico grave frente a controles sanos

Se tiñó la sangre periférica de pacientes con eccema atópico grave del Westmead hospital, con un nivel medio de IgE de 20.000 U.I., con CD4 / CD25 / CD127 / FoxP3. La comparación de la tinción con CD127 frente a FoxP3 para uno de los pacientes se muestra en la Figura 19. Como para en los controles sanos, había una clara correlación entre la expresión de FoxP3 y el fenotipo CD127^{lo}CD25⁺. La Figura 20 muestra una comparación de las cifras de los Treg derivados de una clasificación convencional de los linfocitos CD4⁺CD25⁺ frente una clasificación CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}. Mientras que la primera no muestra ninguna diferencia entre los sujetos sanos y los pacientes con eccema, la nueva clasificación muestra un aumento muy significativo en los linfocitos Treg en los pacientes con eccema.

Ejemplo 14: comparación del número de Treg circulantes en pacientes atópicos con asma frente a controles sanos

Se obtuvieron muestras de sangre periférica a partir de individuos según se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3: número de sujetos para las muestras de sangre periférica

	SPT ⁻	SPT ⁺ A ⁻	SPT ⁺ A ⁺
n	7	31	24
M / F	0 / 7	16 / 15	8 / 16
Edad	25 - 57	14 - 52	14 - 50
SPT⁻ prueba intraepidérmica negativa para todos los alérgenos ensayados SPT⁺ prueba intraepidérmica Post (tamaño de la roncha > 3 mm) para cualquier alérgeno ensayado A⁻ No asmático A⁺ Asma diagnosticado médicamente			

Según se muestra en la Figura 21, no hubo ninguna diferencia significativa en el porcentaje de Treg totales (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}) ni en el porcentaje de Treg CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}CD45RA⁺ sin exposición previa en los tres grupos de sujetos.

Se llevó a cabo una comparación adicional en los pacientes derivados de la cohorte de la Figura 21 (es decir, el grupo de control no atópico es el mismo en ambos conjuntos de datos). Los datos relativos a la cantidad de IL5 producida después de 48 horas de cultivo *in vitro* de ácaros del polvo doméstico (HDM) estaban disponibles para un subconjunto de atópicos (5 asmáticos en el grupo de IL5⁻ y 4 asmáticos en el grupo de IL5⁺), según se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: número de sujetos para las muestras de sangre periférica IL-5 / HDM

	SPT⁻	SPT⁺ HDM IL5⁻	SPT⁺ HDM IL5⁺
n	7	17	9
M / F	0 / 7	7 / 10	2 / 7
Edad	25 - 57	20 - 52	14 - 24
SPT⁻ prueba intraepidérmica negativa para todos los alérgenos ensayados SPT⁺ prueba intraepidérmica Post (tamaño de la roncha > 3 mm) para ácaros del polvo doméstico (HDM) HDM IL5⁻ niveles indetectables de IL5 en el cultivo de PBMC después de 48 h de estimulación con HDM HDM IL5⁺ niveles detectables de IL5 en el cultivo de PBMC después de 48 h de estimulación con HDM			

Según se muestra en la Figura 22, la subdivisión del grupo de asmáticos entre aquellos que secretaban IL-5 detectable después de la exposición a HDM en cultivo y aquellos que no, no dio como resultado ninguna diferencia significativa en el porcentaje de Treg totales (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}) entre los 3 grupos. Sin embargo, tanto los Treg CD25⁺CD127^{lo}CD45RA⁺ sin exposición previa en forma de un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺, como la proporción entre los Treg CD25⁺CD127^{lo}CD45RA⁺ y los CD25⁺CD127^{lo}CD45RA⁻ estaban significativamente aumentados en el grupo IL5⁺ en comparación con los otros 2 grupos. Por lo tanto, los pacientes asmáticos reactivos a los HDM muestran un aumento significativo en los linfocitos Treg sin exposición previa circulantes, y un aumento en la proporción entre los Tregs sin exposición previa y los activados / de memoria en la sangre periférica.

Ejemplo 15: comparación del número de Treg circulantes en pacientes con síndrome de Sjogren frente a controles sanos

Se tiñó la sangre periférica de 18 pacientes con síndrome de Sjogren primario (todos femeninos) y 17 controles femeninos sanos emparejados por edades con la combinación de mAb CD4 / CD25 / CD127 / CD45RA. El síndrome de Sjogren primario fue diagnosticado de acuerdo con los criterios europeos (29). Según se muestra en la Figura 23, los porcentajes de linfocitos Treg sin exposición previa y los totales (pero no activados) eran mayores en los pacientes con síndrome de Sjogren. El aumento fue observado a lo largo de la totalidad de la distribución de edades.

Ejemplo 16: comparación del número de Treg circulantes en pacientes en diferentes estadios de una infección por el VIH

Se obtuvo sangre periférica de 28 pacientes VIH⁺ con una enfermedad avanzada (Rush University Medical Center, Chicago, IL), de 10 pacientes con una infección primaria (seroconvertidores, St Vincents Hospital, Darlinghurst, NSW, Australia) y de 7 pacientes VIH⁺ que desarrollaron una enfermedad de reconstitución inmunitaria (IRD) (St Vincent Hospital). Todos los pacientes, excepto aquellos con una infección primaria, y 3 de los 28 con una enfermedad en fase tardía, estaban en terapia con agentes antirretrovíricos. El estudio se llevó a cabo con la aprobación de los Central Area Health Services y del Rush Institutional Review Board.

En la Figura 24 se muestran los perfiles de flujo representativos. El patrón de expresión de CD25 y de CD127 entre los linfocitos T CD4⁺ no estaba alterado en los pacientes con VIH, aparte de aquellos con una enfermedad de reconstitución inmunitaria, en los que había un aumento masivo de los linfocitos CD25⁺CD127^{lo}. La subdivisión sobre la base de la expresión del CD45RO indicó que el aumento en los Treg en los pacientes con una enfermedad de reconstitución inmunitaria estaba principalmente en el subconjunto CD45RO⁺ de los linfocitos T CD4⁺.

Para medir la expresión de Foxp3 en la población de CD25⁺CD127^{lo}, se tiñeron los linfocitos de un paciente con una enfermedad de reconstitución inmunitaria con una combinación de anticuerpos monoclonales contra CD4, CD25, Foxp3 y CD127. El 96,7 % y el 97,8 % de los linfocitos CD4⁺CD127^{lo}CD25⁺ (Fig. 25, panel izquierdo) estaban en la ventana de adquisición CD25⁺Foxp3⁺, y el 97,8 % en la ventana de adquisición CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺, respectivamente (Fig. 25, paneles derechos). Por lo tanto, había una elevada tasa de concordancia entre el fenotipo CD127^{lo} y la expresión de la proteína Foxp3 entre los linfocitos CD4⁺CD25⁺.

Según se muestra en la Fig. 26, los Treg CD45RO⁺ estaban significativamente aumentados en los pacientes VIH⁺ con una enfermedad de reconstitución inmunitaria. En comparación con los seroconvertidores, los pacientes crónicos con VIH generalmente tenían menos Treg sin exposición previa, y la diferencia alcanzaba una significación estadística en el grupo con una enfermedad avanzada que estaba siendo tratada con antirretrovíricos.

Ejemplo 17: medición del número de Treg circulantes en pacientes con melanoma

En estudios llevados a cabo en el Ludwig Institute for Cancer Research del Austin Hospital de Melbourne, se contaron los Treg en la sangre periférica de pacientes con melanoma. Los 6 pacientes mostrados en la Tabla 5 no habían participado en un ensayo de vacuna, pero se les había extraído sangre 3 veces por semana durante varias semanas para evaluar las fluctuaciones diarias en las cifras de los Treg en un individuo.

Tabla 5: información del paciente para los datos mostrados en la Figura 27

Paciente	Sexo	Edad
TRC 01	M	82
TRC 02	F	33
TRC 03	M	70
TRC 04	F	67
TRC 05	M	49
TRC 06	m	77

Según se muestra en la Figura 27, había una buena correlación entre las cifras de Treg derivados de la tinción con CD4 / CD127 / CD25 y las del análisis CD4 / FoxP3 (panel derecho). Las cifras de Treg eran generalmente estables durante periodos de más de un mes, mostrando los pacientes con unas cifras generalmente más altas de Treg, una mayor variación longitudinal (paneles izquierdo y central).

Los pacientes mostrados en la Tabla 6 participaron en el ensayo LUD2002-013 (vacunación con NY-ESO-1 + ISCOMATRIX). Los 12 pacientes tenían melanoma metastásico avanzado.

Tabla 6: información del paciente para los datos mostrados en la Figura 28

Paciente	Sexo	Edad
101	M	59
102	F	62
103	F	53
104	F	79
106	M	46
107	M	86
110	M	64
113	M	49
117	M	72
124	M	67
125	M	41
126	F	67

Según se muestra en la Figura 28, la variación en las cifras de los Treg después de la vacunación no era mayor de lo que se apreciaba en el estudio longitudinal mostrado en la Figura 27. La variación era esencialmente aleatoria, elevándose los valores en algunos pacientes (por ejemplo, en el 107) y disminuyendo en otros (por ejemplo, en el 106).

Ejemplo 18: medición del número de Treg circulantes en pacientes con un trasplante renal frente a aquellos con insuficiencia renal crónica, con o sin diálisis.

Se incluyó un grupo de 60 pacientes con insuficiencia renal crónica (CRF) del Prince of Wales Hospital, Sídney. Los detalles de los pacientes se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7: pacientes en estudio de enfermedad renal de los Tregs en sangre periférica (CRF = insuficiencia renal crónica no tan grave como para requerir diálisis, Diálisis = hemodiálisis para la insuficiencia renal crónica, Transplante = receptor de un trasplante renal)

ID del paciente	Edad	Sexo	Grupo
3	26	Masculino	crf
43	35	Femenino	crf
8	37	Femenino	crf
31	49	Femenino	crf
30	56	Masculino	crf
13	60	Masculino	crf
14	65	Femenino	crf

ID del paciente	Edad	Sexo	Grupo
39	66	Masculino	crf
27	69	Masculino	crf
37	70	Masculino	crf
7	75	Masculino	crf
41	75	Masculino	crf
10	77	Femenino	crf
28	77	Femenino	crf
11	77	Masculino	crf
26	77	Masculino	crf
29	77	Masculino	crf
16	82	Masculino	crf
20	82	Masculino	crf
51	90	Masculino	crf
45	22	Femenino	Diálisis
55	23	Femenino	Diálisis
42	42	Masculino	Diálisis
59	44	Femenino	Diálisis
18	44	Masculino	Diálisis
53	44	Masculino	Diálisis
24	52	Femenino	Diálisis
36	52	Femenino	Diálisis
23	58	Femenino	Diálisis
48	58	Femenino	Diálisis
47	60	Femenino	Diálisis
52	64	Masculino	Diálisis
54	64	Masculino	Diálisis
32	72	Femenino	Diálisis
19	72	Masculino	Diálisis
50	76	Masculino	Diálisis
25	77	Femenino	Diálisis
22	80	Femenino	Diálisis
21	80	Masculino	Diálisis
46	81	Femenino	Diálisis
15	24	Masculino	Transplante
60	33	Femenino	Transplante
34	38	Femenino	Transplante
57	43	Femenino	Transplante
49	43	Masculino	Transplante
44	48	Femenino	Transplante
40	52	Masculino	Transplante
4	53	Masculino	Transplante
5	53	Masculino	Transplante
58	54	Masculino	Transplante
35	55	Masculino	Transplante
1	59	Femenino	Transplante

ID del paciente	Edad	Sexo	Grupo
9	60	Femenino	Transplante
6	60	Masculino	Transplante
17	60	Masculino	Transplante
38	62	Femenino	Transplante
56	64	Femenino	Transplante
12	65	Masculino	Transplante
2	67	Masculino	Transplante
33	69	Femenino	Transplante

Se tiñeron los leucocitos de sangre periférica de los 20 pacientes de cada grupo con CD4 / CD25 / CD127 / CD45RA y se clasificaron según se indica en la Figura 4 A.

- 5 Según se muestra en la Figura 29, el número de Tregs activados / de memoria era mayor en el grupo con diálisis y menor en el grupo de trasplantados, y la diferencia era estadísticamente significativa. La reducción en el número era probablemente el resultado de la terapia inmunosupresora usada para prevenir el rechazo del trasplante. Las cifras de los Treg sin exposición previa no variaron significativamente en los 3 grupos.

10 **Ejemplo 19: uso del cóctel de mAb CD4 / CD25 / CD127 / CD45RO anti-humanos para la detección de los Treg en macacos**

Se obtuvo sangre periférica de 32 macacos como parte de un estudio de vacunación llevado a cabo con la aprobación de la University of Melbourne y de los CSIRO Livestock Industries Animal Experimentation and Ethics Committees. Había 3 grupos diferentes: controles (11 sujetos), un grupo tratado con proteína Gag (10 sujetos) y un grupo tratado con Gag, Env, Pol y RTN VVV (10 sujetos).

En este estudio se usaron los siguientes mAbs de ratón con una especificidad primaria por las moléculas humanas: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD45RO (PharMingen, San Diego, CA), -CD25 (BD Biosciences, San José, CA) -CD127 (Immunotech, Marseille, Francia).

Según se muestra en la Figura 30, la expresión de CD25, de CD45RO y de CD127 en los leucocitos de la sangre periférica de los macacos era similar a la del hombre, por lo que pudo emplearse la misma estrategia de clasificación para la identificación de los linfocitos CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}. La Figura 31 muestra que el porcentaje de Tregs en la sangre periférica de los macacos es esencialmente el mismo que en los seres humanos, y que la vacunación no afecta a las cifras.

Referencias

1. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu. Rev. Immunol. 22: 531 - 562.
2. Kriegl, M. A., T. Lohmann, C. Gabler, N. Blank, J. R. Kalden y H. M. Lorenz. 2004. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. J. Exp. Med. 199: 1285 - 1291.
3. Crispin, J. C., A. Martinez y J. Alcocer-Varela. 2003. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. J. Autoimmun. 21: 273 - 276.
4. Cao, D., R. van Vollenhoven, L. Klareskog, C. Trollmo y V. Malmstrom. 2004. CD25brightCD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. Arthritis Res. Ther. 6: R 335 - 346.
5. Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg y C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J. Exp. Med. 200: 277 - 285.
6. Sugiyama, H., R. Gyulai, E. Toichi, E. Garacz, S. Shimada, S. R. Stevens, T. S. McCormick y K. D. Cooper. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. J. Immunol. 174: 164 - 173.
7. Viglietta, V., C. Baecher - Allan, H. L. Weiner y D. A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J. Exp. Med. 199: 971 - 979.
8. Furuno, K., T. Yuge, K. Kusuha, H. Takada, H. Nishio, V. Khajoe, T. Ohno y T. Hara. 2004. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. J. Pediatr. 145: 385 - 390.
9. Maul, J., C. Loddenkemper, P. Mundt, E. Berg, T. Giese, A. Stallmach, M. Zeitz y R. Duchmann. 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25high T cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 128: 1868 - 1878.
10. Karlsson, M. R., J. Rugtveit y P. Brandtzaeg. 2004. Allergen-responsive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. J. Exp. Med. 199: 1679 - 1688.

11. Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr y D. S. Robinson. 2004. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363: 608 - 615.
12. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance y H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27: 20 - 21.
13. Ormandy, L. A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M. P. Manns, T. F. Greten y F. Korangy. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 65: 2457 - 2464.
14. Schaefer, C., G. G. Kim, A. Albers, K. Hoermann, E. N. Myers y T. L. Whiteside. 2005. Characteristics of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 92: 913 - 20.
15. Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman y D. A. Hafler. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167: 1245 - 1253.
16. Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli y N. Maclaren. 2002. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109: 131 - 140.
17. Cao, D., V. Malmstrom, C. Baecher-Allan, D. Hafler, L. Klareskog y C. Trollmo. 2003. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 33: 215 - 223.
18. Huang, Y. M., R. Pirskanen, R. Giscombe, H. Link y A. K. Lefvert. 2004. Circulating CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells in myasthenia gravis and in relation to thymectomy. *Scand. J. Immunol.* 59: 408 - 414.
19. Putheti, P., A. Pettersson, M. Soderstrom, H. Link y Y. M. Huang. 2004. Circulating CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J. Clin. Immunol.* 24: 155 - 61.
20. van Amelsfort, J. M., K. M. Jacobs, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber y L. S. Taams. 2004. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 50: 2775 - 2785.
21. Seddiki, N., B. Santner - Nanan, S. G. Tangye, S. I. Alexander, M. Solomon, S. Lee, R. Nanan y B. Fazekas de St Groth. 2006. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood* 107: 2830 - 2838.
22. Seddiki, N., W. Selby, M. Solomon, S. Lee, P. McKenzie y B. Fazekas de St Groth. 2006. Young patients with inflammatory bowel disease display primary defects in regulatory T cells. Enviado para su publicación.
23. Ruprecht, C. R., M. Gattorno, F. Ferlito, A. Gregorio, A. Martini, Antonio Lanzavecchia y F. Sallusto. 2005. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3⁺ regulatory T cells in inflamed synovia. *J. Exp. Med.* 201: 1793 - 1803.
24. Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Meemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, L. van der Zanden, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H. Ottenhoff y R. E. Toes. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* 66: 13 - 20.
25. Cozzo, C., J. Larkin, 3º y A. J. Caton. 2003. Self-peptides drive the peripheral expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 171: 5678 - 5682.
26. Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos y A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 3: 33 - 41.
27. Godfrey, W. R., D. J. Spoden, Y. G. Ge, S. R. Baker, B. Liu, B. L. Levine, C. H. June, B. R. Blazar y S. B. Porter. 2005. Cord blood CD4⁺CD25⁺-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105: 750 - 758.
28. Baecher-Allan, C., E. Wolf y D. A. Hafler. 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.* 176: 4622 - 4631.
29. Vitali, C., S. Bombardieri, R. Jonsson, H. M. Moutsopoulos, E. L. Alexander, S. E. Carsons, T. E. Daniels, P. C. Fox, R. I. Fox, S. S. Kassan, S. R. Pillemer, N. Talal y M. H. Weisman. 2002. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 61: 554 - 8.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Centenary Institute of Cancer Medicine y Cell Biology
- <120> Método para identificar linfocitos T reguladores
- <130> 715732
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
5	<400> 1	
	ggcaaatggt gtctgcaagt g	21
	<210> 2	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia sintética	
	<400> 2	
	ggatgatgcc acagatgaag c	21
20	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<400> 3	
30	aactgtcaga ccaccacaac cacac	25
	<210> 4	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<400> 4	
40	ggatgccttc cttctcata gtcagg	26
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
50	<400> 5	
	cactacagga tgttgtgga cgtg	24
	<210> 6	
	<211> 24	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
60	<400> 6	
	ccccttggtg tttgtgagct ttag	24
	<210> 7	
65	<211> 26	
	<212> ADN	

<213> Artificial

<220>
<223> secuencia sintética

5

<400> 7
tcgacaacgg ctccggcatg tgcaag 26

10

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 8
agccacacgc agctcattgt agaag 25

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la identificación de un linfocito T regulador o de una población de linfocitos T reguladores, en el que dicho linfocito o linfocitos T reguladores se distinguen de los linfocitos T $CD4^+CD25^+$ convencionales activados y de los linfocitos T $CD4^+CD25^+$ de memoria basándose en el nivel de expresión del CD127 en los linfocitos $CD4^+CD25^+$, comprendiendo el método:
 - (a) (i) analizar al menos una célula en una muestra biológica de un primate para determinar un nivel de expresión celular de CD127, de CD4 y de CD25; o
 - 10 (ii) analizar al menos una célula en una muestra biológica de un primate para determinar un nivel de expresión celular del CD127, en el que la al menos una célula en la muestra se ha ensayado previamente para comprobar la expresión de CD4 y de CD25, y se ha encontrado que es $CD4^+$ y $CD25^+$; e
 - (b) identificar un linfocito T regulador o una población de linfocitos T reguladores basándose únicamente en la célula o las células que tienen expresión $CD127^{low}CD4^+CD25^+$.
 - 15
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la cuantificación de la cantidad de células $CD127^{low}CD4^+CD25^+$ en la muestra, en el que la cantidad de células $CD127^{low}CD4^+CD25^+$ en la muestra es indicativa de la cantidad de linfocitos T reguladores en la muestra.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que se realiza para monitorizar la cantidad de linfocitos T reguladores durante el transcurso de una patología, de una infección o de una terapia.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la patología o la infección se seleccionan de enfermedades autoinmunitarias, inmunoinflamatorias o alérgicas, o predisposiciones a las mismas, enfermedades infecciosas o cáncer.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que se realiza para predecir la respuesta a una terapia para una patología o una infección en un sujeto primate basándose en la cantidad de linfocitos T reguladores en el sujeto.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que una subproducción de linfocitos T reguladores está relacionada con una enfermedad inflamatoria del intestino, o con una predisposición a la misma, o con el trasplante de órganos.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que una superproducción de linfocitos T reguladores está relacionada con el síndrome de Sjogren primario, eccema, asma, carcinoma hepatocelular o una infección por el VIH.
- 40 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho análisis del nivel de expresión celular del CD127 comprende el uso de un anticuerpo anti-CD127 o de un oligonucleótido específico para el CD127.

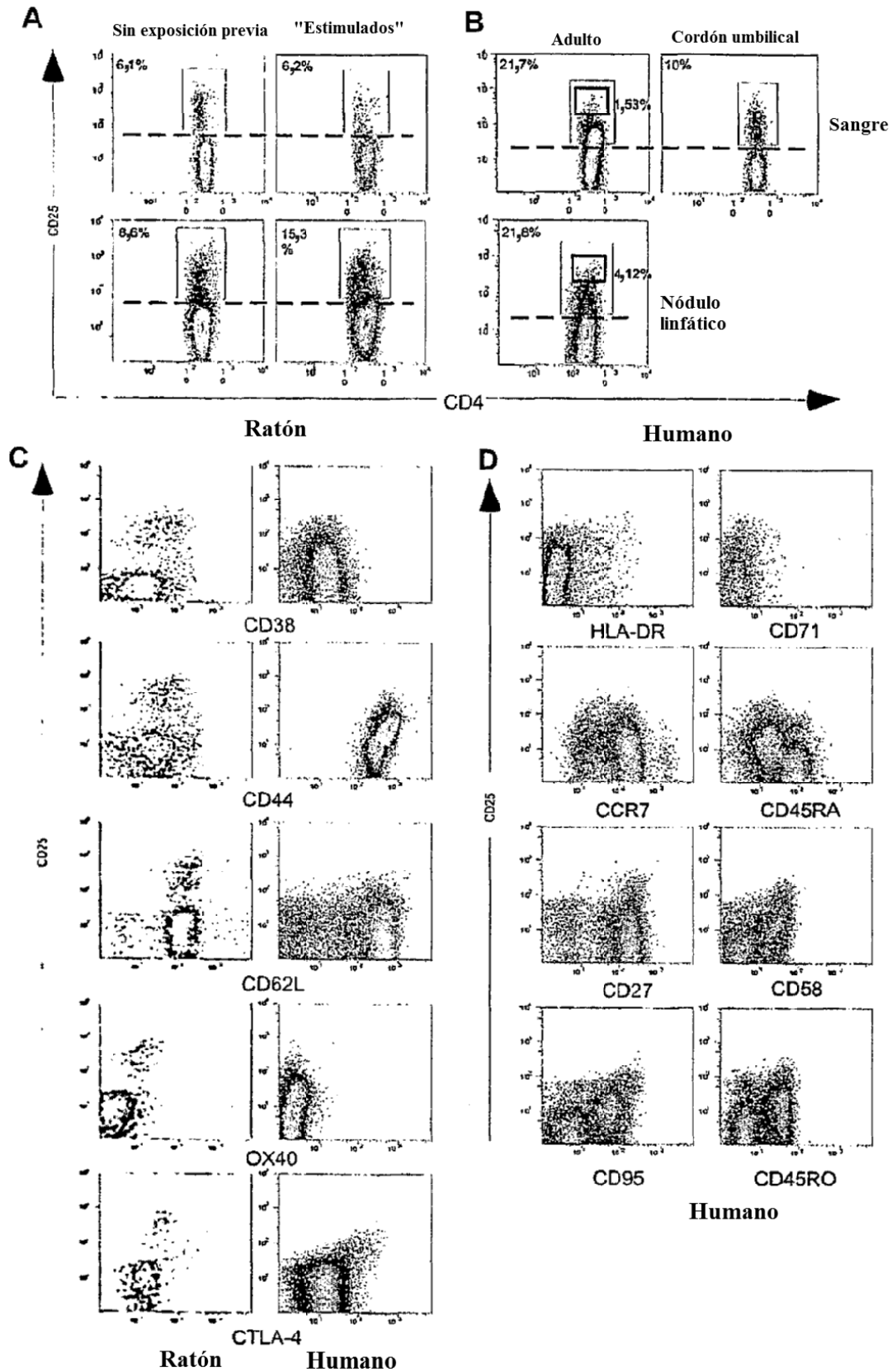


Figura 1

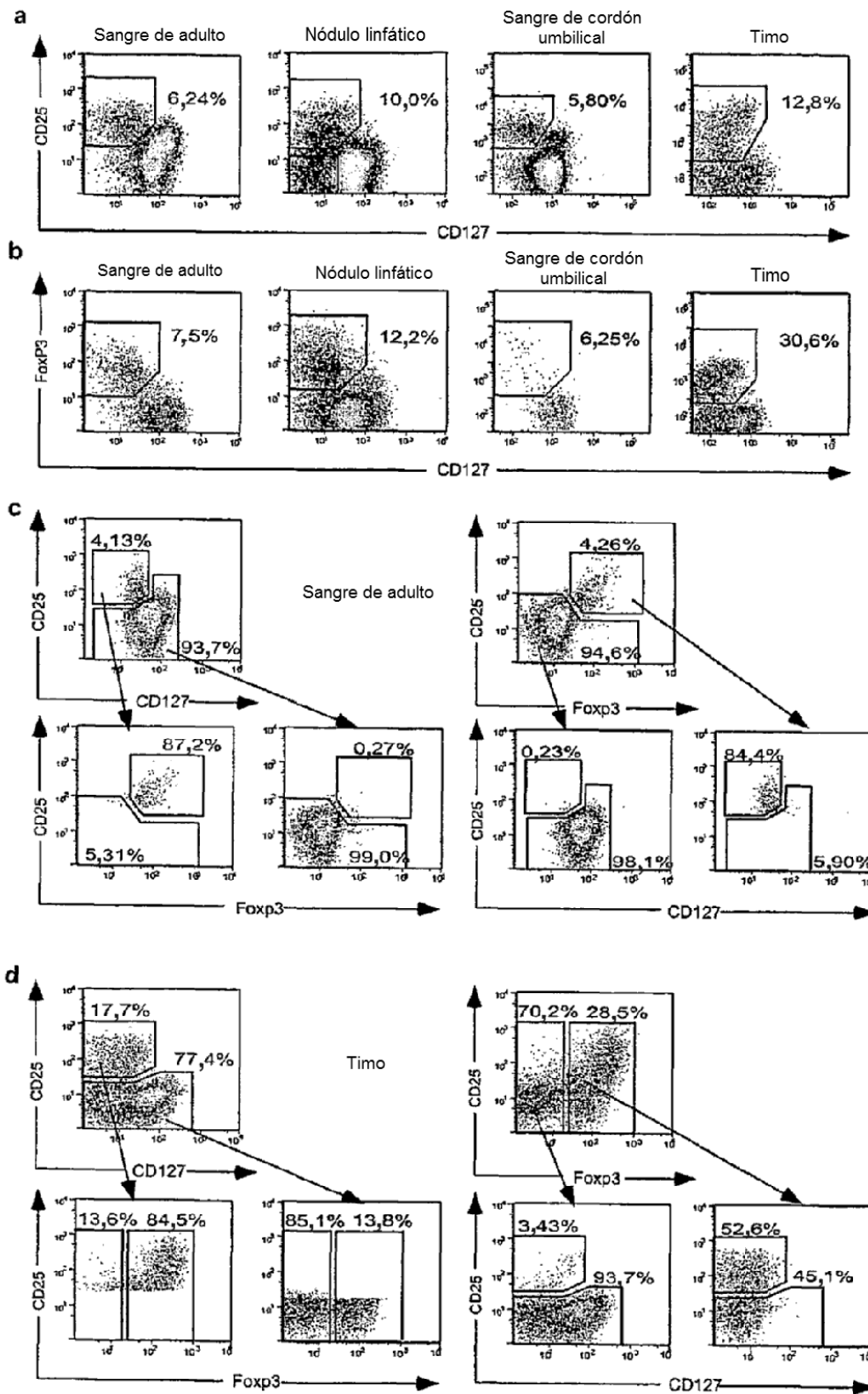
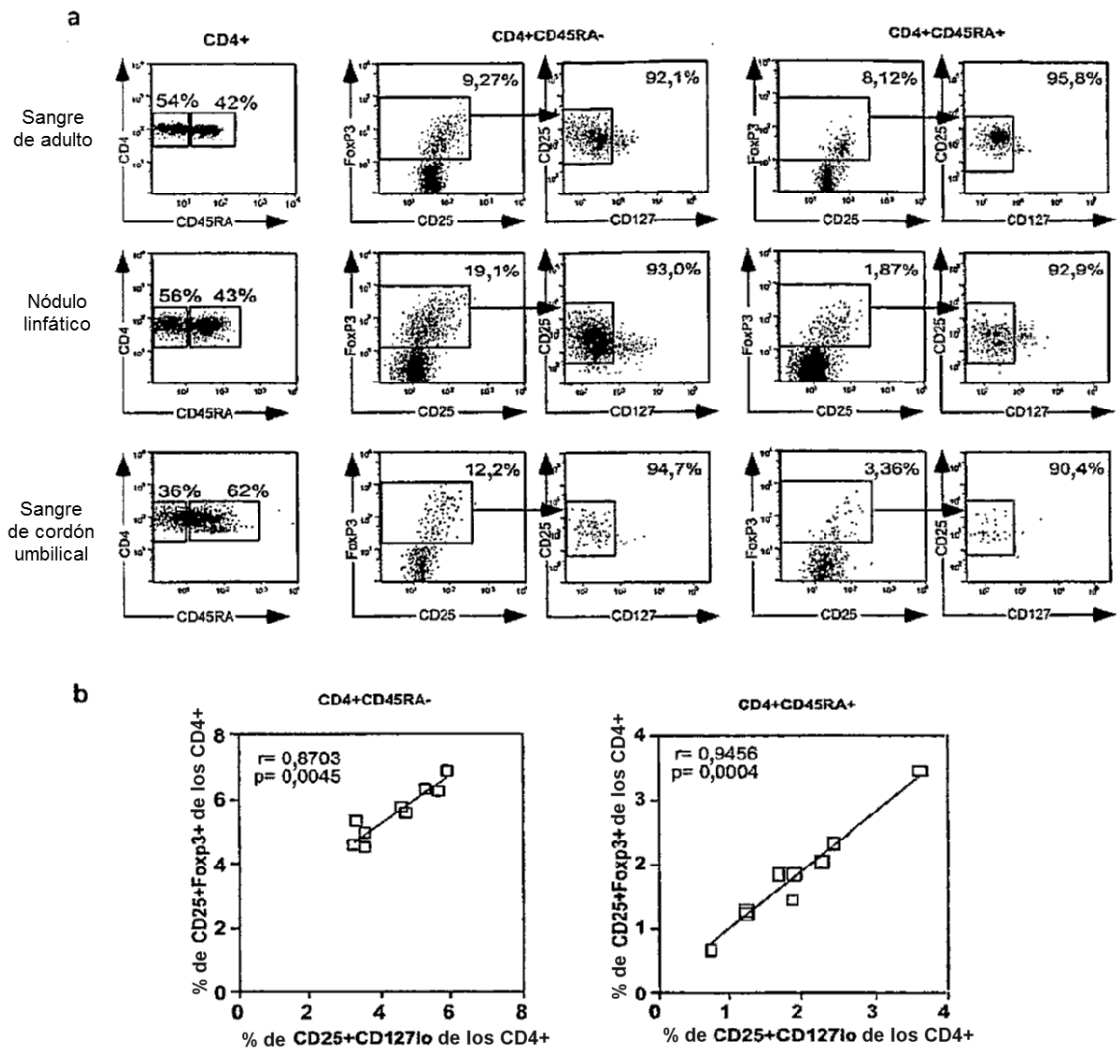


Figura 2



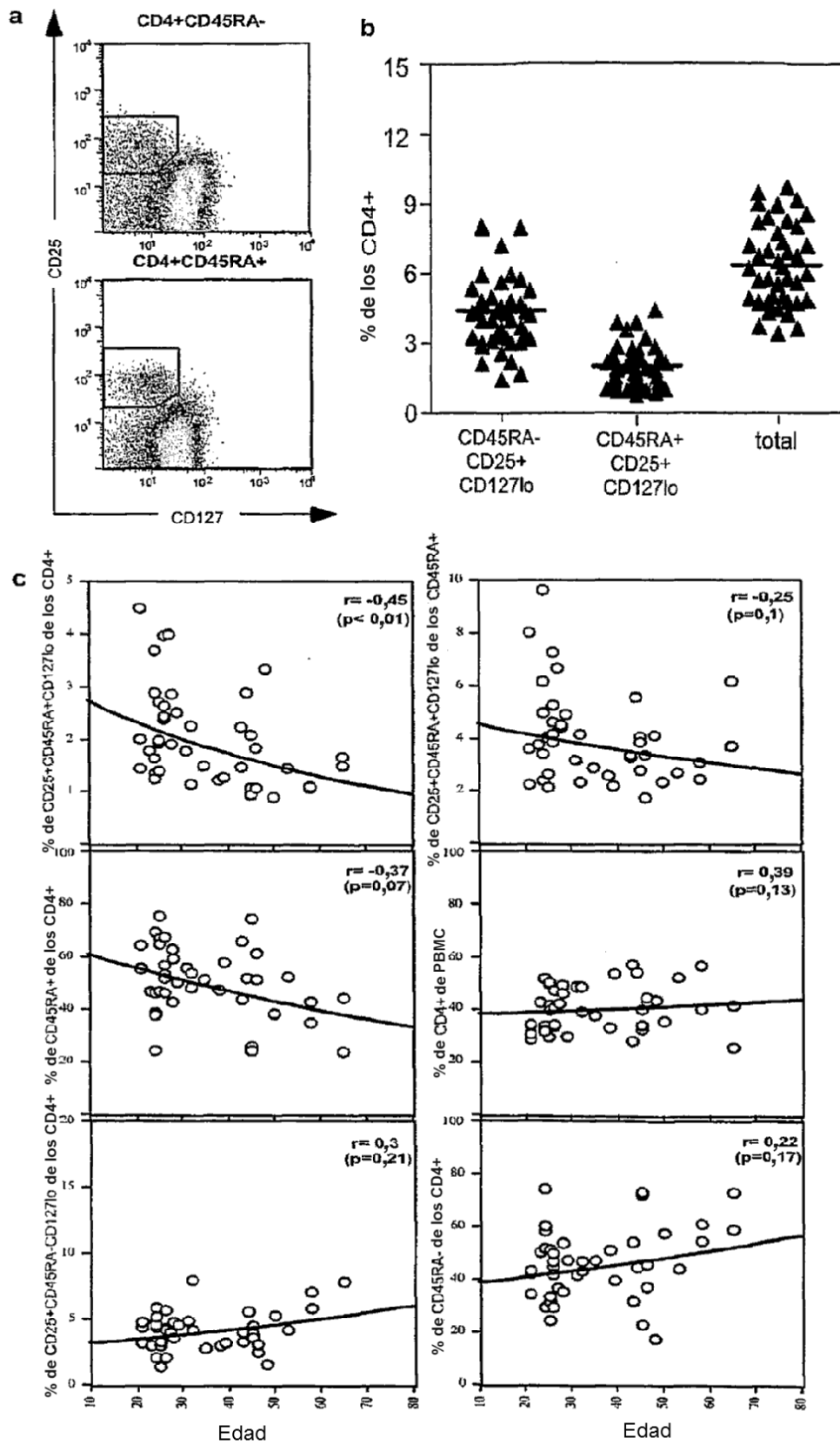


Figura 4

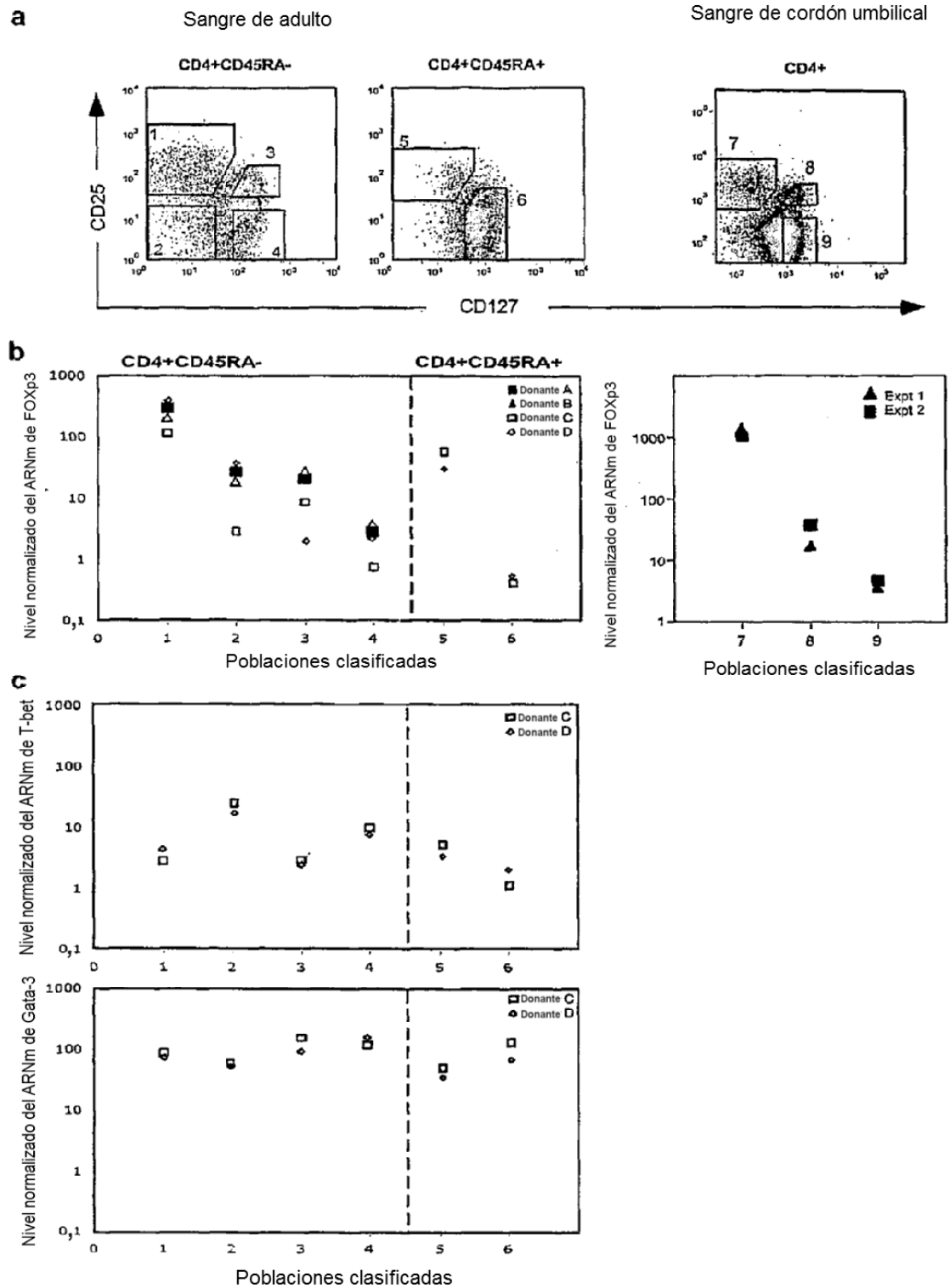


Figura 5

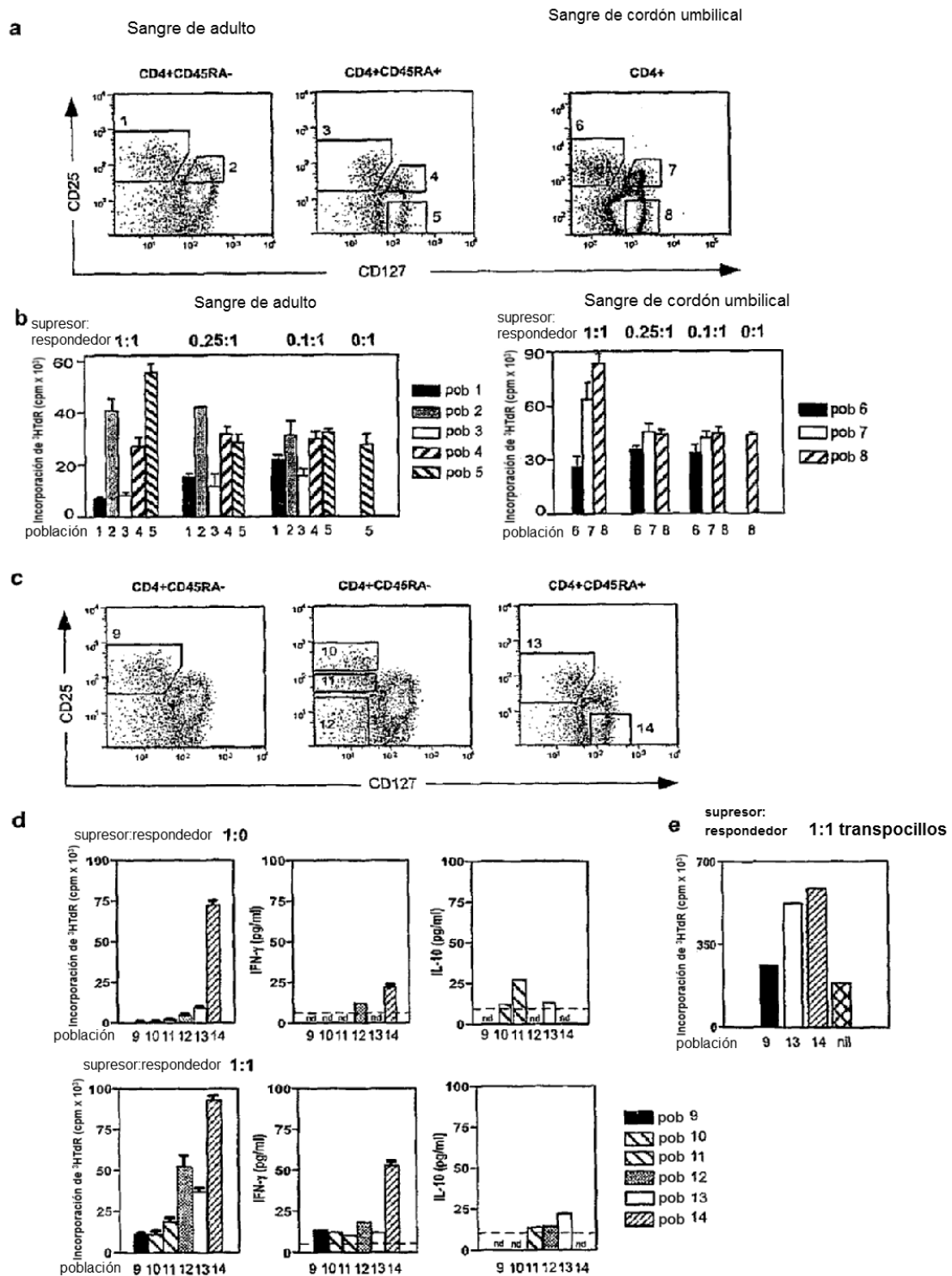


Figura 6

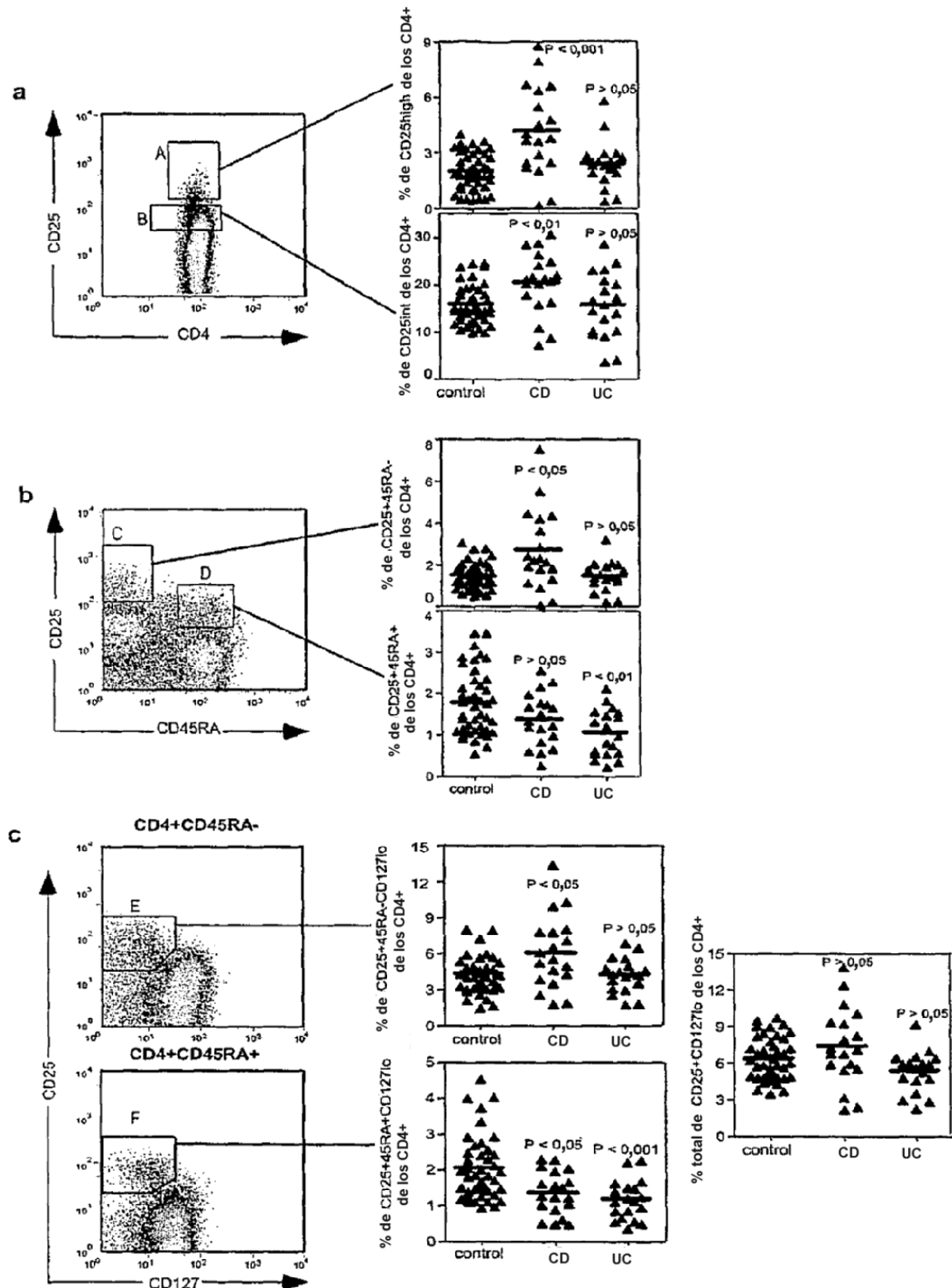


Figura 7

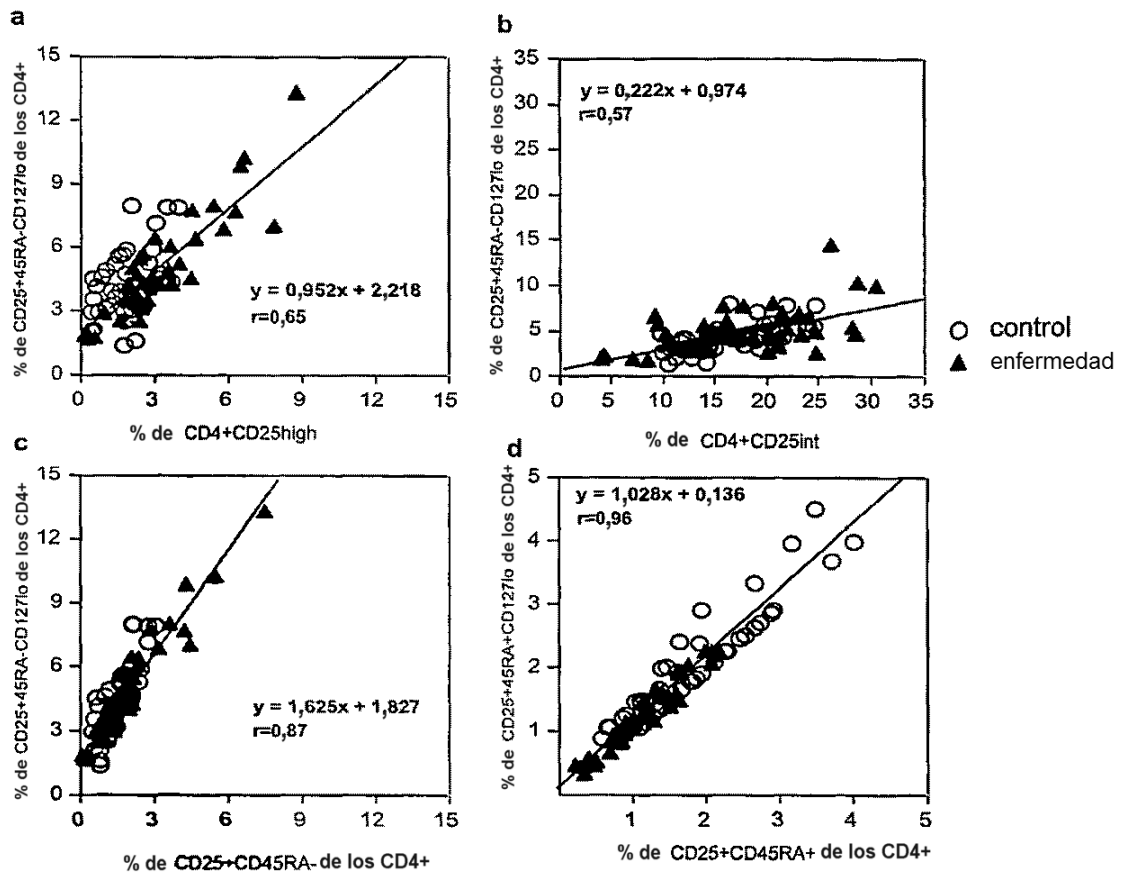


Figura 8

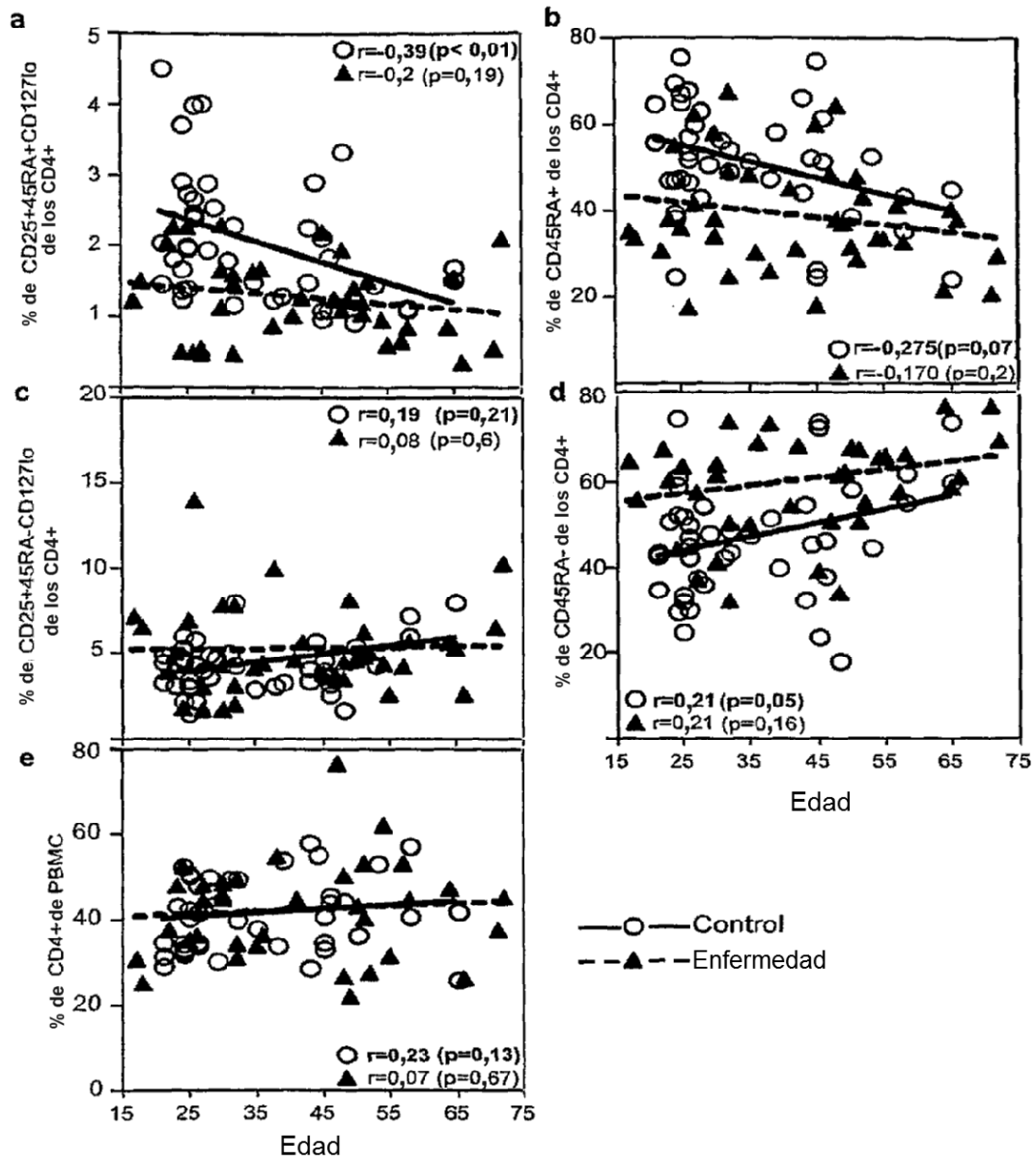


Figura 9

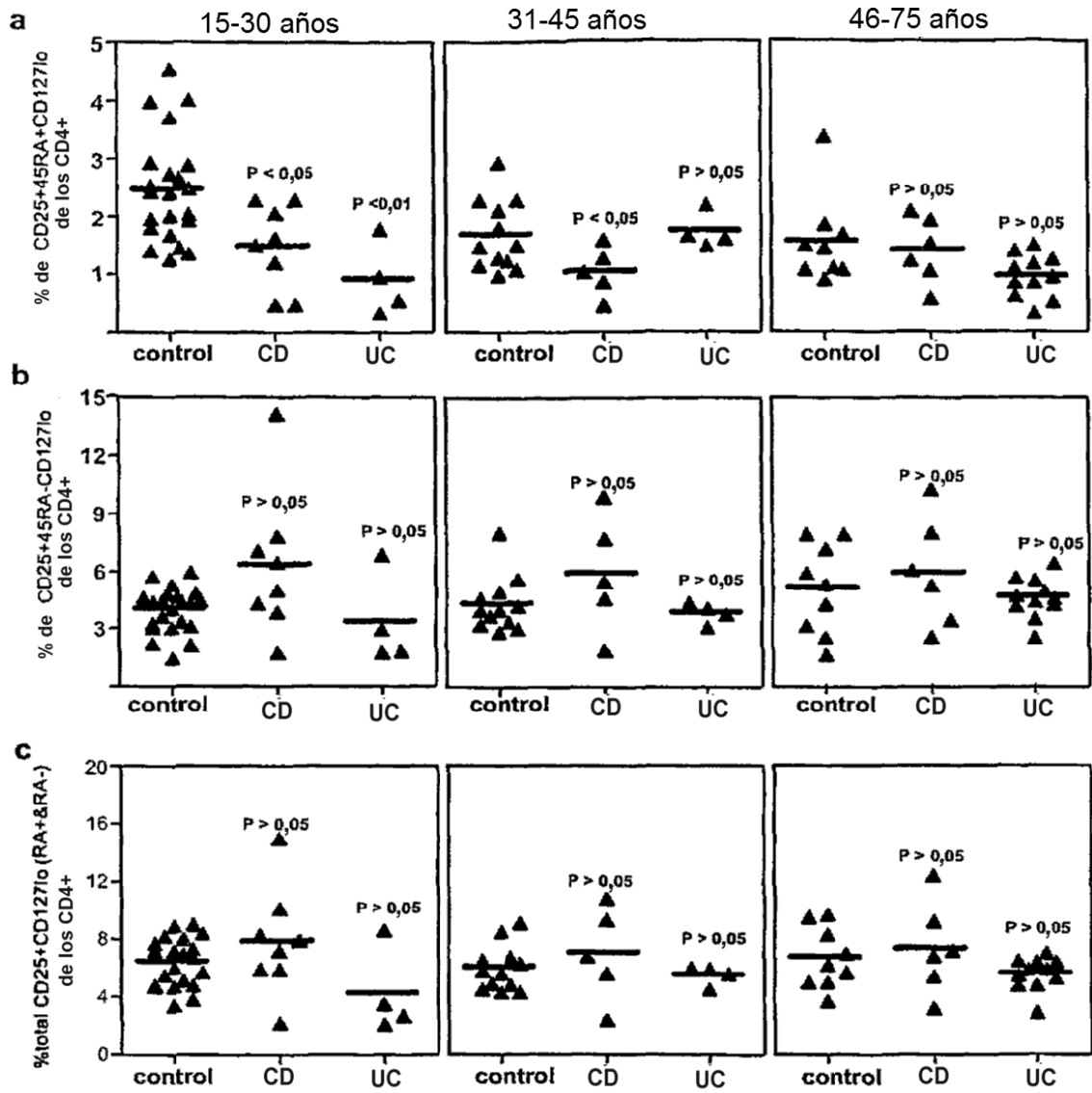


Figura 10

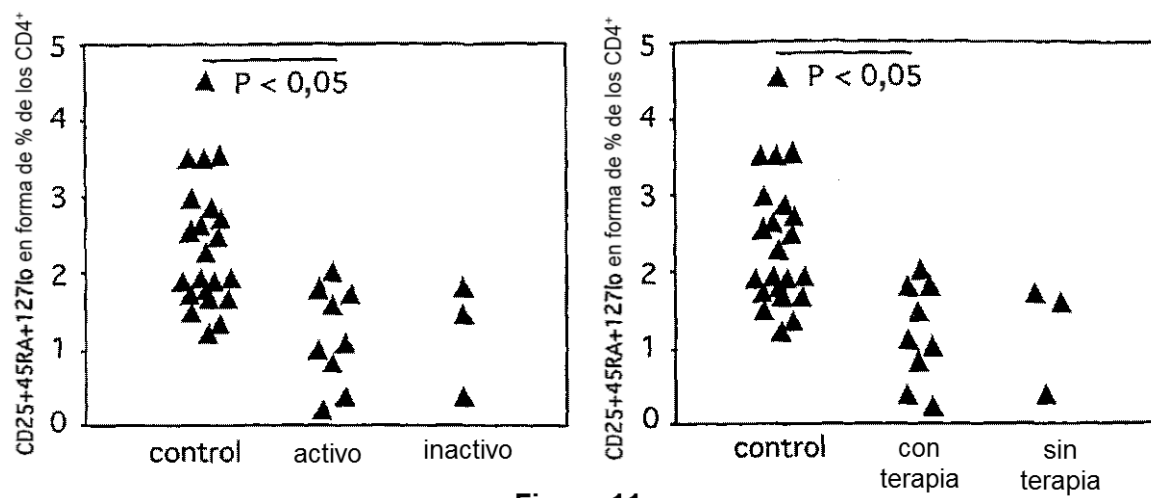


Figura 11

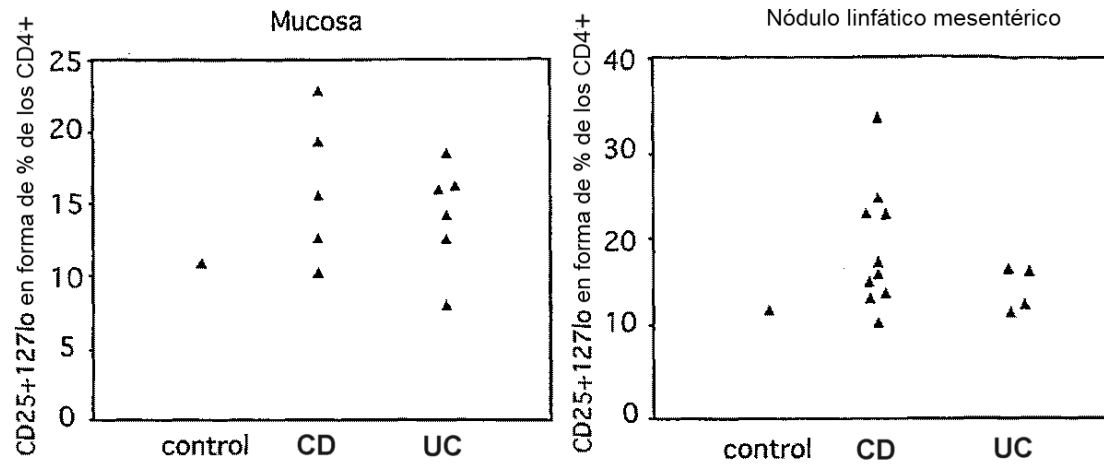


Figura 12

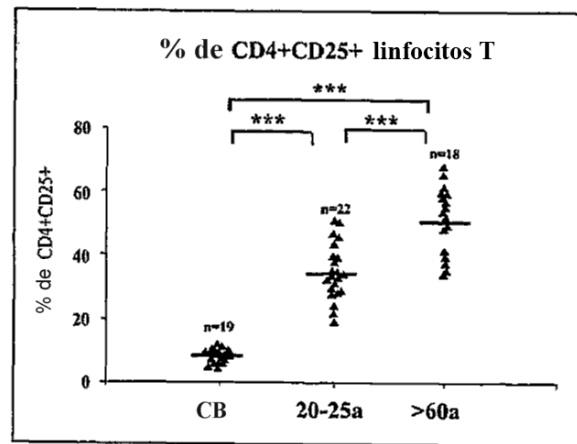
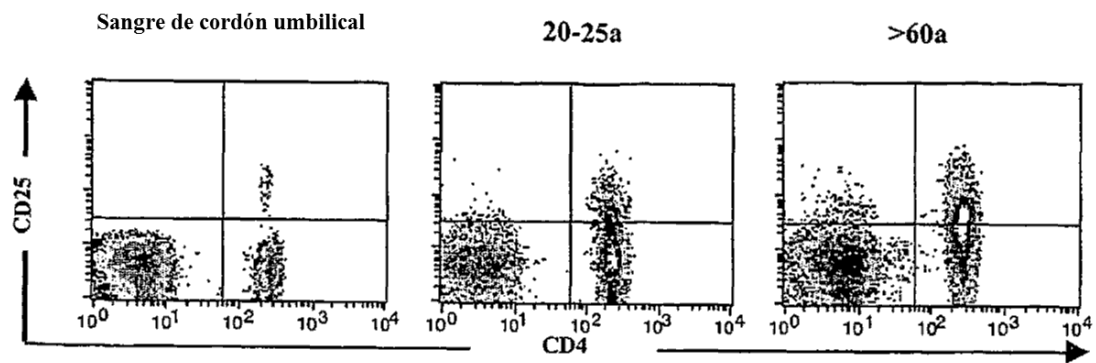


Figura 13

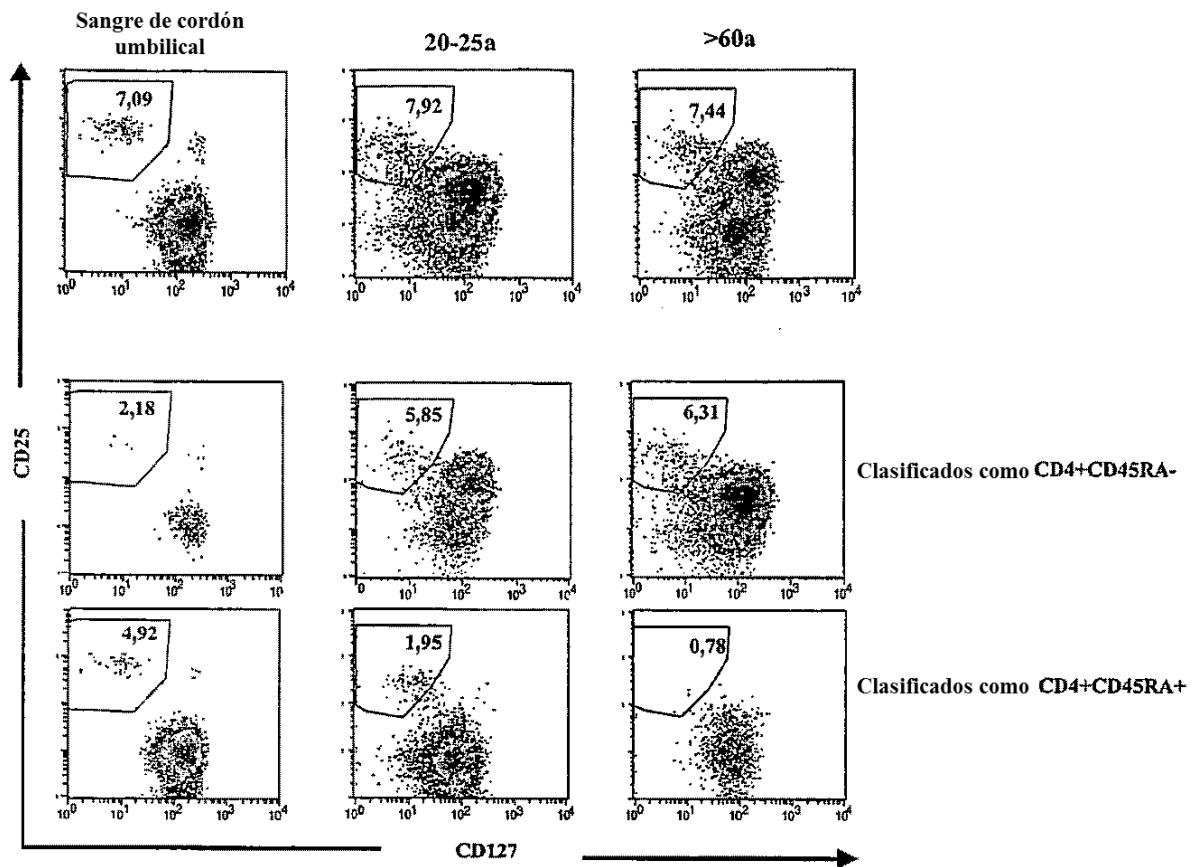


Figura 14

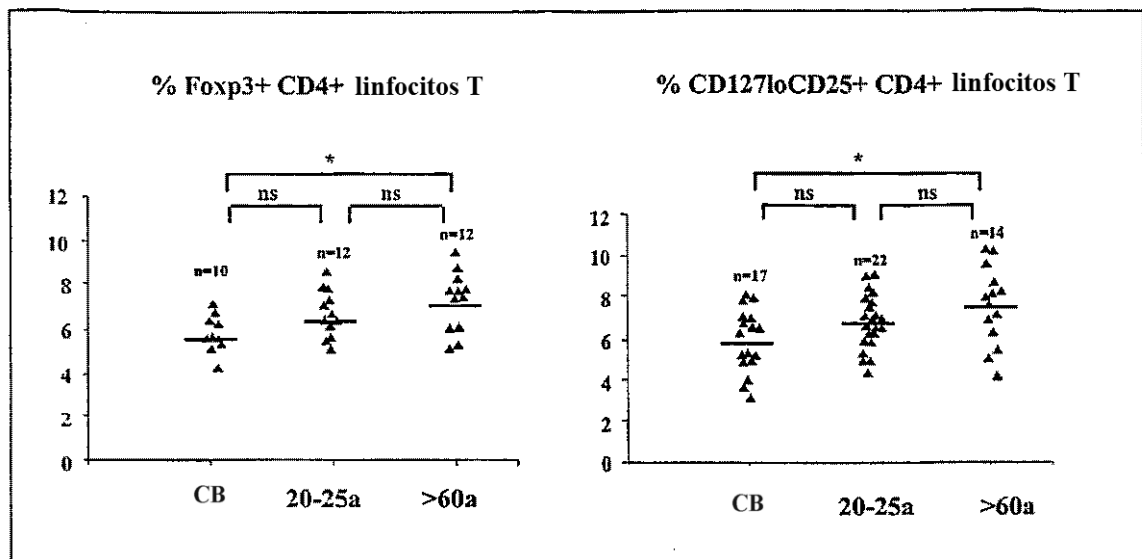


Figura 15

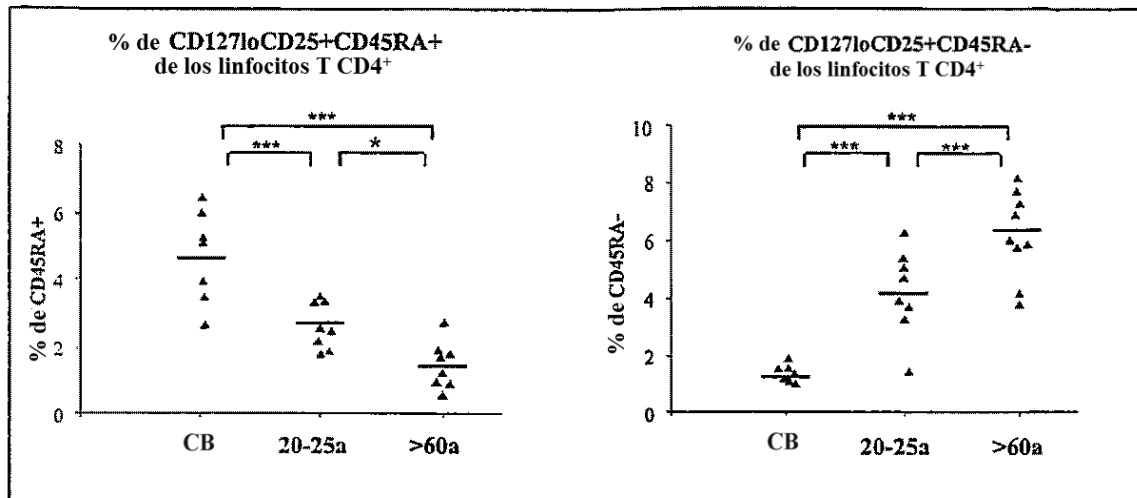


Figura 16

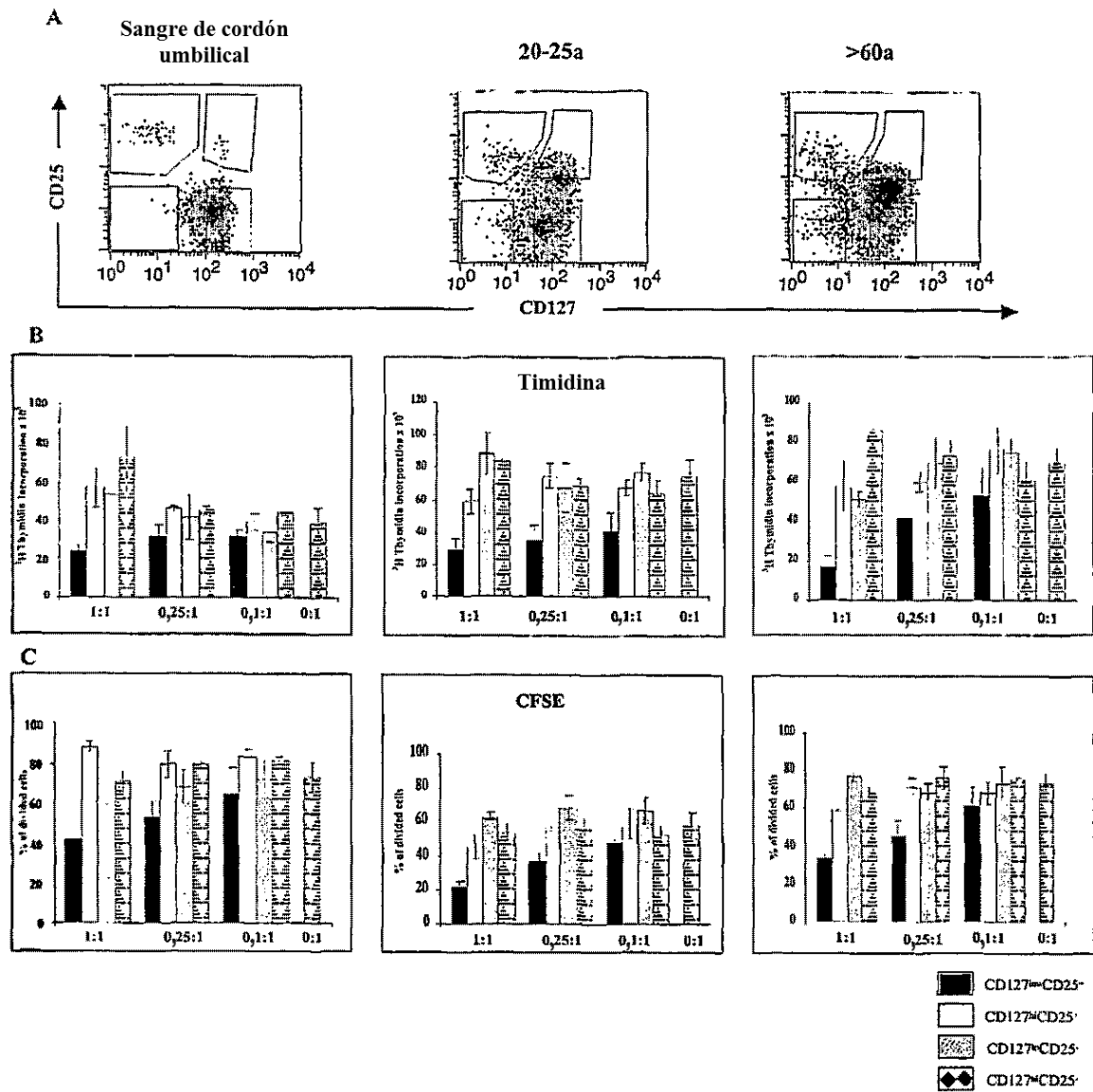


Figura 17

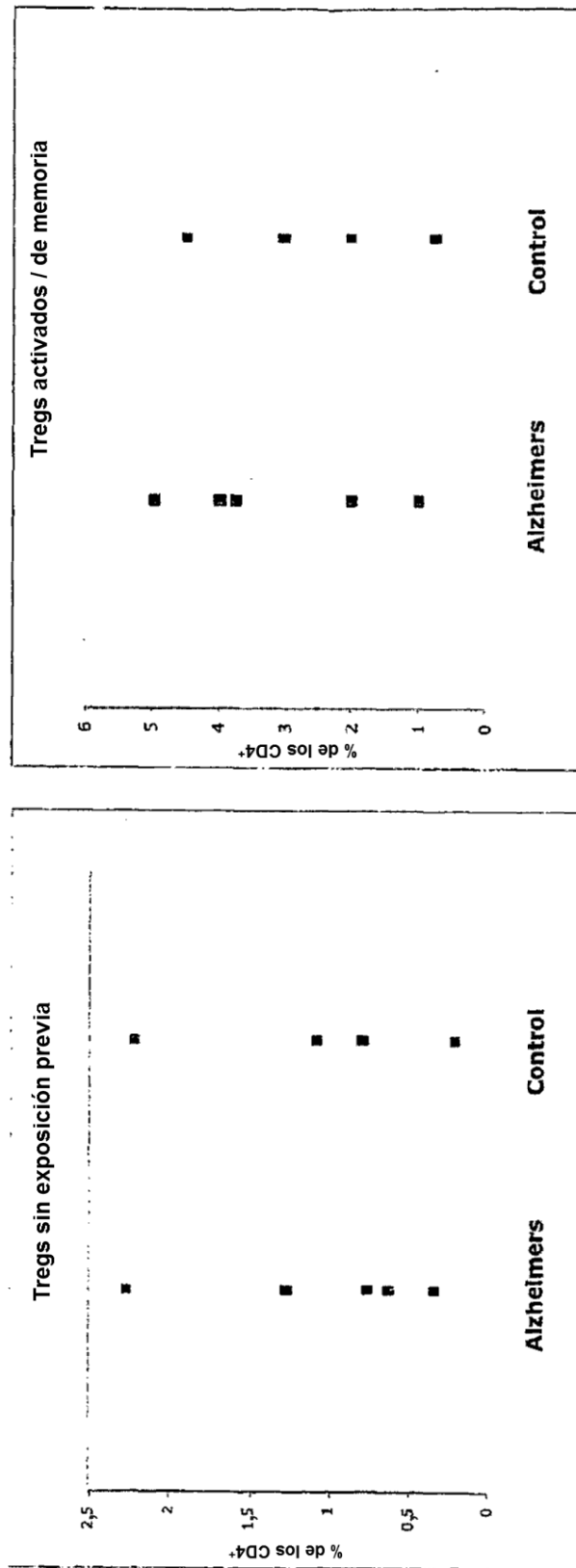


Figura 18

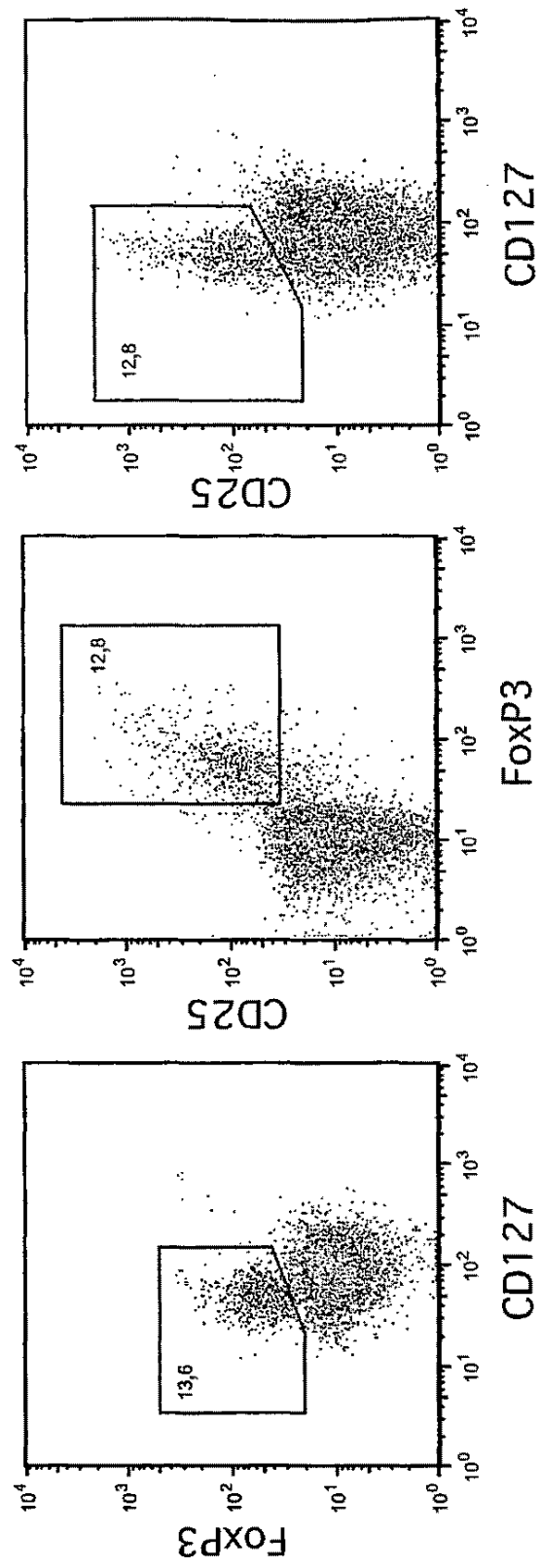


Figura 19

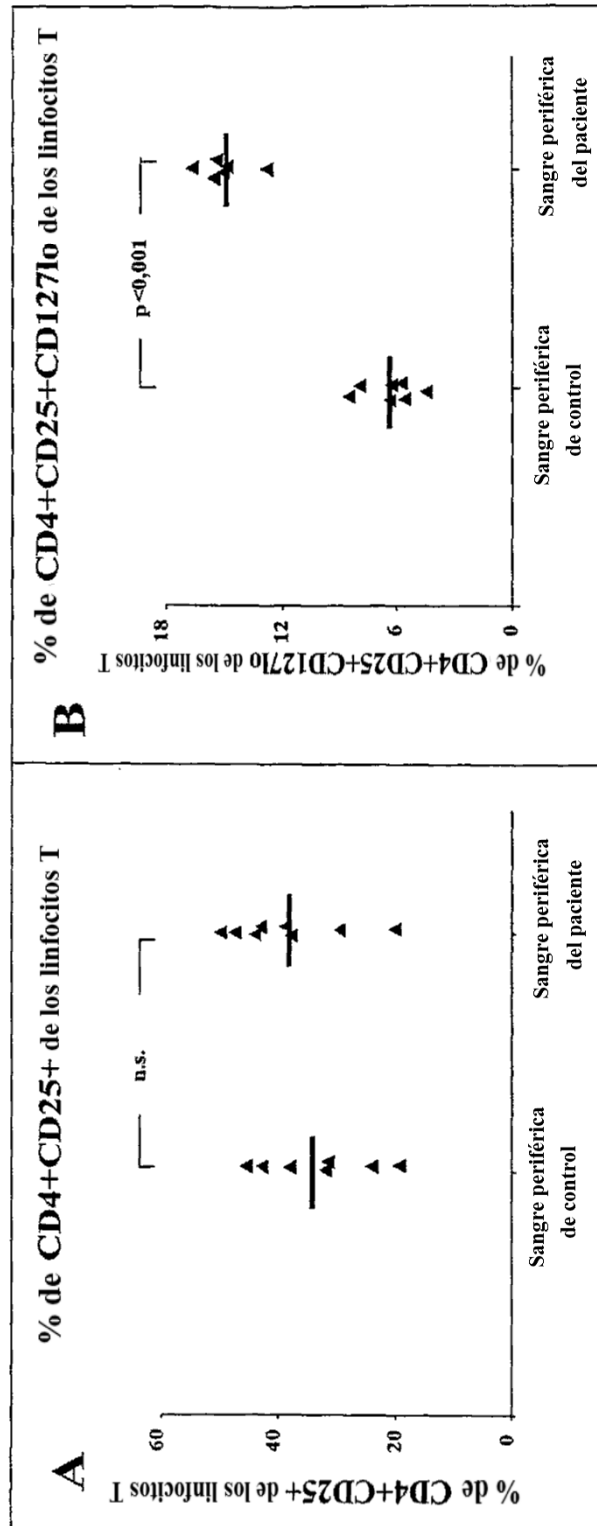


Figura 20

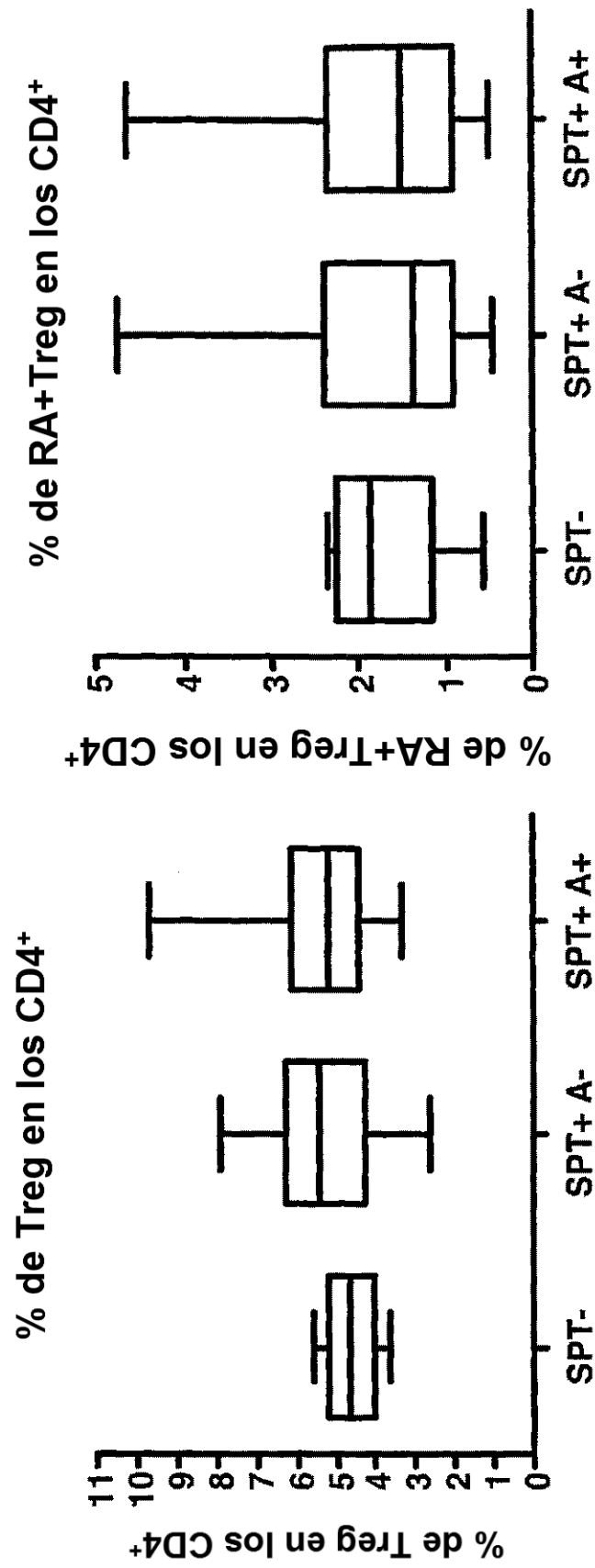


Figura 21

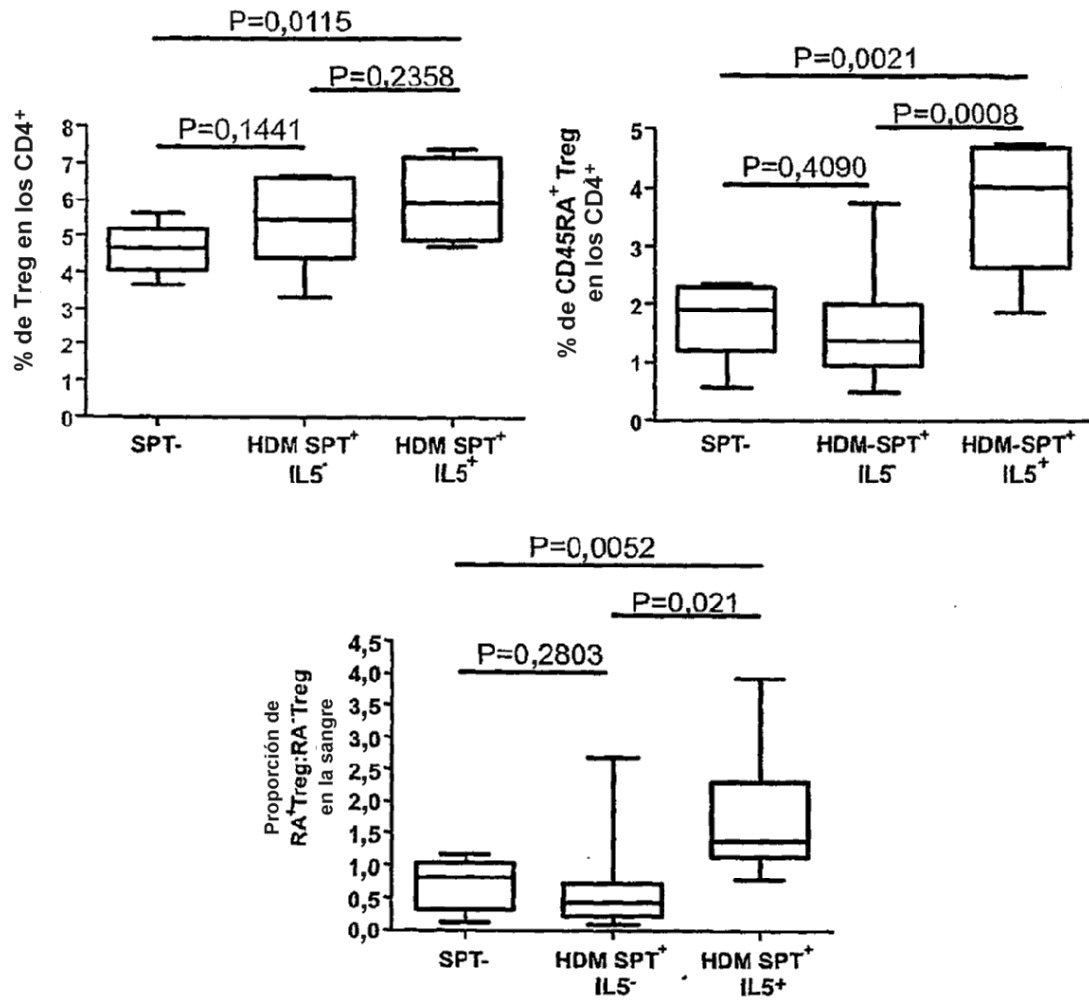


Figura 22

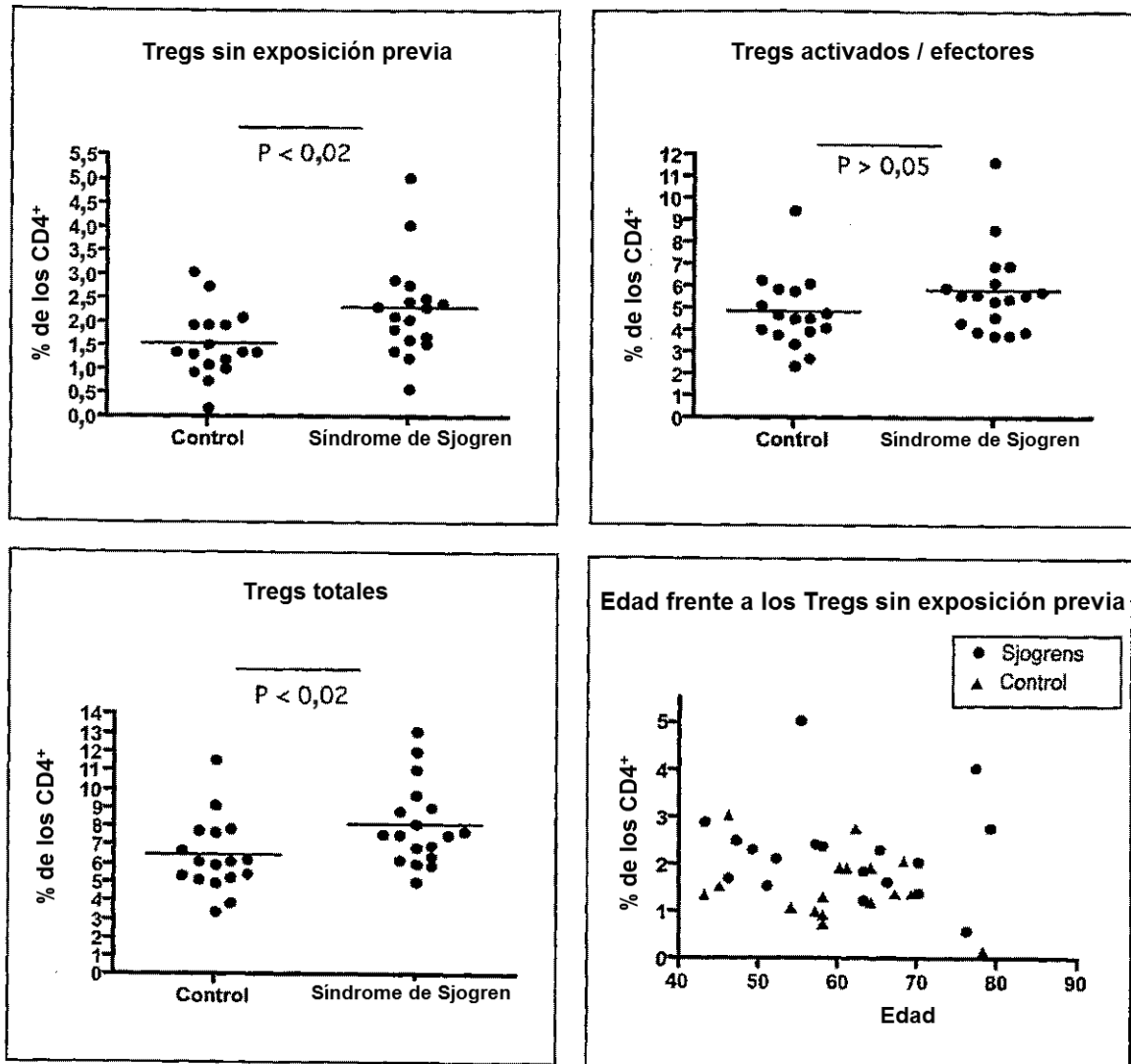


Figura 23

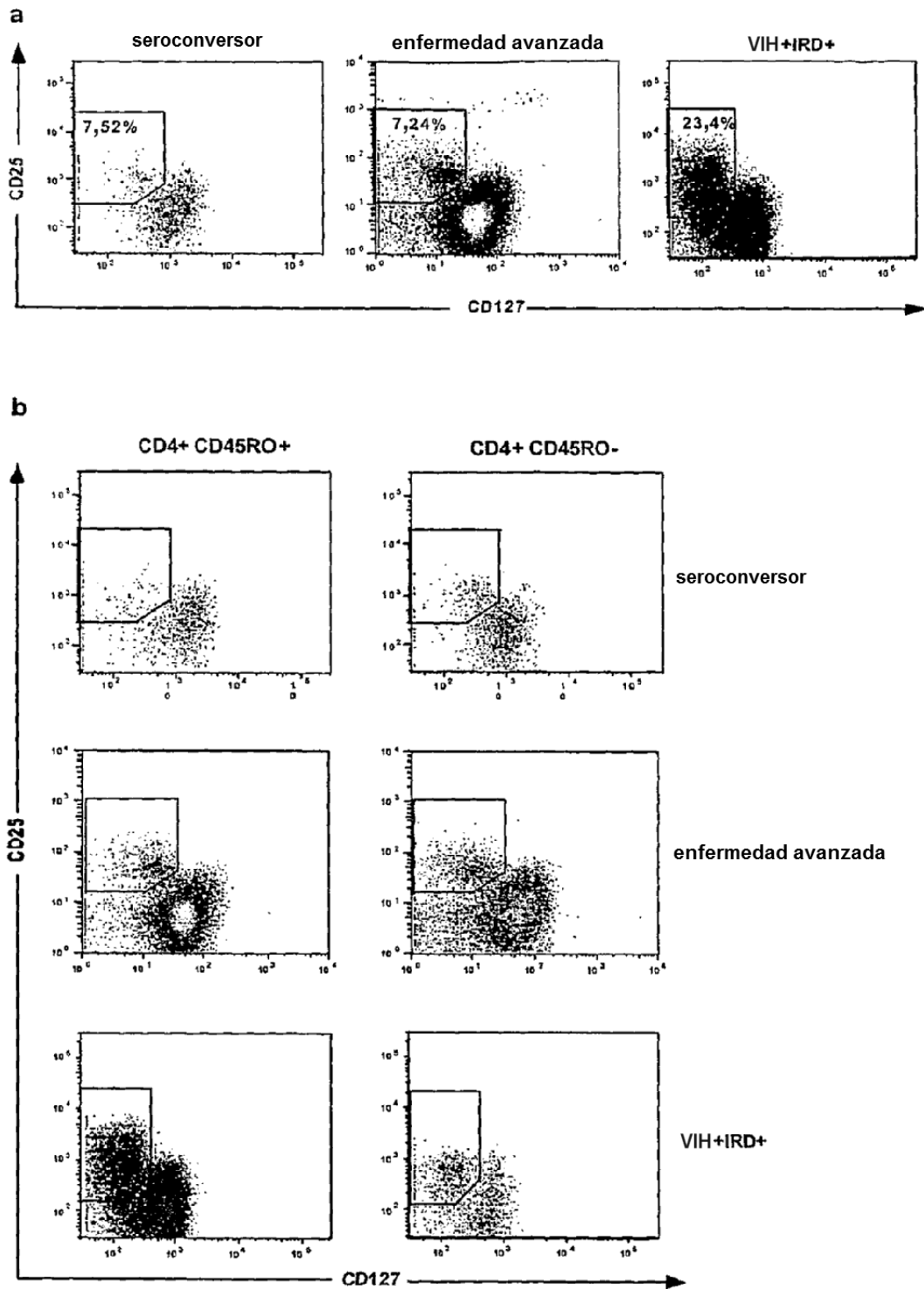


Figura 24

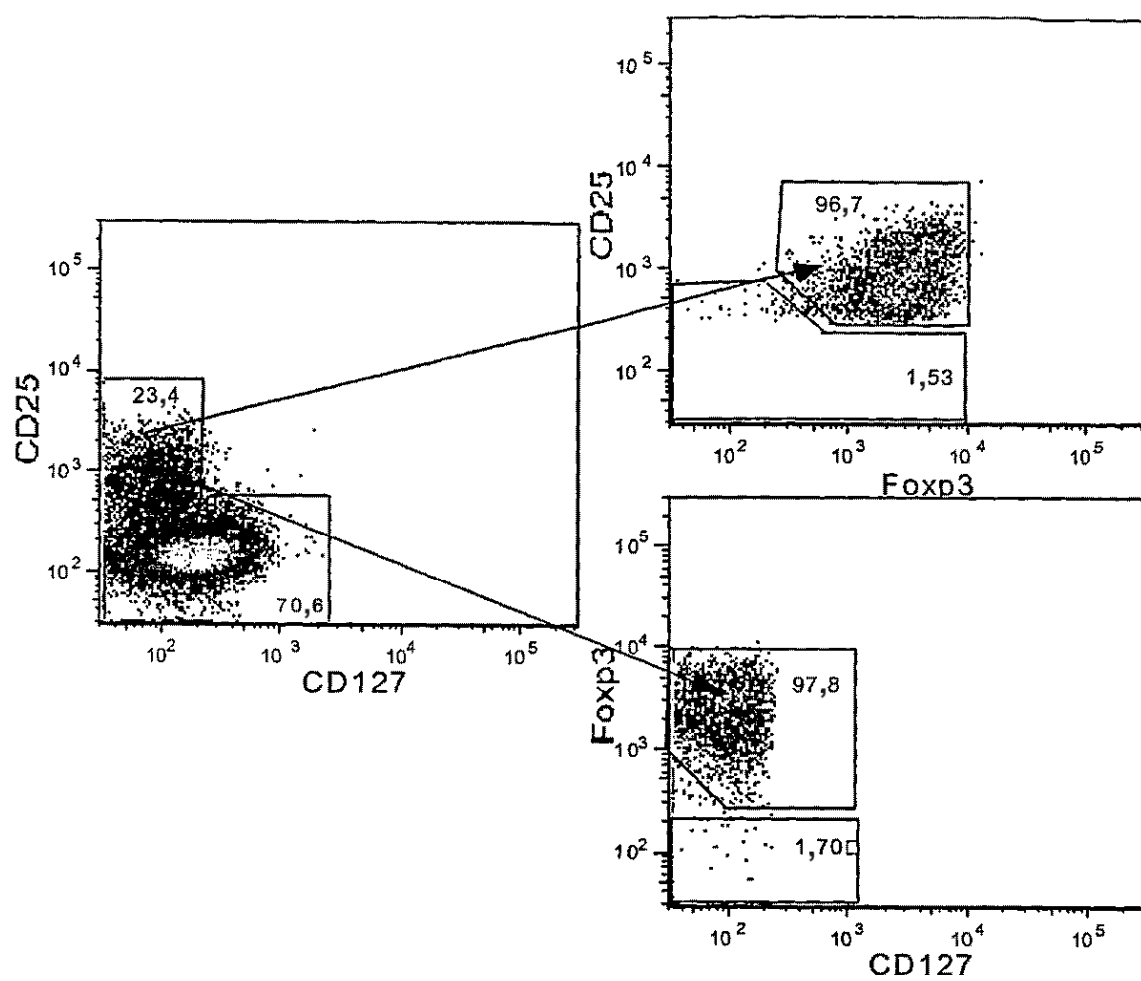


Figura 25

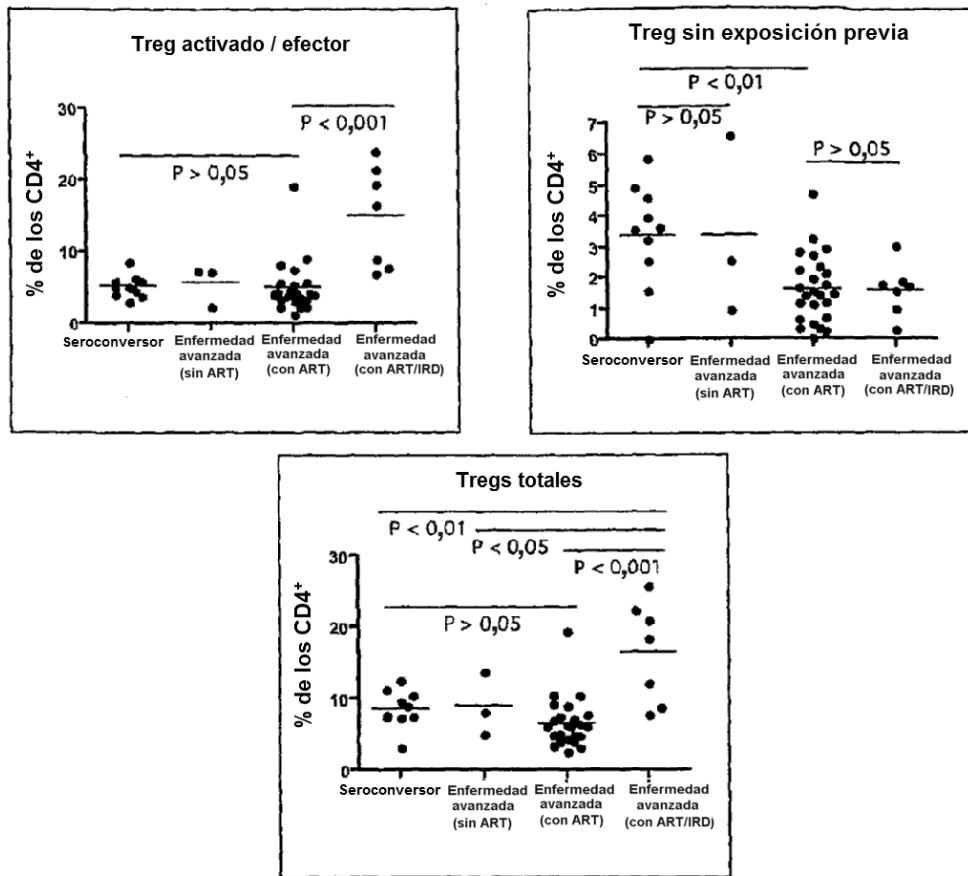


Figura 26

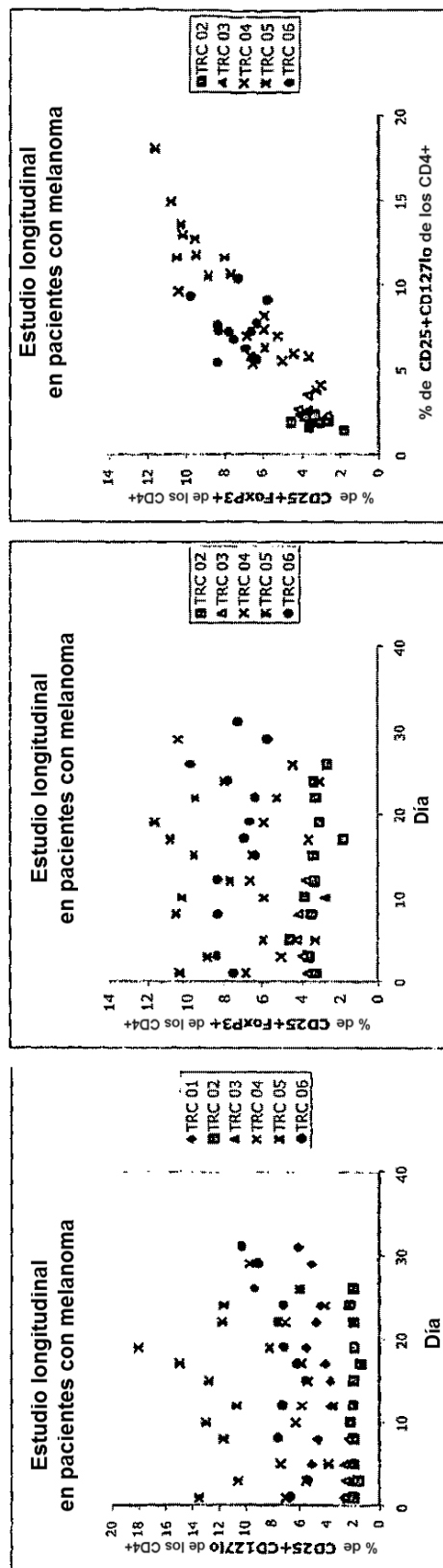


Figura 27

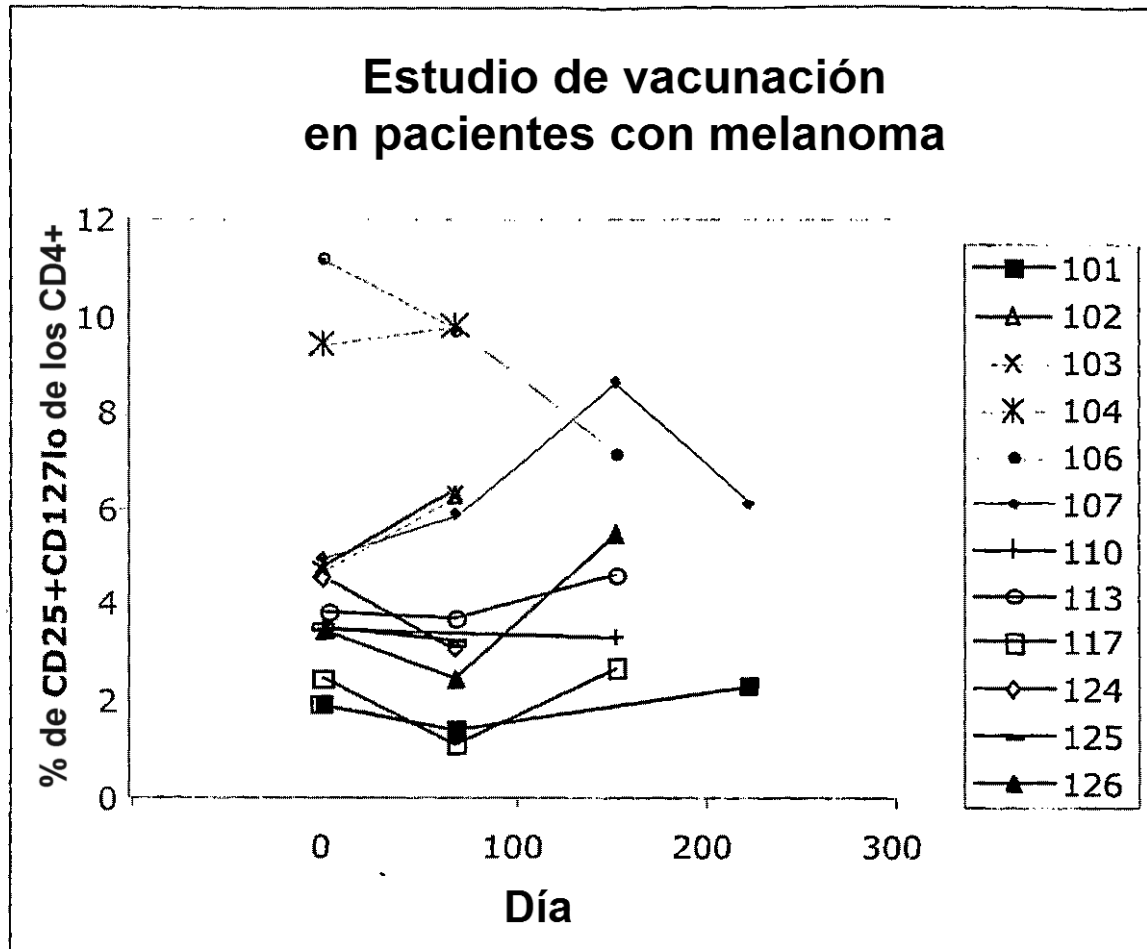


Figura 28

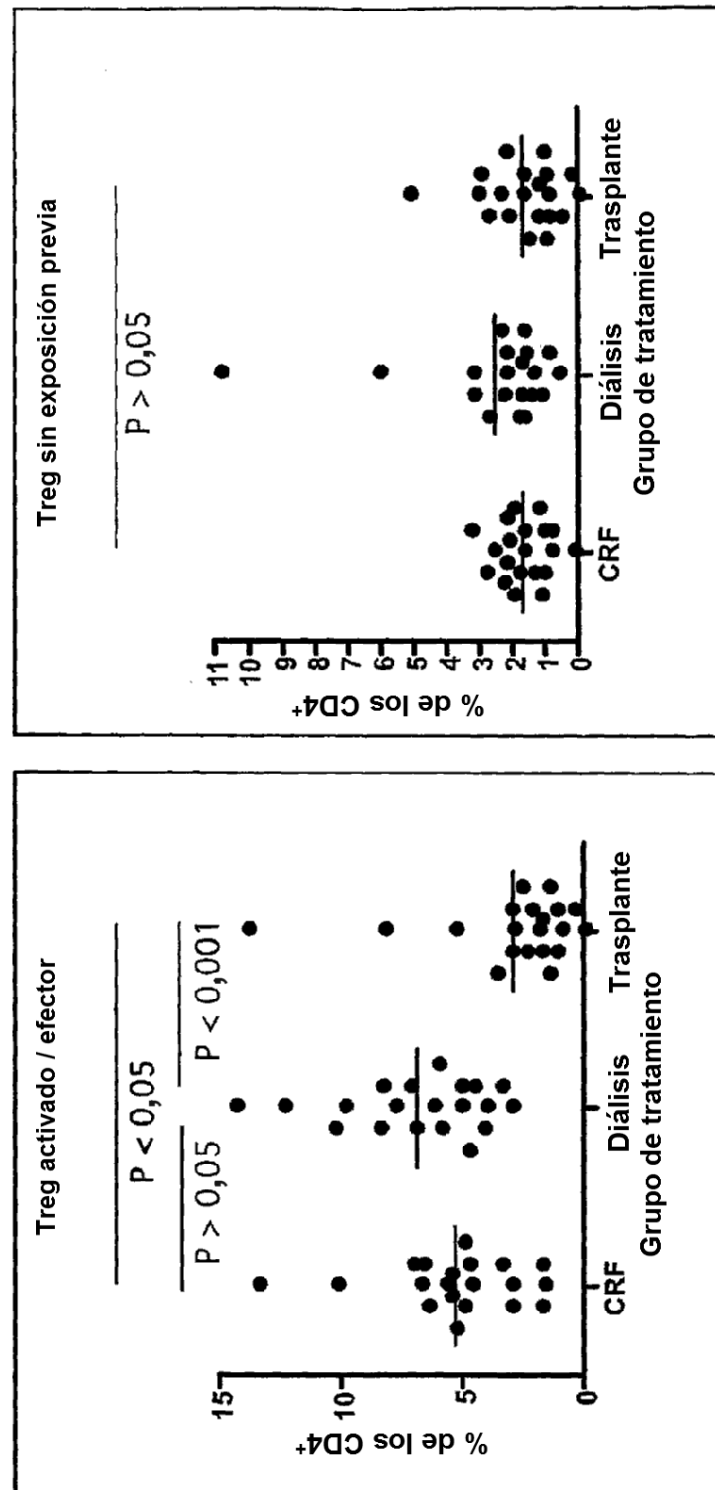


Figura 29

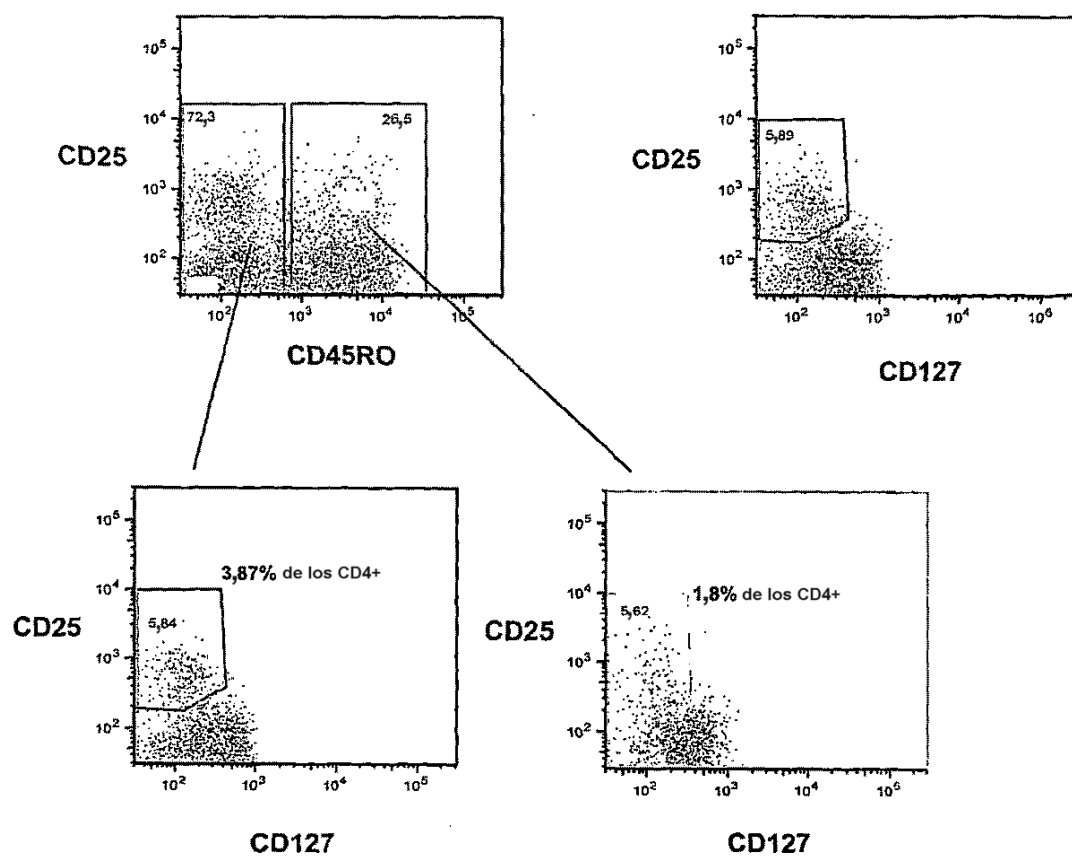


Figura 30

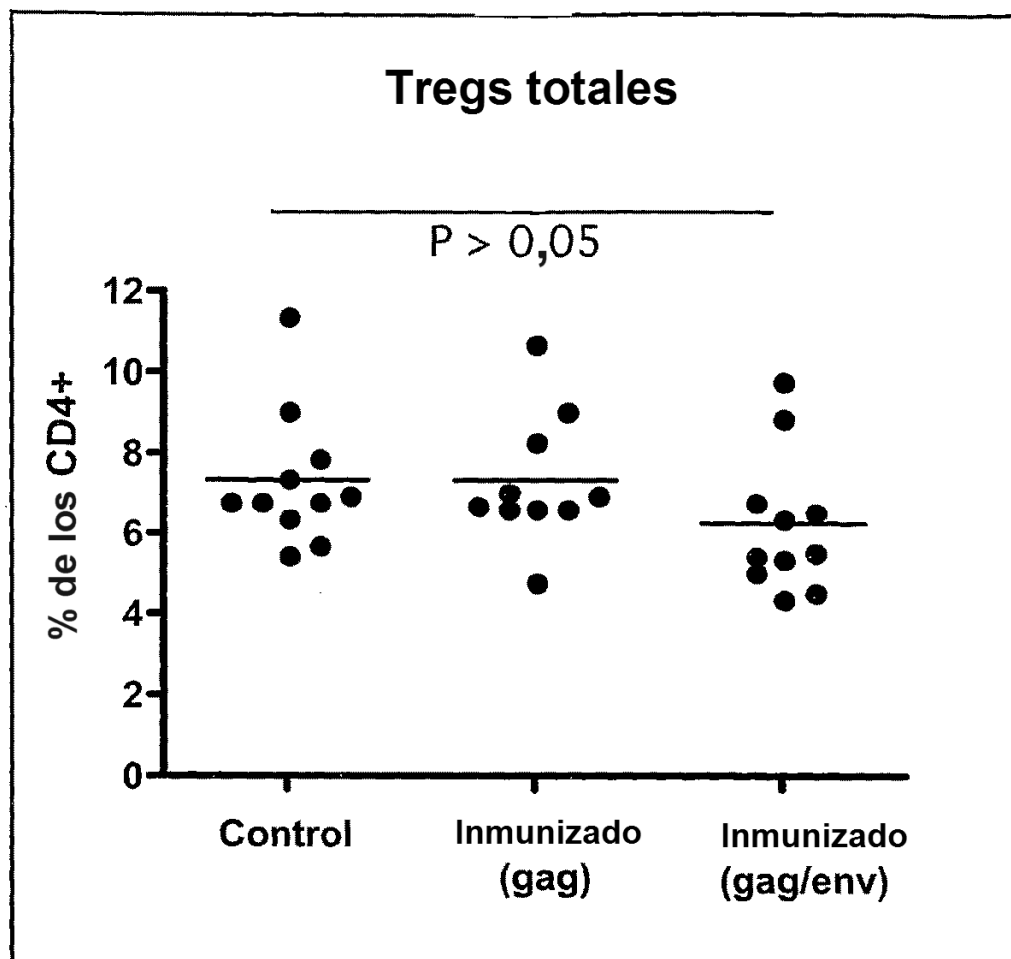


Figura 31