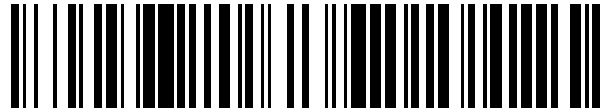


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 789**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2005** **E 05813998 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 1796474**

54 Título: **Métodos para el aislamiento y la expansión de células T reguladoras derivadas de sangre de cordón**

30 Prioridad:

15.09.2004 US 609916 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER 3160
CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**GODFREY, WAYNE R. y
JUNE, CARL**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 564 789 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para el aislamiento y la expansión de células T reguladoras derivadas de sangre de cordón

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para proporcionar células T reguladoras (T_{reg}) aisladas de sangre de cordón humana.

Antecedentes de la invención

Las células T reguladoras (T_{reg}) CD4⁺CD25⁺ que surgen de manera natural pueden restringir o alterar la mayoría de los tipos de respuestas inmunitarias (Sakaguchi, 2004, Annu. Rev. Immunol., 22: 531-562). Inicialmente, se describió que las células T_{reg} eran críticas para el control de la autoinmunidad (Sakaguchi, *et al*, 1995, J. Immunol, 155: 1151-1164; Shevach, 2000, Annu. Rev. Immunol., 18: 423-449), y se encontró que en la transferencia adoptiva prevenían enfermedades autoinmunitarias experimentales. Más recientemente, se ha mostrado que las T_{reg} suprimen respuestas inmunitarias alogénicas y pueden prevenir el rechazo de trasplantes (Hall, *et al.*, 1998, J. Immunol., 161: 5147-5156; Wood, *et al*, 2003, Nat. Rev. Immunol, 3: 199-210). Además, estas células pueden limitar las respuestas inmunitarias antitumorales (Peng L, *et al*, 2002, J. Immunol, 169: 4811-4821; Gallimore, *et al*, 2002, Immunology, 107: 5-9) y antimicrobianas (Belkaid Y, *et al*, 2002, Nature, 420: 502-507). Por tanto, las T_{reg} CD4⁺CD25⁺ parecen ser elementos de control centrales de la inmunorregulación, y la comprensión de su biología es importante a la hora de realizar esfuerzos dirigidos a manipular terapéuticamente las respuestas inmunitarias.

Las células T_{reg} están mejor caracterizadas en ratones donde constituyen el 5-10% de las poblaciones de células T CD4⁺ de ganglios linfáticos y bazo. Se generan tanto a través de mecanismos de desarrollo tímicos centrales en ratones libres de patógenos, como mediante mecanismos de generación o expansión periféricos escasamente definidos (Apostolou, *et al*, 2002, Nat. Immunol, 3: 756-763; Shevach *et al*, 2002, Nat. Rev. Immunol, 2: 389-400). Hasta la fecha, las células T_{reg} se han definido principalmente mediante la coexpresión de antígenos CD4⁺ y CD25⁺ en aislamiento nuevo. CD25 así como otros marcadores de T_{reg} murinas, CTLA4 (CD 152) y GITR (receptor de tipo TNF inducido por glucocorticoides), son todos ellos antígenos de activación en células T convencionales, y por tanto no son específicos. FoxP3, una proteína nuclear que se piensa que funciona como represor de la transcripción, es un marcador más nuevo que se considera que es más específico para las células T_{reg} (Ramsdell, *et al*, 2003, Curr. Opin. Immunol, 15: 718-24). Se demostró que tras la activación (basada en receptor de células T, específico de antígeno o anti-CD3), las células T_{reg} no podían suprimir específicamente la proliferación de las células T tanto CD4⁺ como CD8⁺. El mecanismo de supresión no está claro, e *in vitro*, parece requerir un contacto célula-célula. Un resultado funcional de la supresión es la producción afectada de IL-2 (Thornton, *et al*, 1998, J. Exp. Med., 188: 287-296; Shevach, *et al*, 2001, Immunol. Rev., 182: 58-67). *In vivo*, el mecanismo de supresión es más controvertido demostrando algunos estudios la dependencia de citocinas inmunosupresoras (Asseman, *et al.*, 1999, J. Exp. Med., 190: 995-1004), que no se requieren para la supresión *in vitro*.

Estudios en modelos de ratón de trasplante de médula ósea (BMT) han mostrado que las células CD4⁺CD25⁺ nuevas o expandidas en cultivo pueden retrasar o prevenir la enfermedad (Taylor *et al*, 2002, Blood, 99: 3493-3499, Hoffmann, *et al*, 2002, J. Exp. Med., 196: 389-399; Cohen, *et al*, 2002, J. Exp. Med., 196: 401-406). Estudios anteriores han demostrado que las T_{reg} expandidas de manera policlonal *ex vivo* durante 10 días con anticuerpo anti-CD3 más IL-2, pueden ser eficaces en la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD; Taylor, *et al*, 2002, Blood, 99: 3493-3499). La expansión *ex vivo* de células T_{reg} con APC alogénicas irradiadas más IL-2 exógena también es eficaz para suprimir la GVHD (Cohen, *et al*, 2002, J. Exp. Med., 196: 401-406). En algunos sistemas modelo, las células T_{reg} pueden prevenir la GVHD y todavía permitir los efectos de injerto contra leucemia (GVL) (Edinger, *et al*, 2003, Nat. Med., 9: 1144-1150; Jones, *et al*, 2003, Biol. Blood Marrow Transplant, 9: 243-56; Trenado, *et al*, 2003, J. Clin. Invest., 112: 1688-96). Además, estudios en modelos de enfermedad autoinmunitaria de ratón han demostrado que las células CD4⁺CD25⁺ específicas de antígeno (TCR transgénico) expandidas en cultivo pueden prevenir o incluso tratar la diabetes (Tang, *et al*, 2004, J. Exp. Med., 199: 1455-1465). Por consiguiente, las células T_{reg} desempeñan un papel en la terapia de inmunosupresión clínica en trasplante, ya que las células T_{reg} humanas pueden aislarse y expandirse en cultivo para generar un número suficiente para su infusión *in vivo*.

Aunque los datos en ratones son muy prometedores, todavía sigue existiendo el problema práctico de aislar células T_{reg} puras de sangre humana. En ratones jóvenes, las células CD4⁺CD25⁺ son moderadamente abundantes y el subconjunto CD25⁺ es fácilmente evidente. En seres humanos, las células CD25⁺ no están tan diferenciadas de una población, ya que existen una población grande y solapante de células atenuadas para CD25. Es posible que la copurificación de células T convencionales con T_{reg} sea la base para la actividad supresora moderada o variable observada en estudios de células CD4⁺CD25⁺ humanas (Baecher-Allan, *et al*, 2004, Semin. Immunol., 16: 89-98). Se ha notificado que la clasificación celular por FACS del 1,7% máximo de las células que expresan CD25⁺ (células CD25^{alto}) permite el aislamiento de células supresoras (Baecher-Allan, *et al*, 2001, J. Immunol., 167: 1245-1253). Se requirió un enfoque basado en perlas magnéticas riguroso para aislar poblaciones de células T_{reg} derivadas de sangre de adulto suficientemente puras como para que células CD4⁺CD25⁺ generen líneas celulares supresoras potentes. Aún así, sólo pudieron generarse líneas celulares fuertemente supresoras en un subconjunto

(aproximadamente en un tercio) de donantes, y la potencia se correlacionaba con la pureza de la línea celular (Godfrey, *et al.*, 2004, Blood, 104: 453-461). Se ha notificado que la clasificación por FACS de células CD25^{alto} (el 2,1% superior) permite la generación de una línea celular supresora más constante a partir de sangre de adulto (Hoffmann, *et al.*, 2004, Blood. 104: 895-903).

- 5 La purificación de células T_{reg} a partir de sangre de adulto es posible, pero difícil. Los intentos anteriores usando purificación mediante clasificación celular activada por magnetismo (MACS) para aislar células T_{reg} de sangre de adulto que sean suficientemente puras para una actividad supresora constante han dado como resultado variabilidad en la función celular. Esta variabilidad se debe en gran medida a la presencia de células de memoria atenuadas para CD25 que se solapan con las células T_{reg}. El uso de un clasificador celular ha facilitado el aislamiento de células T_{reg} (Baecher-Allan, *et al.*, 2001, J. Immunol, 167: 1245-1253), y ha permitido la generación de líneas celulares supresoras a partir de sangre de adulto (Hoffmann, *et al.*, 2004, Blood, 104: 895-903). Sin embargo, en un informe se encontró que poblaciones incluso clasificadas de células CD25⁺ derivadas de sangre de adulto (el 2,9% superior) contenían una mezcla de células T convencionales y reguladoras en análisis de clonación y funcional (Levings, *et al.*, 2002, J. Exp. Med., 196: 1335-1346).
- 10
- 15 Aproximadamente el 20% de las células de sangre de adulto CD4⁺CD25⁺ expresan CD45RA. No se espera que este antígeno se exprese en células supresoras, ya que se ha descrito en varios informes que son positivas para CD45RO (generalmente expresión mutuamente exclusiva, excepto de manera transitoria durante la activación de células indiferenciadas). Sin embargo, el aislamiento de estas células resultó mucho mejor que el de las células CD45RA⁺ para generar líneas celulares supresoras (se encontró que 12/12 líneas celulares aisladas mediante este método eran supresoras potentes). En células T indiferenciadas, la variante de corte y empalme de CD45RA se expresa sobre la superficie de las células T. Una vez que una célula T se diferencia para dar una célula de memoria, habitualmente expresa la isoforma CD45RO (publicación estadounidense n.º 20050196386).
- 20

Se ha mostrado previamente que la sangre de cordón contiene células CD4⁺CD25⁺ mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Paganelli, *et al.*, 1994, Cell Immunol, 155: 486-489; Ng, *et al.*, 2001, Blood 98: 2736-2744; Wing, *et al.*, 2002, Immunology 106: 190-199). Sin embargo, se han notificado pocos datos sobre la función de estas células. Un informe ha deducido la función suprimida basándose en el análisis de frecuencia de LDA (Ng, *et al.*, 2001, Blood 98: 2736-2744). El único informe que evaluó la actividad funcional de células CD4⁺CD25⁺ recién aisladas, no reveló supresión de respuestas específicas de antígeno. Además, no hubo reactividad específica de antígeno aumentada de células CD4⁺ tras la depleción de células CD25⁺. Sin embargo, se observó una supresión moderada en ensayos de cocultivo de células T basados en anticuerpos anti-CD3, (el 60% a una razón de célula respondedora/supresora de 1/1) (Wing, *et al.*, 2003, Eur. J. Immunol, 33: 579-587). Por tanto, los estudios anteriores indicaron que la mayoría de las células CD25⁺ derivadas de sangre de cordón todavía no eran suficientemente maduras como para ser supresoras (Wing K, *et al.*, 2003, Eur. J. Immunol. 33: 579-587).

25

30

Por consiguiente, hasta la presente invención, se reconocían las propiedades y los beneficios de las células T_{reg}, pero se desconocía el método para aislar y generar un número suficiente de células supresoras potentes. Por tanto, existía una necesidad reconocida de métodos para aislar y expandir células T_{reg}. La presente invención satisface esta necesidad.

35

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para proporcionar células T reguladoras a partir de una población de células sanguíneas con fenotipo CD45RA⁺, en el que las células T_{reg} suprimen la proliferación de células T. El método de la presente invención comprende aislar una población de células mononucleares de una muestra de sangre de cordón umbilical humana, poner en contacto la población de células mononucleares con un anticuerpo que se une específicamente a CD25 en condiciones adecuadas para la formación de un complejo célula mononuclear-anticuerpo, y separar sustancialmente el complejo célula mononuclear-anticuerpo de dicha población de células mononucleares, aislando de ese modo una célula T reguladora de una población de células sanguíneas con fenotipo CD45RA⁺. El método comprende además cultivar la célula T reguladora sin células alimentadoras en un medio que comprende un anticuerpo frente a CD3 y un anticuerpo frente a CD28 y comprende además IL-2. En una realización de la invención, la población de células sanguíneas con fenotipo CD45RA⁺ procede de sangre de cordón umbilical, preferiblemente de una muestra de cordón umbilical humano.

40

45

Breve descripción de las figuras

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderán mejor cuando se lean conjuntamente con los dibujos adjuntos. Para el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos determinadas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las realizaciones representadas en los dibujos. Todas las barras de error representan una desviación estándar por encima y por debajo de la media.

50

55

La figura 1, que comprende las figuras IA a ID, es una serie de imágenes que representan análisis de FACS para la expresión de CD45RA y CD45RO y purificaciones óptimas de células CD45RA⁺ y CD45RO⁺.

La figura 2 es una imagen que representa que las células CD45RA⁺ no expresan CD25 ni siquiera a los niveles más

altos, y que las células brillantes para CD25 no expresan de manera detectable CD45RA.

La figura 3, que comprende las figuras 3A y 3B, es una serie de imágenes que representan la actividad supresora potente en células CD45RA⁺ medida mediante una reacción mixta de linfocitos.

5 La figura 4, que comprende las figuras 4A a 4D, es una serie de imágenes que representan que las células CD45RA son negativas para CTLA-4 (figura 4A) y HLA-DR (figura 4B). Las células brillantes para CD25⁺ son HLA-DR⁺ (figura 4C) y se tiñen de manera doble para CTLA-4 intracelular, representando por tanto dos subconjuntos de células distintos.

10 La figura 5 es un gráfico que representa la actividad supresora de las células CD45RA⁺ (RA+), las células HLA-DR⁺ (DR+) y las células dobles negativas (DN). La actividad supresora más potente es evidente en las células CD45RA⁺, la potencia media en las células dobles negativas y la menor potencia en las células HLA-DR⁺.

15 La figura 6, que comprende las figuras 6A a 6D, es una serie de imágenes que representan que las células de sangre de cordón CD4⁺CD25⁺ son una población distinta. La figura 6 comprende diagramas de FACS representativos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células mononucleares de sangre de cordón (CBMC) y células CD4⁺CD25⁺ purificadas de ambas fuentes. La figura 6 es representativa de 10 donantes y 10 experimentos de purificación celular. La figura 6A representa distintas poblaciones de células CD4⁺ y CD25⁺ en sangre de cordón con una amplia separación de células CD25⁺ de células CD25⁻. La figura 6B es una imagen que representa que las células CD4⁺CD25⁺ constituyen el 1-2% de las PBMC, y que un gran número de estas células están atenuadas para CD25 (flecha). La figura 6C es una imagen que representa que las células CD25⁺ purificadas a partir de sangre de cordón mediante microperlas anti-CD25 constituyen una población más pura. La figura 6D es una imagen que representa células CD25⁺ purificadas a partir de sangre de adulto mediante microperlas anti-CD25 directas.

20 La figura 7 es una imagen que representa que las células CD25⁺ de sangre de cordón son CD45RA⁺ y que muestra que las células CD25⁺ purificadas de sangre de cordón son predominantemente CD45RA⁺.

25 La figura 8, que comprende las figuras 8A a 8D, es una serie de imágenes que demuestran que las células CD4⁺CD25⁺ derivadas de sangre de cordón en cultivo suprimen marcadamente una reacción mixta de linfocitos (MLR) medido mediante inhibición de la proliferación. La figura 8A es un gráfico que representa las curvas cinéticas de proliferación a lo largo de una MLR de una semana. Las células derivadas de sangre de cordón bloquean esencialmente MLR (●), las líneas celulares de adulto seleccionadas directamente mediante MACS tienen una función supresora débil (D) y las células de adulto seleccionadas de manera rigurosa (linaje CD25⁺⁺) tienen potencia moderada (■). Las células CD25⁻ no son supresoras (*).

30 La figura 8A es representativa de 10 experimentos. La figura 8B es un diagrama de dispersión que demuestra la uniformidad de la supresión en el día 6 de MLR de líneas celulares derivadas de sangre de cordón (●), frente a líneas celulares de adulto mediante MACS directa (□), o líneas de adulto purificadas de manera rigurosa (linaje-CD25⁺⁺) (■). La figura 8C es un gráfico que representa números graduados de células T_{reg} cultivadas añadidas a una reacción de MLR para determinar el número mínimo necesario para lograr una inhibición potente. Hasta una dilución de 1:32 (aproximadamente 1.560 supresores/50.000 respondedores) afectó marcadamente a MLR cuando se usaron líneas celulares supresoras derivadas de sangre de cordón (●), frente a 1:16 para un subconjunto potente seleccionado de líneas de adulto purificadas de manera rigurosa (linaje- pCD25⁺⁺) (Δ). Se representan dos líneas de cada una, representativas de 6 líneas celulares supresoras derivadas de sangre de cordón y de adulto. La figura 8D es un gráfico que representa la maduración de células dendríticas (DC) antes de la MLR, mediante combinación con lipopolisacárido (LPS) o TNF/polilC. La inclusión de estos factores estimulantes en MLR no evita la supresión. La figura 8D es representativa de 3 experimentos.

35 La figura 9, que comprende las figuras 9A a 9B, es una serie de imágenes que demuestran que las células CD4⁺CD25⁺ cultivadas suprimen marcadamente la acumulación de citocinas en MLR, tal como se analiza mediante la evaluación de los niveles de citocinas. La figura 9A es un gráfico que representa una afectación en la acumulación de citocinas producidas por células T activadas, específicamente se observa IL-2, IFN-gamma, GM-CSF, TNF-alfa, IL-5 e IL-10. No puede detectarse alteración en la acumulación de TGF-beta 1. La figura 9A representa los niveles de IL-2 en el día 2, y de otras citocinas en el día 6, los tiempos respectivos de máximo de acumulación en cultivos de MLR control. La figura 9B es un gráfico que representa la alteración mínima de los niveles de quimioquinas en puntos de tiempo tempranos (día 2), y las disminuciones moderadas en los niveles en puntos de tiempo tardíos (día 7) para RANTES, IL-8 y MIP-1a. La figura 9 es representativa de 4 experimentos de MLR.

40 La figura 10, que comprende las figuras 10A y 10B, es una imagen que representa diagramas representativos de una comparación de citometría de flujo de líneas celulares derivadas de CD25⁺, CD25⁻ y CD25 tras 3-4 semanas de expansión en cultivo. La figura 10A es una imagen que demuestra que la expresión de CD25 y CTLA4 intracelular sigue siendo alta en células T de sangre de cordón, que la expresión es inferior en células T derivadas de adulto y que la expresión vuelve en gran medida al nivel inicial para las líneas celulares derivadas de CD25. La figura 10B es una imagen que representa que la expresión de CD62L y CD27 permanece de manera uniformemente alta en líneas de células T de sangre de cordón, también en un subconjunto de las líneas de adulto, y que disminuye en las líneas

celulares derivadas de CD25. La figura 10 es representativa de 10 líneas celulares analizadas cada una a las 4 semanas de cultivo.

La figura 11, que comprende las figuras 11A y 11B, es una imagen que representa la expresión de proteína y ARNm de FoxP3. La figura 11A es un gráfico que representa los niveles de ARNm de FoxP3 evaluados mediante un análisis de PCR en tiempo real. Las muestras son células recién aisladas (CD25 nuevo), líneas celulares tras 4 semanas de cultivo (Cx CD25) y líneas celulares cultivadas 4 semanas 24 horas tras la reestimulación con perlas anti-CD3/CD28 (CD25 reestim.), tal como se indica. Los datos se representan como comparación en veces con los niveles de ARNm presentes en células T CD8⁺ (CD8) recién aisladas. La figura 11B es una serie de imágenes de una análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de proteína FoxP3 en células cultivadas durante 4 semanas y reestimuladas con perlas anti-CD3/CD28 durante el tiempo indicado. Se usó histona H3 como control de carga para proteínas nucleares. La figura 11 es representativa de 4 experimentos independientes.

La figura 12, que comprende las figuras 12A a 12D, es una serie de imágenes que representan defectos de producción de citocinas y expresión de LAP en la superficie celular 48 horas tras la reestimulación de líneas supresoras. La figura 12A es un gráfico que representa líneas celulares reactivadas con perlas anti-CD3/CD28. La figura 12B es un gráfico que representa células CD25⁻ y CD25⁺ reactivadas con PMA/ionomicina. La figura 12C es una imagen que representa la expresión de CD69, OX40 (CD 134) y GITR intacto. La figura 12D es una imagen que representa que la expresión de LAP en la superficie celular es específica para las líneas celulares derivadas de CD25⁺. Las líneas celulares en reposo fueron negativas para estos antígenos de activación antes de la reestimulación.

La figura 13, que comprende las figuras 13A a 13D, es una serie de imágenes que representan un examen de múltiples anticuerpos neutralizantes y proteínas de fusión para determinar los efectos funcionales sobre la supresión de una MLR de células T CD4⁺-DC. La figura 13A es un gráfico que representa que anticuerpos frente a los factores inmunosupresores IL-10 y TGF beta, así como anticuerpos anti-IL10R, o combinaciones de los tres, no revierten la supresión mediada por líneas de células T_{reg} en cultivo. La figura 13B es un gráfico que representa que anticuerpos frente a moléculas de señalización negativas, CTLA4 y PDI, no revierten la supresión. La figura 13C es una imagen que representa la falta de supresión de anticuerpos frente a GITR o GITR-L. Los anticuerpos agonistas frente a OX40 revierten parcialmente la supresión mientras que los anticuerpos frente a OX40L potencian parcialmente la supresión. La figura 13D es un gráfico que representa que los múltiples anticuerpos neutralizantes frente a TGF y receptores solubles no impiden la función efectora de las células supresoras. Las figuras 13A a C son representativas de 6 experimentos independientes, la figura 13D es representativa de 3 experimentos independientes.

Descripción detallada de determinadas realizaciones de la invención

La presente invención engloba un método para el aislamiento y la expansión de una población potenciada de células T reguladoras (T_{reg}) que tienen el fenotipo CD45RA⁺. El término "potenciado", tal como se usa en el presente documento se refiere a al menos el 20% más, preferiblemente el 30%, preferiblemente el 40%, incluso más preferiblemente el 50%, incluso de manera más preferible aproximadamente el 60%, incluso más preferiblemente el 60%, incluso más preferiblemente el 70%, incluso más preferiblemente el 80%, incluso más preferiblemente el 90%, e incluso más preferiblemente el 100% más que un objeto que no está potenciado. Como ejemplo, una población potenciada de células reguladoras tiene al menos el 20% más de células reguladoras que una población que no está potenciada. Se encontró que la fuente preferida de tales células era sangre de cordón umbilical humana. Los métodos para producir un gran número de células T_{reg} supresoras potentes activas de otras fuentes, tales como sangre humana de adulto, han quedado frustrados por la presencia de células T de memoria que expresan CD25 a niveles de bajos a moderados (células atenuadas para CD25), y células T activadas convencionales (CD25⁺) que interfieren con la purificación de células T_{reg}. El término "T_{reg}" se usa en el presente documento para referirse a una célula T reguladora que expresa tanto CD4 (CD4⁺) como CD25 (CD25⁺). Sin embargo, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, ambos tipos de células T (de memoria y activadas) no están presentes generalmente, o lo están en un número bajo, en sangre de cordón umbilical. Esto se debe, tal como se da a conocer en el presente documento, a que las células de sangre de cordón se desarrollan en un entorno protegido y están inmunológicamente indiferenciadas. Por tanto, la presente invención demuestra que las células T_{reg} CD25⁺ en sangre de cordón umbilical se purifican más fácilmente que las derivadas de otras fuentes, tales como sangre periférica de adulto humano.

Una célula que es "CD25⁺" o que "expresa CD25" se compara en el presente documento con una célula que es CD25⁻ o que no expresa un nivel detectable de CD25. Una célula que está "atenuada para CD25", tal como se usa en el presente documento tiene un nivel detectable inferior de expresión de CD25 que una célula CD25⁺ o una célula "brillante para CD25". Además, el cultivo y la multiplicación de estas células se facilitan y se simplifican porque no son necesarias células alimentadoras para expandir las poblaciones de células T_{reg}. Las células T_{reg} son críticas para tolerancia de autoinjerto y aloinjerto en ratones. Los estudios de T_{reg} humanas se han visto dificultados por el bajo número presente en sangre periférica y por la difícil purificación. Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que la sangre de cordón es una fuente superior para el aislamiento de T_{reg} y la generación de líneas celulares en comparación con la sangre de adulto. Se purificaron células CD4⁺CD25⁺ de sangre de cordón y se generaron líneas celulares que mostraban de manera constante actividad supresora potente, con una supresión

de MLR alogénica >95% (29/30 donantes). Las células T_{reg} cultivadas bloquearon la acumulación de citocinas en MLR, con inhibición de la producción de quimiocinas. Estas líneas celulares expresaron de manera uniforme CD25, CD62L, CCR7, CD27 y CTLA4 intracelular. Además, se expresó específicamente la proteína FoxP3, pero no el ARNm. Tras la reestimulación con perlas anti-CD3/CD28, las células T_{reg} cultivadas produjeron citocinas mínimas (IL-2, IFN-gamma e IL-10), y expresaron preferiblemente proteína asociada a latencia de TGF-beta. Sin embargo, la producción de citocinas se restableció a los niveles normales mediante la reestimulación con PMA/ionomicina. La función de las células supresoras cultivadas derivadas de sangre de cordón fue predominantemente independiente de IL-10 y TGF-beta. Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que la sangre de cordón contiene un número significativo de células precursoras de células T_{reg}, que pueden presentar una función supresora potente tras la activación del cultivo. Las muestras de sangre de cordón en bancos pueden servir como fuente fácilmente disponible de células T_{reg} para inmunoterapia.

El método de la presente invención proporciona células T_{reg} aisladas de muestras de sangre de cordón umbilical humana que tienen capacidades de supresión de citocinas y actividad supresora más potentes que las derivadas de otras fuentes. En marcado contraste con la técnica anterior, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que las células T_{reg} aisladas de sangre de cordón umbilical humana tienen una capacidad potente para suprimir la proliferación de células T y para suprimir citocinas dependientes de activación de células T. Además, los datos presentes demuestran además que las células CD4⁺CD25⁺ de sangre de cordón pueden formar células supresoras potentes tras aislamiento y cultivo. El método de la presente invención proporciona la purificación de células T_{reg} usando un sistema de purificación basado en anticuerpos directo sencillo para aislar tales células supresoras. Tras la activación y multiplicación con perlas anti-CD3/CD28 y cultivo en IL-2, las células CD4⁺CD25⁺ derivadas de sangre de cordón adquirieron una función supresora potente, que se mantuvo durante largos periodos de tiempo. También se da a conocer un método para inhibir la proliferación de células T y un método para inhibir la producción de citocinas.

Hasta la fecha, todos los ensayos de fenotipo y función de células supresoras revelan que las células derivadas de sangre de cordón, y las células derivadas de adulto más puras, tienen perfiles similares. El análisis de citometría de flujo, el potencial de producción de citocinas y el perfil funcional han sido todos ellos esencialmente iguales. Por tanto, los datos dados a conocer en el presente documento indican que ambos tipos de líneas, cuando son puras, expresan potencia y mecanismos supresores equivalentes, y la ventaja de la sangre de cordón se refiere principalmente a la facilidad de purificación y cultivo.

La disponibilidad de un gran número de células supresoras ha permitido la caracterización bioquímica y molecular de estas células especiales. Usando los métodos dados a conocer en el presente documento, pueden generarse más de 300 millones de células supresoras potentes y uniformes a partir de una unidad de sangre de cordón de calidad para investigación de tamaño promedio (-300 de millones de células) sin un clasificador celular. Estos resultados demuestran una recuperación de células CD4⁺CD25⁺ del 1% y una expansión de 100 veces en cultivo. Este número de células permite la caracterización adicional de alteraciones de señalización de TCR, regulación y función de FoxP3, y mecanismos efectores supresores. Además, una utilidad importante de estas células es permitir pruebas clínicas de una nueva forma de inmunoterapia. Las líneas celulares supresoras pueden ser útiles para potenciar la inducción de tolerancia a aloinjertos o para modular por disminución enfermedades autoinmunitarias.

La presente invención comprende un método para proporcionar células T_{reg} a partir de una muestra de sangre de cordón umbilical. Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "una célula T_{reg}" significa una célula T_{reg} o más de una célula T_{reg}. La célula T_{reg} aislada usando los métodos de la presente invención, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, inhibe la proliferación de células T. El método de la presente invención comprende aislar una población de células mononucleares de sangre de cordón de una muestra de sangre de cordón umbilical. Una "población" se usa en el presente documento para referirse a un grupo de células que tienen una característica fenotípica sustancialmente similar, tal como ser células mononucleares, o expresar CD25RA. Los métodos para aislar células mononucleares de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre de cordón, se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, usar técnicas de centrifugación en gradiente de densidad de modo que se separen los componentes sanguíneos, tales como plasma y eritrocitos, de las células mononucleares. Los métodos para aislar células mononucleares de una muestra de sangre incluyen la técnica de Ficoll-Hypaque.

Las células mononucleares de sangre de cordón así aisladas pueden someterse a depleción de células que expresan determinados antígenos, incluyendo, pero sin limitarse a, CD34, CD8, CD 14, CD 19 y CD56. La depleción de estas células puede llevarse a cabo usando un anticuerpo aislado, una muestra biológica que comprende un anticuerpo, tal como ascitis, un anticuerpo unido a un soporte físico y un anticuerpo unido a una célula. El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un epítipo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos normalmente son tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow *et al*, 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY;

Harlow *et al*, 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York: Houston *et al*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird *et al*, 1988, *Science* 242:423-426). Mediante el término “se une específicamente”, tal como se usa en el presente documento, quiere decirse un compuesto, por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, y similar, que reconoce y se une a una molécula específica, pero que no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra.

El anticuerpo usado en el método de la presente invención puede unirse a un soporte físico, tal como una perla magnética, una perla Dynal, una microperla, una columna, una columna de adsorción y una membrana de adsorción. La conjugación de un anticuerpo a un soporte físico se conoce bien en la técnica. Id. Alternativamente, puede adquirirse un anticuerpo conjugado a un soporte físico, tal como una perla magnética, de una variedad de fuentes, tal como Milteny Biotec (Auburn, CA).

En la presente invención son útiles una variedad de anticuerpos. Tal como entenderá un experto en la técnica, cualquier anticuerpo que pueda reconocer y unirse a un antígeno CD de interés, tal como CD25, CD4, CD34, CD8, CD14, CD19 y CD56 es útil en la presente invención. Los métodos para obtener y usar tales anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se generan anticuerpos policlonales útiles en la presente invención inmunizando conejos según técnicas inmunológicas convencionales bien conocidas en la técnica {véase, por ejemplo, Harlow *et al*, 1988, citado anteriormente). Tales técnicas incluyen inmunizar un animal con una proteína quimérica que comprende una parte de otra proteína tal como una proteína de unión a maltosa o una parte de polipéptido con etiqueta de glutatión (GSH), y/o un resto de manera que la proteína marcadora se vuelve inmunogénica (por ejemplo, una proteína marcadora conjugada con hemocianina de lapa californiana, KLH) y una parte que comprende los residuos de aminoácido de la proteína marcadora respectiva. Las proteínas quiméricas se producen clonando los ácidos nucleicos apropiados que codifican para la proteína marcadora en un vector de plásmido adecuado para este fin, tal como pero sin limitarse a, pMAL-2 o pCMX.

Sin embargo, la invención no debe interpretarse que se limita únicamente a los métodos que incluyen estos anticuerpos o a estas partes de los antígenos proteicos. Más bien, debe interpretarse que el método incluye otros anticuerpos, tal como se define el término en otra parte en el presente documento, proteínas marcadoras de superficie de células T_{reg}, o partes de las mismas. Además, debe interpretarse que el método engloba anticuerpos, entre otros, que se unen a las proteínas de células T_{reg} y que pueden unirse a la proteína presente en inmunotransferencias de tipo Western, en disolución en inmunoensayos ligados a enzimas, en ensayos de FACS, en ensayos de clasificación celular activada por magnetismo (MACS) y en microscopía de inmunofluorescencia.

Un experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que el anticuerpo puede unirse específicamente a cualquier parte de la proteína marcadora y que la proteína de longitud completa puede usarse para generar anticuerpos específicos para la misma. Sin embargo, la presente invención no se limita a usar la proteína de longitud completa como inmunógeno.

Más bien, la presente invención incluye el uso de una parte inmunogénica de la proteína para producir un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de superficie de células T_{reg} específica.

Los anticuerpos pueden producirse inmunizando un animal tal como, pero sin limitarse a, un conejo, un ratón o una cabra, con una proteína de la invención, o una parte de la misma, inmunizando un animal usando una proteína que comprende al menos una parte de un antígeno de superficie de células T_{reg}, o una proteína de fusión que incluye una parte de polipéptido de etiqueta que comprende, por ejemplo, una parte de polipéptido de etiqueta de proteína de unión a maltosa, unida covalentemente con una parte que comprende los residuos de aminoácido apropiados. Un experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que también pueden usarse fragmentos más pequeños de estas proteínas para producir anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de superficie de células T_{reg}.

Los anticuerpos engloban anticuerpos policlonales, monoclonales, sintéticos y similares. La presente invención comprende además el uso de fragmentos de anticuerpos biológicamente activos, tales como un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv y un fragmento scFv de un anticuerpo. Un experto en la técnica entenderá, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la característica crucial del anticuerpo de la invención es que el anticuerpo se une específicamente con una proteína de superficie de células T_{reg}. Es decir, el anticuerpo de la invención reconoce una célula T_{reg} o un fragmento de la misma (por ejemplo, una parte inmunogénica o determinante antigénico de la misma), en inmunotransferencias de tipo Western, en inmunotinción de células, o inmunoprecipitados de la proteína usando métodos convencionales bien conocidos en la técnica.

Un experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que los anticuerpos pueden usarse para inmunoprecipitar y/o purificar por inmunoespecificidad su antígeno relacionado tal como se describe en detalle en otra parte en el presente documento, y adicionalmente, usando métodos bien conocidos en la técnica. Además, el anticuerpo puede usarse para aislar una célula T_{reg} en una población de células mononucleares de sangre de cordón derivada de una muestra de sangre de cordón umbilical. Por tanto, mediante el uso de un anticuerpo frente a un marcador de superficie de células T_{reg}, tal como CD25, puede identificarse, enriquecerse o aislarse una célula T_{reg}. Un experto en la técnica entenderá, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que cualquier marcador, ya sea nativo o modificado por ingeniería

genética, expresado sobre la superficie de una célula T_{reg}, es por tanto útil en la presente invención.

El experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la presente invención incluye el uso de o bien un único anticuerpo que reconoce un único antígeno de célula T_{reg} pero que la invención no se limita al uso de un único anticuerpo. En su lugar, la invención engloba el uso de al menos un anticuerpo, pudiendo dirigirse los anticuerpos a antígenos de células T_{reg} iguales o diferentes.

La generación de anticuerpos policlonales se logra inoculando el animal deseado con el antígeno y aislando los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno del mismo usando métodos de producción de anticuerpos convencionales tales como los descritos en, por ejemplo, Harlow *et al.* (1988, citado anteriormente).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra fragmentos de péptido o la longitud completa de una proteína o péptido pueden prepararse usando procedimientos de preparación de anticuerpos monoclonales bien conocidos, tales como los descritos, por ejemplo, en Harlow *et al.* (1988, *Id.*) y en Tuszynski *et al.* (1988, *Blood*, 72: 109-115). También pueden sintetizarse cantidades del péptido deseado usando tecnología de síntesis química. Alternativamente, puede clonarse ADN que codifica para el péptido deseado y expresarse a partir de una secuencia de promotor apropiada en células adecuadas para la generación de grandes cantidades de péptido. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido se generan a partir de ratones inmunizados con el péptido usando procedimientos convencionales tal como se hace referencia en el presente documento.

El ácido nucleico que codifica para el anticuerpo monoclonal obtenido usando los procedimientos descritos en el presente documento puede clonarse y secuenciarse usando tecnología que está disponible en la técnica, y se describe por ejemplo, en Wright *et al.* (1992, *Critical Rev. Immunol.* 12: 125-168), y las referencias citadas en el mismo. Además, el anticuerpo de la invención puede "humanizarse" usando la tecnología descrita en, por ejemplo, Wright *et al.*, *id.*, y en las referencias citadas en el mismo, y en Gu *et al.* (1997, *Thrombosis and Hematocyst*, 77:755-759), y otros métodos de humanización de anticuerpos bien conocidos en la técnica o que van a desarrollarse.

Una vez expresados, pueden purificarse anticuerpos completos, dímeros derivados de los mismos, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de anticuerpos según procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Puede generarse una biblioteca de anticuerpos en fago. Para generar una biblioteca de anticuerpos en fago, en primer lugar se obtiene una biblioteca de ADNc a partir de ARNm que se aísla de células, por ejemplo, el hibridoma, que expresan la proteína deseada que va a expresarse en la superficie del fago, por ejemplo, el anticuerpo deseado. Se producen copias de ADNc del ARNm usando transcriptasa inversa. Se obtiene el ADNc específico para fragmentos de inmunoglobulina mediante PCR y se clona el ADN resultante en un vector de bacteriófago adecuado para generar una biblioteca de ADN en bacteriófago que comprende genes de inmunoglobulina específicos para el ADN. Los procedimientos para obtener una biblioteca en bacteriófago que comprende ADN heterólogo se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

El bacteriófago que codifica para el anticuerpo deseado puede modificarse por ingeniería genética de manera que la proteína se presenta sobre la superficie del mismo de tal manera que está disponible para unirse a su proteína de unión correspondiente, por ejemplo, el antígeno contra el que se dirige el anticuerpo, tal como un antígeno de superficie de células T_{reg}. Por tanto, cuando se incuban bacteriófagos que expresan un anticuerpo específico en presencia de una célula que expresa el antígeno correspondiente, el bacteriófago se unirá a la célula. El bacteriófago que no expresa el anticuerpo no se unirá a la célula.

Los anticuerpos usados en la presente invención se ponen en contacto con la población de células mononucleares de sangre de cordón aisladas de una muestra de cordón umbilical humano en condiciones adecuadas para la formación de un complejo célula mononuclear de sangre de cordón-anticuerpo. Es decir, el método de la presente invención comprende poner en contacto una población de células mononucleares de sangre de cordón con un anticuerpo que se une específicamente a una célula T_{reg} en la población de células mononucleares de sangre de cordón de modo que el anticuerpo se une a un antígeno, incluyendo CD25, sobre la célula T_{reg}. "Condiciones adecuadas" se usa en el presente documento para referirse a temperatura, pH, tampones, tiempo y otros factores que facilitan la unión de un anticuerpo a su antígeno relacionado o a una célula, tal como una célula T_{reg}. Las condiciones que son adecuadas para la unión de un anticuerpo a un antígeno o a una célula, o a un antígeno en una célula, se conocen bien en la técnica y son habitualmente desde aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 37°C durante un periodo de tiempo de desde aproximadamente 2 minutos hasta aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 24 horas. Se conocen bien en la técnica diversos tampones e incluyen, por ejemplo, Tris, solución salina tamponada con fosfato, y similares. Se describen diversos ejemplos de condiciones adecuadas para la formación de un complejo célula mononuclear de sangre de cordón-anticuerpo en, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988, citado anteriormente.

El método de la presente invención comprende además la etapa de separar sustancialmente el complejo célula mononuclear de sangre de cordón-anticuerpo de una población de células mononucleares de sangre de cordón. Es decir, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, el presente método de aislar

una célula T_{reg} que inhibe la proliferación de células T de una muestra de sangre de cordón umbilical comprende separar sustancialmente tal célula T_{reg} de otras células mononucleares de sangre de cordón en una muestra. Tal como se usa el término en el presente documento, "separado sustancialmente de" o "separar sustancialmente" se refiere a la característica de una población de primeras sustancias que están alejándose de una población de segundas sustancias, en el que la población de primeras sustancias no está desprovista necesariamente de la segunda sustancia, y la población de segundas sustancias no está desprovista necesariamente de la primera sustancia. Sin embargo, una población de primeras sustancias que se "separa sustancialmente de" una población de segundas sustancias tienen un contenido mediblemente inferior de segundas sustancias en comparación con la mezcla no separada de sustancias primera y segunda.

Pueden emplearse diversas técnicas para separar una célula T_{reg} unida a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-CD25, de células que no tienen un marcador de superficie celular unido a un anticuerpo retirando las células T_{reg} unidas al anticuerpo de la mezcla celular de células mononucleares de sangre de cordón. Alternativamente, pueden emplearse diversas técnicas para separar la célula T_{reg} que contiene un marcador de superficie celular unido a un anticuerpo de células que no tienen un marcador de superficie celular unido a un anticuerpo retirando de la mezcla celular la célula T_{reg} no unida a un anticuerpo.

En una realización, se usa el marcador de superficie celular CD25 para separar células T_{reg} unidas a anticuerpo de células T y otras células mononucleares de sangre de cordón no conjugadas con anticuerpo. En un aspecto de la invención, los anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido para permitir la separación en bruto. Las técnicas de separación empleadas deben maximizar la conservación de viabilidad de la fracción que va a recogerse. Para separaciones "relativamente en bruto", es decir, separaciones en las que hasta el 10%, habitualmente no más de aproximadamente el 5%, preferiblemente no más de aproximadamente el 1%, de las células totales presentes que tienen el marcador, pueden permanecer con la población de células que va a retenerse, pueden emplearse diversas técnicas de eficacia diferente. La técnica particular empleada dependerá de la eficacia de la separación, de la citotoxicidad de la metodología, de la facilidad y velocidad del rendimiento, y de la necesidad de equipo y/o capacidad técnica complejos, estando todo ello dentro de la capacidad del experto habitual en la técnica.

Los procedimientos para la separación pueden incluir separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo o perlas Dynal, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usados conjuntamente con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, complemento y citotoxinas, y "cribado" con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, una placa, u otra técnica conveniente. Las técnicas que proporcionan la separación precisa incluyen clasificadores celulares activados por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de complejidad, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de la luz de ángulo bajo u obtusos, canales de impedancia, etc., así como clasificadores celulares activados por magnetismo.

De manera conveniente, los anticuerpos pueden conjugarse con marcadores, tales como perlas magnéticas, que permiten una separación directa, biotina, que puede eliminarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, tales como FITC, que pueden usarse con un clasificador celular activado por fluorescencia, o similares, para permitir la facilidad de separación de un tipo celular particular. Puede emplearse cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células restantes. Otras técnicas incluyen, pero no se limitan a, partículas densas para centrifugación en densidad, una columna de adsorción, una membrana de adsorción, y similares.

En una realización de la invención, un anticuerpo específico para un marcador de superficie celular derivada de sangre de cordón se conjuga con una perla magnética. Se pone en contacto una población de células mononucleares derivadas de sangre de cordón con el conjugado perla magnética-anticuerpo, en condiciones adecuadas para la unión del conjugado de anticuerpo a un antígeno de superficie de células T_{reg} , tal como CD25, que presenta el antígeno. Tras la incubación en condiciones adecuadas para la unión, tal como, pero sin limitarse a, una incubación a 4°C durante 20 minutos, se seleccionan las células T_{reg} positivas para el antígeno haciendo pasar toda la muestra a través de un aparato de separación basado en magnetismo. Tras la evacuación o elución de la disolución libre del aparato, sólo permanecerán las células que contienen marcador retenido magnéticamente. Entonces se eluyen del aparato las células T_{reg} que contienen el antígeno, dando como resultado una población enriquecida, aislada o purificada de células T_{reg} . En un aspecto de la invención, un marcador de T_{reg} es CD25.

Tras el aislamiento sustancial de las células que comprende un antígeno de células a T_{reg} , tal como CD25, generalmente en al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 70%, incluso de manera más preferible aproximadamente el 80%, incluso de manera más preferible aproximadamente el 90% o más del 90%, las células pueden separarse mediante un clasificador celular activado por fluorescencia u otra metodología que tenga alta especificidad, tal como clasificación celular activada por magnetismo (MACS). Pueden emplearse análisis de múltiples colores con FACS lo cual es particularmente conveniente.

Para aumentar la rigurosidad del presente método para proporcionar una célula T_{reg} a partir de una muestra de sangre de cordón umbilical humana, puede ponerse en contacto de nuevo una célula T_{reg} que se ha separado sustancialmente de una población de células mononucleares de sangre de cordón con un anticuerpo que se une específicamente a CD25 en condiciones adecuadas para la formación de un complejo célula mononuclear de sangre

de cordón-anticuerpo seguido por la separación sustancial del complejo célula mononuclear de sangre de cordón-anticuerpo de la población de células mononucleares de sangre de cordón. Esta etapa puede realizarse una o más veces para aislar una célula T_{reg} humana de una muestra de sangre de cordón umbilical.

5 La presente invención comprende además multiplicar, expandir o cultivar de otro modo una célula T_{reg} aislada usando los métodos dados a conocer en el presente documento. Tal como se demuestra mediante los datos dados a conocer en el presente documento, multiplicar una célula T_{reg} aislada mediante los métodos de la presente invención puede realizarse multiplicando por aproximadamente 100 veces usando los métodos dados a conocer en el presente documento. Tras el aislamiento, se incuba una célula T_{reg} en medio celular en un aparato de cultivo durante un periodo de tiempo o hasta que las células alcancen la confluencia antes de hacer pasar las células a otro aparato de cultivo. El aparato para cultivar puede ser cualquier aparato de cultivo usado comúnmente en el cultivo de células *in vitro*. Preferiblemente, el nivel de confluencia es mayor del 70% antes de hacer pasar las células a otro aparato de cultivo. Más preferiblemente, el nivel de confluencia es mayor del 90%. Un periodo de tiempo puede ser cualquier tiempo adecuado para el cultivo de células *in vitro*. El medio de células T_{reg} puede reemplazarse durante el cultivo de las células T_{reg} en cualquier momento. Preferiblemente, el medio de células T_{reg} se reemplaza cada de 3 a 15 4 días. Las células T_{reg} se recogen entonces del aparato de cultivo tras lo cual las células T_{reg} pueden usarse inmediatamente o criopreservarse para almacenarse para su uso en un tiempo posterior. Las células T_{reg} pueden recogerse mediante tripsinización, tratamiento con EDTA, o cualquier otro procedimiento usado para recoger células de un aparato de cultivo.

20 Se usan diversos términos para describir células en cultivo. Un cultivo celular se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y que se hacen crecer en condiciones controladas. Un cultivo celular primario es cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo y antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celulares, dando como resultado una población mayor de las células. Cuando se expanden las células en cultivo, la velocidad de proliferación celular se mide normalmente por la cantidad de tiempo 25 requerido para que las células se doblen en número, lo que se conoce de otra forma como tiempo de duplicación.

Cada ronda de subcultivo se denomina un pase. Cuando se subcultivan células, se dice que se han sometido a pases. Una población específica de células, o una línea celular, se denomina en ocasiones o se caracteriza por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a pases diez veces puede denominarse un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de células del tejido, se designa P0. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Tras el segundo subcultivo, las células se convierten el cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el periodo de los pases; por tanto el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo 35 entre pases depende de muchos factores, incluyendo pero sin limitarse a la densidad de siembra, el sustrato, el medio y el tiempo entre pases.

El medio usado para multiplicar las células T_{reg} de la presente invención comprende un anticuerpo frente a CD3, y un anticuerpo frente a CD28, y una citocina, preferiblemente, pero sin limitarse a, IL-2. Esto se debe, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, a que una célula aislada mediante los métodos 40 de la presente invención puede multiplicarse aproximadamente 100 veces cultivando la célula con un anticuerpo que se une a CD3, y un anticuerpo que se une a CD28, e IL-2. Además, tal como también se da a conocer en el presente documento, las células multiplicadas usando los métodos de la presente invención son células supresoras potentes y uniformes. Además, puesto que las células T_{reg} de la presente invención están inmunológicamente indiferenciadas, tales células pueden administrarse a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluso más preferiblemente a un ser humano, para suprimir una reacción inmunitaria, tal como las comunes a enfermedades autoinmunitarias tales como diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, GVHD, potenciación de inducción de tolerancia a aloinjertos, rechazo de trasplantes y similares. Además, las células de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de cualquier estado en el que es deseable una respuesta inmunitaria disminuida o inhibida de otro modo, especialmente una respuesta inmunitaria mediada por células, para tratar o aliviar la enfermedad.

50 El anticuerpo anti-CD3 y el anticuerpo anti-CD28 usados en los métodos de la presente invención pueden ser cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica, los dados a conocer en otra parte en el presente documento, o los que aún han de descubrirse. Además, y preferiblemente, los anticuerpos usados en la presente invención se conjugan o se unen de otro modo a una perla, tal como una perla magnética o una perla Dynal. Tales perlas se conocen en la técnica y se describen en otra parte en el presente documento.

55 El medio usado en la presente invención comprende además una citocina, preferiblemente IL-2. Esto se debe, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, a que la adición de IL-2 al medio usado en los métodos de la presente invención da como resultado una expansión aproximada de 100 veces de las células T_{reg} . IL-2 y otras citocinas se conocen bien en la técnica y están disponibles comercialmente de varias fuentes.

60 La célula T_{reg} comprende además determinados marcadores antigénicos, algunos de los cuales están presentes

cuando una célula T_{reg} se aísla de una muestra de sangre de cordón umbilical, algunos de los cuales están presentes cuando la célula T_{reg} se multiplica, se cultiva o se expande de otro modo según los métodos de la presente invención. Tales marcadores antigénicos son útiles en la identificación de una célula T_{reg} , y permiten que un experto en la técnica determine si una célula T_{reg} aislada y multiplicada según los métodos de la presente invención tiene las propiedades y actividades biológicas de una célula T_{reg} de la presente invención. Tales actividades biológicas incluyen, pero no se limitan a, supresión de una respuesta inmunitaria alogénica, inhibición de la acumulación de citocinas en una respuesta inmunitaria acompañada por menos inhibición de la producción de quimiocinas, la producción de IL-2, IL-10 e interferón gamma, la expresión de proteína asociada a latencia de TGF-beta (LAP), y actividad supresora independiente de IL-10 y TGF-beta. Los marcadores sobre la célula T_{reg} de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, CD25, CD4, CTLA4, CD27, CD26L y Fox P3.

La presente patente ilustra además un método para inhibir la proliferación de una célula T. Tal inhibición puede producirse *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente en un animal, más preferiblemente en un mamífero, incluso más preferiblemente en un ser humano. Esto se debe, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, a que se inhibió la proliferación de células T de HLA no coincidente en una reacción mixta de linfocitos (MLR) en un factor mayor de aproximadamente el 95% en presencia de una célula T_{reg} aislada y multiplicada según los métodos de la presente invención. Además, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, las células T_{reg} aisladas y/o multiplicadas según los métodos de la presente invención son supresores potentes de la proliferación de células T a razones de desde aproximadamente 1:16 hasta aproximadamente 1:32 (célula T_{reg} : célula T). Además, las células T_{reg} producidas mediante el método de la presente invención son activas para suprimir una respuesta inmunitaria cuando una célula presentadora de antígeno, tal como una célula dendrítica, está madura y activada. Por tanto, estas células pueden usarse para inhibir respuestas inmunitarias activas o para prevenir una respuesta inmunitaria.

La patente ilustra la puesta en contacto de una célula T con una célula T_{reg} aislada y/o expandida según los métodos de la presente invención de manera que se inhibe la proliferación de una célula T. La célula T_{reg} puede administrarse usando técnicas bien conocidas en la técnica de modo que una célula T_{reg} entra en contacto, o está en proximidad, con una célula inmunitaria, tal como una célula T, una célula dendrítica, una célula plasmática, y similares.

El método ilustrado para inhibir la proliferación de una célula T usando una célula T_{reg} aislada y/o cultivada según los métodos de la presente invención engloba la preparación y el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden una célula T_{reg} de la invención como principio activo. Una composición farmacéutica de este tipo puede consistir en el principio activo sólo, como una combinación de al menos un principio activo (por ejemplo, una dosis eficaz de una célula T_{reg}) en una forma adecuada para su administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender el principio activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, uno o más componentes (activos y/o inactivos) adicionales, o alguna combinación de éstos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que puede combinarse el principio activo y que, tras la combinación, puede usarse para administrar el principio activo a un sujeto.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado más adelante en la técnica de farmacología. En general, tales métodos preparatorios incluyen la etapa de llevar el principio activo a asociación con un portador o uno o más de otros componentes auxiliares y entonces, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una unidad de dosis única o de múltiples dosis.

Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se dirigen principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración de manera ética a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que tales composiciones son generalmente adecuadas para su administración a animales de todos los tipos. Se entiende bien la modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para su administración a diversos animales, y el farmacólogo veterinario experto en la técnica puede diseñar y realizar tal modificación con experimentación meramente habitual, si la hay. Los sujetos en los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y otros primates, mamíferos incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como primates no humanos, ganado, cerdos, caballos, cabras, gatos y perros, aves incluyendo aves comercialmente relevantes tales como pollos, patos, gansos y pavos, peces incluyendo peces de piscifactoría y peces de acuarios, y crustáceos tales como marisco de piscifactoría.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o comercializarse en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, intralesional, bucal, oftálmica, intravenosa, intraorgánica u otra vía de administración. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposomales, eritrocitos liberados que contienen el principio activo y formulaciones basadas en inmunología.

Una composición farmacéutica puede prepararse, envasarse o comercializarse a granel/como una dosis unitaria

individual, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una “dosis unitaria” es una cantidad diferenciada de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de una dosificación de este tipo tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de una dosificación de este tipo.

Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable y cualquier componente adicional en una composición farmacéutica variarán dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto tratado y dependiendo adicionalmente de la vía por la que va a administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) de principio activo.

Además del principio activo, una composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Los agentes adicionales contemplados particularmente incluyen agentes antieméticos y eliminadores tales como eliminadores de cianuro y cianato y otros compuestos inhibidores inmunitarios, tales como ciclosporina, esteroides, anticuerpos frente a citocinas proinflamatorias, citocinas inhibidoras, tales como IL-10, y similares.

Pueden prepararse formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica usando tecnología convencional.

Tal como se usa en el presente documento, “administración parenteral” de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la rotura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la rotura en el tejido. La administración parenteral incluye por tanto, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, pero no se limita a, inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal y técnicas de infusión de diálisis renal.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para administración parenteral comprenden el principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones pueden prepararse, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parental incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos acuosos u oleosos, pastas y formulaciones biodegradables o de liberación sostenida implantables. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más componentes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de suspensión, estabilizantes o de dispersión.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de una disolución o suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o disolución puede formularse según la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, componentes adicionales tales como los agentes de dispersión, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, tal como agua o 1,3 butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, disolución isotónica de cloruro de sodio y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen las que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal o como un componente de un sistema de polímero biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales hidrófobos o poliméricos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero ligeramente soluble o una sal ligeramente soluble.

La célula T_{reg} expandida usando los métodos de la presente invención puede administrarse a un animal, preferiblemente a un ser humano. Cuando se administran las células T_{reg} de la invención, la cantidad de células administradas puede oscilar entre aproximadamente 100.000 células y aproximadamente 300 mil millones de células infundiéndose las células en el animal, preferiblemente, un paciente humano que las necesita. Aunque la dosificación precisa administrada variará dependiendo de cualquiera de varios factores, incluyendo pero sin limitarse a, el tipo de animal y el tipo de estado patológico que está tratándose, la edad del animal y la vía de administración.

La célula T_{reg} puede administrarse a un animal con una frecuencia de varias veces al día, o puede administrarse menos frecuentemente, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso menos frecuentemente, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis será fácilmente evidente para el experto en la técnica y dependerá de cualquiera de varios factores, tales como, pero sin limitarse al, el tipo y la gravedad de la enfermedad que está tratándose, el tipo y la edad del animal, etc.

Una célula T_{reg} puede coadministrarse con otros compuestos diversos (citocinas, fármacos quimioterápicos,

fármacos inmunosupresores, entre muchos otros). Alternativamente, el/los compuesto(s) puede(n) administrarse con una hora, un día, una semana, un mes, o incluso más, de antelación con respecto a la célula T_{reg} , o cualquier permutación de los mismos. Además, el/los compuesto(s) puede(n) administrarse una hora, un día, una semana o incluso más, tras la administración de una T_{reg} , o cualquier permutación de los mismos. La frecuencia y el régimen de administración resultarán fácilmente evidentes para el experto en la técnica y dependerán de cualquiera de varios factores tales como, pero sin limitarse a, el tipo y la gravedad de la enfermedad que está tratándose, la edad y el estado de salud del animal, la identidad del compuesto o los compuestos que están administrándose, la vía de administración de los diversos compuestos y la célula T_{reg} , y similares.

Además, un experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que cuando la célula T_{reg} va a administrarse a un mamífero, las células pueden tratarse de modo que estén en un "estado de no crecimiento"; es decir, las células no pueden dividirse cuando se administran a un mamífero. Tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, las células pueden irradiarse para hacer que no puedan crecer o dividirse una vez administradas a un mamífero. Se conocen en la técnica otros métodos, incluyendo haptización (por ejemplo, usando dinitrofenilo y otros compuestos), para hacer que las células que van a administrarse, especialmente a un ser humano, no puedan crecer.

La patente ilustra diversos kits que comprenden los reactivos usados para aislar una célula T_{reg} de una muestra de sangre de cordón umbilical humana. El kit comprende un anticuerpo que se une específicamente a una molécula sobre la superficie de una célula T_{reg} , tal como CD25, un aplicador y materiales de instrucciones que describen el uso del kit para realizar los métodos de la invención. Aunque más adelante se describen kits a modo de ejemplo, el contenido de otros kits útiles resultará evidente para el experto en la técnica a la luz de la presente divulgación. Mediante el término "aplicador", tal como se usa el término en el presente documento, quiere decirse cualquier dispositivo incluyendo, pero sin limitarse a, una jeringa hipodérmica, una pipeta, y similares, para administrar los compuestos y composiciones de la invención.

"Material de instrucciones", tal como se usa el término en el presente documento, incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que puede usarse para comunicar la utilidad de la composición y/o el compuesto en el kit para lograr el alivio o el tratamiento de las diversas enfermedades o trastornos enumerados en el presente documento. De manera opcional o alternativa, el material de instrucciones puede describir uno o más métodos de alivio de las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido o un mamífero, incluyendo tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento.

La invención describe además un kit para multiplicar una T_{reg} a partir de una muestra de sangre de cordón umbilical humana. El kit comprende un anticuerpo que se une específicamente a CD3 y un anticuerpo que se une específicamente a CD28. Los anticuerpos del presente kit pueden ser anticuerpos aislados, anticuerpos unidos a un soporte físico, tal como una perla magnética, u otros anticuerpos descritos en otra parte en el presente documento o conocidos en la técnica. El kit puede comprender además una citocina, tal como IL-2, para cultivar, multiplicar o expandir de otro modo una célula T_{reg} de la presente invención. El kit se usa conforme a los métodos dados a conocer en la invención. El kit puede comprender además un aplicador y un material de instrucciones para el uso del mismo.

La invención se describe ahora haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1 - Aislamiento y cultivo de células CD45RA⁺ de sangre periférica humana de adulto

Purificación mediante MACS de células CD25⁺ y CD25⁺ para cultivo

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de preparaciones de capa leucocítica, que se derivaban de la sangre completa de donantes voluntarios sanos normales (Memorial Blood Centers, Minneapolis, MN). Se centrifugaron células de capa leucocítica rica en leucocitos sobre capas de Ficoll-Hypaque para recoger PBMC. Se aislaron células CD25⁺ usando las siguientes microperlas basadas en anticuerpo indirectas. Se tiñeron PBMC con anticuerpo anti-CD25-FITC, clon 2A3 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), se lavaron y entonces se unieron secundariamente a microperlas de múltiples clases anti-FITC (5 microlitros/10⁷ células, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y se seleccionaron positivamente. Volvieron a aplicarse las células CD25⁺ a una segunda columna, se lavaron y volvieron a eluirse. Tras la purificación en columna, se desprendieron las perlas de múltiples clases anti-FITC. Las células CD25⁺ se sometieron a depleción adicionalmente de células que expresaban CD8, CD14, CD19, CD20 y CD56 con un cóctel de microperlas recubiertas con AcM para la depleción de linaje. Entonces se seleccionaron estas células con depleción de linaje CD25⁺ (DC-8x-menos) para detectar CD45RA mediante selección positiva directa con microperlas anti-CD45RA (20 microlitros/ 10⁷ células, Miltenyi). En algunos casos, se aisló una purificación adicional de células anti-HLA-DR⁺ de las células CD45RA⁺ mediante selección positiva con microperlas anti-HLA-DR (20 microlitros/10⁷ células, Miltenyi). Las células CD25⁺ se sometieron a depleción adicionalmente de CD25 mediante una segunda ronda de depleción con microperlas anti-CD25 directas (20 microlitros/10⁷ células, Miltenyi). Tras la depleción de CD25, se seleccionaron entonces estas

células positivamente para CD4 con microperlas anti-CD4 directas (20 microlitros/10⁷ células, Miltenyi).

Cultivo de células CD25⁺ y CD25⁻

Se cultivaron células CD25⁺ aisladas, subconjuntos de CD25⁺ o células control CD4⁺CD25⁻ a 1 millón de células totales/ml en placas de 24 pocillos. Se añadió un número igual de células alimentadoras CD4⁺CD25⁻ irradiadas a los cultivos. Se añadieron Dynabeads recubiertas con AcM anti-CD3/CD28 (Universidad de Pensilvania, Filadelfia, PA) a una razón 3:1 de perlas con respecto a células como estímulo de crecimiento, y se añadió una dosis moderada de IL-2 en el día 3, a 50 UI/ml en el medio nuevo (Chiron, Emeryville, CA) (Godfrey, *et al.*, 2004, *Blood*, 104: 453-461; Levine, *et al.*, 1998, *J. Hematother.*, 7: 437-48). Para cultivos de sangre de cordón, no se requerían células alimentadoras para el cultivo o la conservación de la función supresora, y por tanto no se usaron. Se dividieron los cultivos celulares según fuese necesario, aproximadamente 1/3 cada 3 días durante la fase de crecimiento rápido. El medio de cultivo era RPMI-1640 (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA) complementado con FCS al 10% (Invitrogen-Gibco), y L-glutamina, penicilina y estreptomina.

Las líneas celulares aisladas anteriormente usando una estrategia basada en MACS para el aislamiento de células CD4⁺CD25⁺ para la generación de la línea celular T_{reg} a partir de sangre de adulto mostraban potencia variable, lo que estaba provocado posiblemente por células T convencionales contaminantes. Para mejorar la estrategia de purificación, se analizaron células CD25⁺ para detectar subconjuntos mediante análisis de citometría de flujo. Un subconjunto de células CD4⁺CD25⁺ podría estar enriquecido adicionalmente en células supresoras, o a la inversa, un subconjunto podría estar enriquecido en células T convencionales. El enfoque descrito en el presente documento era caracterizar marcadores de subconjuntos, purificar selectivamente estos subconjuntos celulares y luego evaluar su capacidad para formar líneas celulares con función supresora potente.

Los primeros marcadores analizados fueron CD45RO, un marcador de células de memoria, y CD45RA, un marcador de células T indiferenciadas. Se ha notificado que el subconjunto CD45RO⁺ de células CD4⁺CD25⁺ contiene las células supresoras, ya que las células CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ recién aisladas contenían la mayor parte de la actividad supresora de células CD4⁺CD25⁺ (Jonuleit, *et al.*, 2001, *J. Exp. Med.*, 193: 1285-1294). Las células CD4⁺CD25⁺CD45RO⁻ tenían una actividad supresora mínima en ensayos funcionales (MLR alogénica secundaria). Se sugirió que las células CD4⁺CD25⁺CD45RO⁻ eran células T convencionales. Puesto que las células T convencionales normalmente producen un sobrecrecimiento de células supresoras en cultivo, se investigó la depleción de las células CD4⁺CD25⁺CD45RO⁻ como medio para mejorar la generación de líneas celulares.

Se evaluaron células CD4⁺CD25⁺ purificadas para detectar la expresión de CD45RA y CD45RO mediante análisis de FACS (figura 1). Las células CD25⁺ coexpresaban CD45RO en aproximadamente el 80% de las células (media del 80%, intervalo de 62-89, n=6). Las células CD25⁺ también contenían un subconjunto de células que coexpresaban CD45RA en aproximadamente el 20% de las células (media del 24%, intervalo 15-38, n=6). El alto nivel de expresión de estos antígenos era mutuamente excluyente, pero hay un número significativo de células dobles positivas que expresan sólo bajas cantidades de ambos antígenos, y un diagrama de puntos de dos colores revela un espectro de expresión completo. Las células CD45RA⁺ no expresaban CD25 a los niveles más altos, y las células brillantes para CD25, que se pensaba que eran células T_{reg} verdaderas, parecen no expresar CD45RA (figura 2). Estos datos indican por tanto que la depleción del subconjunto CD45RA enriquecería adicionalmente las células T_{reg} CD45RO⁺, y se intentó la eliminación de estas células CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺.

El sistema de purificación indirecta con una microperla escindible permitió la purificación de células CD25⁺, la eliminación de la perla magnética y luego la depleción de las células CD45RA⁺. Usando una capa leucocítica típica, el material de partida tenía aproximadamente 500 millones de células, y a través de purificación se obtuvieron aproximadamente 10 millones de células CD25⁺, 7 millones de células negativas para el linaje CD25⁺, 5 millones de células CD45RA⁻ y 1 millón de células CD45RA⁺. Se representan las purificaciones a partir de dos donantes (figura 1). Se cultivaron estas diversas poblaciones de CD25⁺ con una ronda de estimulación con perlas anti-CD3/28. Tras 3 semanas, se sometieron a prueba las líneas celulares para determinar su capacidad para suprimir MLR alogénica.

Para evaluar la función supresora de estas líneas celulares, se usó un ensayo de MLR alogénica de HLA no coincidente como lectura funcional. Los ensayos de MLR que responde a CD4⁺ y estimulada con DC son muy robustos y constantes entre donantes, y por tanto sirvieron como medición convencional de la supresión. Se examinaron inicialmente todas las líneas celulares para detectar actividad supresora en MLR tras 2-3 semanas de cultivo, y luego se analizaron adicionalmente a lo largo de las siguientes 3-4 semanas.

Sorprendentemente, fueron las líneas celulares derivadas de CD45RA⁺ (que se esperaba que fuesen células T convencionales y que carecieran de actividad) las que demostraron una potente actividad supresora (figura 11). En cambio, las líneas derivadas de células CD45RA⁻ tenían una función supresora muy escasa. Se sometieron a prueba doce donantes de líneas celulares, y las líneas celulares 10/12 RA demostraron una potente actividad supresora y las líneas celulares 2/12 RA⁻ demostraron actividad similar. Estos datos, y el porcentaje de supresión mediada por estas líneas celulares se representan en un diagrama de dispersión, que también incluye células seleccionadas CD25⁺ normales de sangre de adulto y sangre de cordón (figura 3).

Dos subconjuntos principales de células CD25⁺ humanas. CD45RA⁺ y HLA-DR⁺

El análisis adicional de subconjuntos de células CD25⁺ reveló que las células CD45RA⁺ eran distintas de las células T_{reg} humanas brillantes para CD25⁺, descritas de manera clásica (Baecher-Allan, *et al.*, 2001, *J. Immunol.*, 167: 1245-1253; Godfrey, *et al.*, 2004, *Blood* 104: 453-461; Hoffmann, *et al.*, 2004, *Blood* 104: 895-903). Informes previos han indicado que estas células son CD25⁺ hi, y positivas para CTLA-4 (Jonuleit, *et al.*, 2001, *J. Exp. Med.*, 193: 1285-1294). Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que las células CD45RA son distintas. En diagramas de puntos de dos colores, se mostró que las células CD45RA eran negativas para CTLA-4 intracelular (figura 4A), negativas para HLADR (figura 4B). La doble tinción para CD25 frente a HLA-DR revela que las células HLA-DR⁺ son las células brillantes para CD25⁺ (figura 4C), y se tiñen de manera doble para CTLA-4 intracelular (figura 4D). Esto demuestra dos subconjuntos celulares distintos.

La purificación de las células HLA-DR se realizó mediante selección positiva adicional de la población de células CD45RA(-). Esto dejó tres subconjuntos de células CD25⁺, las células CD45RA⁺, las células HLA-DR⁺ y los "dobles negativos". Se cultivaron los tres subconjuntos y se sometieron a prueba para detectar la función supresora. Las líneas celulares derivadas de CD45RA⁺ mediaban en la función supresora más potente. Las células dobles negativas mediaban en un nivel medio de supresión y las HLA-DR⁺ mediaban en la peor actividad supresora (figura 5).

EJEMPLO 2- Las células CD45RA⁺ humanas de adulto suprimen la proliferación de células T

Células respondedoras y estimuladoras para cultivos de ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR)

Se aislaron células T respondedoras CD4⁺CD25⁺ de preparaciones de capa leucocítica derivadas de la sangre completa de donantes voluntarios sanos normales (Memorial Blood Centers, Minneapolis, MN). Se centrifugaron las células sobre Ficoll-Hypaque para recoger PBMC. En primer lugar se sometieron a depleción las PBMC de células CD25⁺ con microperlas recubiertas con AcM anti-CD25 (Miltenyi-Biotec), antes de aislar células T CD4⁺ mediante selección positiva con microperlas magnéticas recubiertas con AcM anti-CD4 (Miltenyi-Biotec). Las células eran de manera rutinaria puras al 96-98% mediante análisis de FACS. Se generaron células dendríticas (DC) inmaduras a partir de monocitos CDH⁺ (Sallusto y Lanzavecchia, 1994, *J. Exp. Med.*, 179: 1109-1118), se aislaron de PBMC, mediante purificación basada en perlas magnéticas (Miltenyi-Biotec), y se cultivaron en medio X-vivo-15 (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 1 millón de células/ml complementado con GM-CSF (50 ng/ml final) e IL-4 (20 ng/ml final; R&D Systems, Minneapolis, MN). Se cultivaron las células durante 5-10 días antes de su uso como estimuladores en MLR. Para algunos experimentos, se maduraron DC con LPS (Sigma, St. Louis, MO) (100 ng/ml), o TNF-alfa (20 ng/ml final) y Poli I:C, un ligando agonista de receptor de tipo Toll (TLR)-3 (20 µg/ml final) (Sigma) durante dos días (Godfrey, *et al.*, 2004, *Blood* 103: 1158-1165; Cella, *et al.*, 1999, *J. Exp. Med.*, 189: 821-829). Se irradiaron estimuladores de DC a 30 Gy.

Cultivo de ensayo de MLR

Se cultivaron 5x10⁴ células T CD4⁺CD25⁺ respondedoras y 5x10³ células presentadoras de antígeno (APC) estimuladoras de DC por pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron líneas de células T convencionales o supresoras cultivadas a 2,5x10 por pocillo para ensayos convencionales, o en números graduados para experimentos de titulación. Para experimentos de bloqueo de anticuerpos, se usaron 10⁴, o 5x10³ células supresoras. El medio de cultivo era RPMI-1640 complementado con FCS al 10%. Se pulsaron los pocillos en los días 3, 5, 6 y 7 con ³H-timidina durante las últimas 16 horas de cultivo. Cada punto de tiempo tenía 6 réplicas. Los resultados se expresaron en cuentas por minuto. Se recogieron los datos con un contador beta directo (sin centelleo líquido), por tanto la magnitud de los resultados era menor pero proporcionalmente correcta.

Análisis de citocinas

Se eliminaron por centrifugación las células de los sobrenadantes de cultivo de MLR y se congelaron alícuotas a -80°C. Para reestimulaciones, se usaron perlas anti-CD3/CD28 a una razón 1:1 de perlas con respecto a células. Se evaluaron los sobrenadantes mediante el sistema de ensayo Luminex con un sistema de múltiples analitos basado en perlas de látex (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Potencia de la supresión mediada por líneas celulares derivadas de CD45RA⁺

Se realizaron experimentos de titulación para evaluar adicionalmente la potencia de supresión. La disminución del número de supresores añadidos a cultivos de MLR estimulados con DC convencionales demostró que se mantenía casi toda la actividad inhibitora de supresores derivados de sangre de cordón a una razón de 1:16 ó 1:32 (tan sólo 1500 células supresoras con respecto a 50.000 respondedoras). Esto es ligeramente más potente (~2 veces) que las líneas celulares derivadas de adulto más potentes seleccionadas (linaje⁺ CD25⁺).

Como evaluación adicional de la potencia, se evaluaron líneas celulares supresoras en MLR donde habían madurado los estimuladores de DC. La activación/maduración de DC con lipopolisacárido (LPS), (ligando de TLR4), o la combinación de TNF/poliiC (ligando de TLR 3 análogo de ARN bicatenario), no condujo a la evitación de la supresión. Además, la inclusión de LPS o TNF/PoliiC en el cultivo de MLR, tampoco evitó la supresión. Por tanto, las

células T_{reg} derivadas de CD45RA⁺ tanto eran potentes como activaban DC, expresando abundantemente moléculas coestimuladoras y citocinas. Además, las DC y las moléculas coestimuladoras expresadas no podían evitar el efecto supresor de las células CD4⁺CD25⁺.

Las células supresoras derivadas de CD45RA⁺ alteran la producción de citocinas en MLR

- 5 Para determinar los efectos de las líneas celulares supresoras sobre células T respondedoras en ensayos de MLR, se evaluaron los sobrenadantes de cultivo para detectar la presencia y la magnitud de múltiples citocinas. La adición de células supresoras a ensayos de MLR redujo marcadamente la acumulación de citocinas dependientes de activación de células T, incluyendo IL-2, IFN-gamma, GM-CSF, TNF- α e IL-10. La acumulación de citocinas dependientes de activación era mínima en todos los puntos de tiempo durante la MLR suprimida. Estos datos demuestran una alteración marcada de la activación de células T.

La reactivación de líneas celulares supresoras induce producción de citocinas mínima

- 15 Para determinar las capacidades funcionales de las líneas de células T supresoras frente a convencionales, se evaluó su potencial para la producción de citocinas y la expresión de moléculas de superficie celular tras la reestimulación. Se reestimularon las líneas celulares con perlas anti-CD3/CD28 para lograr una reactivación potente, y se recogieron los sobrenadantes en puntos de tiempo definidos para el análisis del contenido en citocinas mediante ensayo basado en perlas Luminex. Las líneas celulares derivadas de CD45RA⁺ no produjeron esencialmente IL-2, IFN- γ ni IL-10, mientras que las líneas celulares derivadas de CD25⁻ control produjeron altos niveles de estas citocinas. La acumulación de TNF, GM-CSF e IL-5, y la quimiocina IL-8, estaba también notablemente reducida en comparación con líneas celulares control.

- 20 EJEMPLO 3- Aislamiento y cultivo de sangre de cordón humana que tiene un fenotipo CD45RA⁺

- El papel crítico de células T_{reg} en el trasplante y la inmunología de sangre de cordón no se ha apreciado generalmente (Barker, *et al*, 2003, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 48: 35-43). Muchos investigadores usan CD4⁺ totales seleccionadas de poblaciones de sangre de cordón como modelo representativo de células T verdaderamente indiferenciadas para fines de caracterización inmunológica (Kaminski, *et al*, 2003, Blood 102: 4608-4617). Sin embargo, a la luz de los datos dados a conocer en el presente documento, puede ser necesario reevaluar algunos estudios previos con células CD4⁺ con depleción de CD25 (Jonuleit, *et al*, 2000, J. Exp. Med., 192: 1213-1222). Estas células pueden ser un factor contribuyente a la baja tasa de GVHD experimentada en trasplante de sangre de cordón (CBT) (Wadlow, *et al*, 2002, Biol. Blood. Marrow. Transplant., 8: 637-647).

Purificación mediante MACS de células T CD25⁺ y CD25⁻CD4⁺

- 30 Se aislaron células T CD25⁺ y CD25⁻CD4⁺ de sangre de cordón umbilical (Cruz Roja, Saint Paul, MN). Se prepararon células mononucleares de sangre de cordón mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque según las directrices del fabricante. Tras la depleción de CD34⁺ con microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), se aislaron células CD25⁺ mediante selección positiva con microperlas magnéticas anti-CD25 conjugadas directamente (4 microlitros por 10⁷ células; Miltenyi Biotec). Entonces se aplicaron las células a una segunda columna magnética, se lavaron y volvieron a eluirse. Tras el procedimiento de doble columna, las células eran de manera rutinaria puras a >90% (para CD4/CD25) mediante análisis de FACS. Entonces se aplicó la fracción distinta de CD25 a otra columna magnética para someter a depleción cualquier célula CD25⁺ restante, antes del aislamiento de células CD4⁺CD25⁻ mediante selección positiva con microperlas recubiertas con AcM anti-CD4 (Miltenyi Biotec). La purificación rigurosa de células CD25⁺ de adulto usó microperlas anti-CD25-FITC y anti-FITC (2 microlitros por 40 10⁷ células), y paso sobre columna magnética y elución durante dos ciclos. A esto le siguió la liberación de las perlas magnéticas, y la posterior depleción de linaje con microperlas conjugadas directas anti-CD8, CD14, CD19 y CD56 (lin-CD4⁺CD25⁺⁺) tal como se describe en Godfrey, *et al*. (2004, Blood 104: 453-461).

Cultivo de células T_{reg} de sangre de cordón

- 45 Se cultivaron células CD4⁺CD25⁺ aisladas o células CD4⁺CD25⁻ control tal como se describe en Godfrey, *et al*. (2004, Blood 104: 453-461) con Dynabeads recubiertas con AcM anti-CD3/CD28 (obtenidas de la Universidad de Pensilvania y descritas en Levine, *et al*, 1998, Hematother., 7:437-448) a una razón de tres a uno de perlas con respecto a células. Se cultivaron las células a 1 millón de células totales/ml en placas de 24 pocillos. Se añadió IL-2 el día 3 a 50 UI/ml (Chiron, Emeryville, CA). En contraposición al estudio anterior, se cultivaron todas las líneas sin células alimentadoras. Para cultivos de sangre de cordón, la adición de células alimentadoras irradiadas (células CD4⁺CD25⁻) (Godfrey, *et al*. 2004, Blood 104: 453-461), no era útil ni para la expansión ni para la conservación de la función supresora, por tanto se omitieron las células alimentadoras para simplificar el protocolo de cultivo. Se dividieron los cultivos celulares según fuese necesario, aproximadamente de uno a tres cada tres días durante la fase de crecimiento rápido. El medio de cultivo era RPMI-1640 (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA) complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS; Invitrogen-Gibco), y L-glutamina, penicilina y estreptomina.

- 55 La sangre de cordón contiene una población distinta de células CD4⁺CD25⁺

Se ha mostrado que las células mononucleares de sangre de cordón (CBMC) contienen células T CD4⁺ que

coexpresan CD25. Por tanto, los presentes resultados dan a conocer una evaluación del potencial de estas células para generaciones de líneas celulares supresoras y funciones supresoras. Se usó análisis de FACS para confirmar que las CBMC contenían una población significativa de células T CD4⁺ que coexpresan CD25⁺, y que ésta era una población de células diferenciada (figura 6A). En cambio, la sangre de adulto contiene células T CD4⁺ con un amplio espectro de niveles de CD25, incluyendo una gran población de células atenuadas para CD25 no supresoras (figura 6B). Aproximadamente el 5% de las células T CD4⁺ de sangre de cordón expresaban de manera distinta CD25⁺ (media del 5,2%, intervalo 2,3-9,5%, n=20), un porcentaje ligeramente mayor que el presente en células T CD4⁺ de sangre periférica de adulto (media del 3,8% de CD4⁺). Para la comparación directa de la purificación, se aislaron células T_{reg} CD25⁺ de sangre tanto de adulto como de cordón usando un protocolo basado en MACS idéntico (selección basada en anticuerpo anti-CD25 directa). Las células CD25⁺ purificadas de sangre de cordón contenían una población más centrada de células brillantes para CD25⁺ (MFI 320 frente a 130), y menos células atenuadas para CD25 o negativas para CD25 (figura 6C), media del 9% (intervalo 5-21%, n=10) y del 3% (intervalo 1-9%, n=10) respectivamente. En comparación, se encontró que las células CD25⁺ derivadas de sangre de adulto contenían más células atenuadas para CD25 y negativas para CD25 (figura 6D), media del 30% (intervalo 25-38%, n=10), y del 10% (intervalo 2-24%, n=10) respectivamente.

Las células CD25⁺ de sangre de cordón son CD45RA⁺

Se purificaron células CD25⁺ de sangre de cordón mediante selección directa. Se tiñeron para CD25 y CD45RA. Las células son predominantemente CD45RA⁺ (figura 7).

Líneas celulares derivadas de CD4⁺CD25⁺ de sangre de cordón seleccionadas mediante MACS tienen de manera sistemática una potente función supresora

Las células T_{reg} CD25⁺ derivadas de adulto purificadas de manera rigurosa estimuladoras con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CD3/CD28, complementadas con IL-2, inducen expansión significativa. Se usó esta estrategia de cultivo para generar líneas celulares a partir de células CD4⁺CD25⁺ de sangre de cordón o de adulto purificadas, así como células CD4⁺CD25⁺ de sangre de cordón para comparación. Las células CD4⁺CD25⁺ derivadas de sangre de cordón se expandieron fácilmente en cultivo; aproximadamente 100 veces a lo largo de tres semanas con una única estimulación inicial. Tras de tres a cuatro semanas, las líneas celulares dejaron de expandirse en número, y se mantuvieron en IL-2. Por tanto, las curvas de crecimiento de estas líneas celulares eran similares a las de las líneas celulares CD4⁺CD25⁺ derivadas de sangre de adulto.

EJEMPLO 4- Las células de sangre de cordón CD45RA⁺ suprimen la proliferación de células T

Células estimuladoras y respondedoras para cultivos de reacción mixta de linfocitos (MLR)

Se aislaron células T respondedoras CD4⁺CD25⁺ de preparaciones de capa leucocítica derivadas de la sangre completa de donantes voluntarios sanos normales (Memorial Blood Centers, Minneapolis, MN). Se centrifugaron las células sobre Ficoll-Hypaque para recoger PBMC. En primer lugar se sometieron a depleción las PBMC de células CD25⁺ con microperlas recubiertas con AcM anti-CD25 (Miltenyi-Biotec), antes de aislarse células T CD4⁺ mediante selección positiva con microperlas magnéticas recubiertas con AcM anti-CD4 (Miltenyi-Biotec). Las células eran de manera rutinaria puras al 96-98% mediante análisis de FACS. Se generaron células dendríticas (DC) inmaduras a partir de monocitos CD14⁺ (Sallusto, *et al*, 1994, *J. Exp. Med.*, 179: 1109-1118), se aislaron de PBMC, mediante purificación basada en perlas magnéticas (Miltenyi-Biotec), y se cultivaron en medio X-vivo-15 (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 1 millón de células/ml complementado con GM-CSF (50 ng/ml final) e IL-4 (20 ng/ml final) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se cultivaron las células durante 5-10 días antes de su uso como estimuladores en MLR. Para algunos experimentos, se maduraron DC con LPS (Sigma, St. Louis, MO) (100 ng/ml), o TNF-alfa (20 ng/ml final) y Poli I:C, un ligando agonista de receptor de tipo Toll (TLR)-3 (20 µg/ml final) (Sigma) durante dos días (Spisek, *et al*, 2001, *Cancer Immunol. Immunother.*, 50: 417-427; Godfrey, *et al*, 2004, *Blood* 103: 1158-1165). Se irradiaron estimuladores de DC a 30 Gy.

Cultivo de ensayo de MLR

Se cultivaron 5x10⁴ células T CD4⁺CD25⁺ respondedoras y se cultivaron 5x10³ APC estimuladoras de DC por pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron líneas de células T supresoras o convencionales cultivadas a 2,5x10⁴ por pocillo para ensayos convencionales, o números graduados para experimentos de titulación. Para experimentos de bloqueo de anticuerpos, se usaron 10⁴ o 5x10³ células supresoras. El medio de cultivo era RPMI-1640 complementado con FCS al 10%. Se pulsaron los pocillos los días 3, 5, 6 y 7 con ³H-timidina durante las últimas 16 horas de cultivo. Cada punto de tiempo tenía 6 réplicas. Se expresaron los resultados en cuentas por minuto. Se recogieron los datos con un contador beta directo (sin centelleo líquido), por tanto la magnitud de los resultados era menor pero proporcionalmente correcta.

Función supresora de células QfT₁^A tal como se determina mediante análisis de MLR

Para evaluar la función supresora de las líneas celulares, se usó un ensayo de MLR alogénico de HLA no coincidente como lectura funcional. Los ensayos de MLR que responde a CD4⁺ y estimulada con DC son muy robustos y constantes entre donantes, y por tanto sirvieron como medición convencional de la supresión. Se

5 examinaron inicialmente todas las líneas celulares para detectar actividad supresora en MLR tras 2-3 semanas de cultivo, y luego se analizaron adicionalmente a lo largo de las siguientes 3-4 semanas. Sorprendentemente, las líneas celulares derivadas de células CD25⁺ de sangre de cordón eran supresoras de manera constante y potente (figura 8A). Se aislaron líneas celulares supresoras potentes de 29 de 30 donantes, donde la inhibición de la proliferación era normalmente >95% (figura 8B). Las líneas celulares control derivadas de células CD25⁺ de sangre de cordón o de adulto no eran supresoras (figura 8B). Las líneas celulares derivadas de células CD25⁺ de adulto (aisladas directamente), manifestaron actividad supresora débil y variable (figuras 8A y 8B). Se notificó anteriormente que se requería sección basada en MACS rigurosa para generar líneas celulares significativas, potentes, supresoras en un subconjunto de donantes adultos. La supresión mediada por estas líneas (linaje CD25⁺⁺) se representa en las figuras 8A y 8B, lo que demuestra la constancia notable de las líneas celulares derivadas de sangre de cordón.

15 Para evaluar adicionalmente la potencia de supresión, se emprendieron experimentos de titulación. La disminución del número de supresores añadidos a cultivos de MLR estimulados con DC reveló que se mantenía casi toda la actividad inhibitoria de supresores derivados de sangre de cordón a una razón de 1:16 ó 1:32 (tan sólo 1500 células supresoras con respecto a 50.000 células respondedoras). Esto es más potente (~2 veces) que las líneas celulares derivadas de adulto más potentes seleccionadas (lin- pCD25⁺) (figura 2C). Las líneas celulares derivadas de células CD25⁺ de adulto seleccionadas directamente eran escasamente supresoras tras la titulación.

20 Como evaluación adicional de la potencia, se evaluaron líneas celulares supresoras en MLR donde habían madurado los estimuladores de DC. La activación/maturación de DC con lipopolisacárido (LPS), (ligando de TLR4), o la combinación de TNF/polilC (ligando de TLR 3 análogo de ARN bicatenario) (Cella, *et al*, 1999, J. Exp. Med., 189: 821-829), no evitó la supresión (figura 2D). Además, la inclusión de LPS o TNF/PolilC en el cultivo de MLR no evitó la supresión. Por tanto las células T_{reg} derivadas de cordón eran tan potentes como las líneas celulares de adulto mejor seleccionadas, y las DC activadas, que expresan abundantemente moléculas y citocinas coestimuladoras, no podían evitar su efecto supresor.

25 Las células supresoras de sangre de cordón alteran la producción de citocinas con menos efecto sobre la producción de quimiocinas

30 Para determinar los efectos de las líneas celulares supresoras sobre células T respondedoras en ensayos de MLR, se evaluaron los sobrenadantes para detectar la presencia y la magnitud de múltiples citocinas. La adición de células supresoras a ensayos de MLR redujo notablemente la acumulación de citocinas dependientes de activación de células T, incluyendo IL-2, IFN-gamma, GM-CSF, TNF- α e IL-10. De manera importante, los niveles de acumulación de TGF-beta-i no parecían estar alterados. La acumulación de citocinas dependientes de activación era mínima en todos los puntos de tiempo durante la MLR suprimida, representándose los resultados en el tiempo de la detección máxima en DC-MLR control (figura 9A). Estos datos demuestran una marcada alteración de activación de células T. Para determinar los efectos de la supresión sobre la expresión de quimiocinas seleccionadas, se evaluaron sobrenadantes de MLR para detectar la expresión de IL-8 (CXCL8), MIP-1 α (CCL3) y RANTES (CCL5), quimiocinas proinflamatorias. En puntos de tiempo tempranos, no se observó ningún efecto sobre la acumulación (figura 9B). Sin embargo, en puntos de tiempo tardíos en MLR, la acumulación disminuyó en aproximadamente el 50-75%. Por tanto, parece que la producción de quimiocinas se ve menos afectada por la supresión, y hay cierto grado de selectividad en los efectos de células supresoras.

40 Estudios de células T_{reg} CD4⁺CD25⁺ tanto de ser humano como de ratón no han revelado un mecanismo de acción claro de la supresión *in vitro* (Shevach, 2002, Nat. Rev. Immunol., 2: 389-400). De manera consecuente con estudios previos, las células supresoras cultivadas derivadas de sangre de cordón requerían contacto celular para realizar su función (no suprimían a través de una membrana semipermeable), y no eran citotóxicas. Puesto que se notifica de manera variable que TGF beta es un factor primario en la supresión mediada por células T_{reg} (Chen, *et al*, 2003, Cytokine Growth Factor Rev., 14: 85-89), y se notificó que rLAP alteraba la función supresora (Nakamura, *et al*, 2004, J. Immunol., 172: 834-842), se evaluó cuidadosamente la ruta de TGF-beta con múltiples reactivos neutralizantes, incluyendo rLAP. Se encontró que múltiples antagonistas de TGF-beta, incluso en diversas combinaciones, afectaban mínimamente a la supresión. Anticuerpos neutralizantes frente al factor inmunosupresor IL-10 o su receptor no tuvieron ningún efecto sobre la supresión. Esto concuerda con la falta de producción de IL-10 por las células supresoras de sangre de cordón incluso con estímulos activantes muy fuertes. Por tanto, en el sistema de MLR *in vitro* dado a conocer en el presente documento, ni TGF-beta ni IL-10 parecen ser los mediadores primarios de la supresión, y las moléculas que median en la supresión siguen sin caracterizarse.

EJEMPLO 5- Caracterización de células T_{reg} CD25RA⁺ de adulto humanas

Anticuerpos monoclonales

55 Para evaluar la purificación, se tiñeron células con anticuerpo anti-CD25-PE (clon M-A251) (BD Pharmingen, San Diego, CA), que no se bloquea por microperlas anti-CD25. Otros anticuerpos para citometría de flujo incluían anticuerpo anti-CD4-PerCP (clon SK.3), de (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA); anticuerpo anti-CD 152-PE (BNI3), anticuerpo anti-CD27-FITC (M-T271), anticuerpo anti-CD62L-APC (Dreg56), anticuerpo anti-CD69-FITC (FN50), anticuerpo anti-CD134 (ACT35), de (BD Pharmingen); y anticuerpo anti-GITR-PE (110416), de

(R&D Systems). En experimentos funcionales diseñados para bloquear la supresión, se usaron anticuerpos neutralizantes a 10 µg/ml. Los anticuerpos incluían anticuerpo anti-CTLA4(BNI3) (BD Pharmingen), anticuerpo anti-PDI (JI16) (eBioscience, San Diego, CA), anticuerpo anti-OX40 (L106) de (Becton Dickinson) y anticuerpo anti-GITR (MAB689), anticuerpo anti-GITR-L (MAB6941), anticuerpo anti-OX40L (MAB10541), anticuerpo anti-IL10 (MAB217), anticuerpo anti-IL10-Receptor-alfa (MAB274), anticuerpo anti-TGFbeta-1,2,3 (1D11), anticuerpo anti-TGFbeta-1 (MAB1835), anticuerpo anti-TGFbeta 1/1,2 de pollo policlonal (AF-101-NA), de (R&D Systems).

Las células supresoras cultivadas funcionan independientemente de IL-10 y TGF-beta

Para determinar si las líneas celulares supresoras cultivadas funcionan a través de proteínas reguladoras negativas de superficie celular o inmunosupresoras solubles conocidas, se trataron ensayos supresores de DC-MLR con anticuerpos monoclonales neutralizantes o bloqueantes. Se evaluaron los ensayos para detectar la reversión de la supresión mediante la reanudación de la proliferación. Inicialmente, se sometieron a prueba anticuerpos frente a IL-10, IL10R y TGF-beta_{1,2,3} solos o en diversas combinaciones con efecto mínimo. Sólo combinando los tres anticuerpos a altas dosis (30 µg/ml) se observó una reversión moderada y probablemente no específica de los efectos de supresión. Los cultivos control tratados con los tres anticuerpos también demostraron un aumento de la proliferación, similar a células T_{reg} tratadas con los tres anticuerpos.

Citometría de flujo

Para la tinción de inmunofluorescencia, se tiñeron las células durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron las células y se procesaron en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). Se analizaron los datos mediante el software FlowJo versión 4.5 (Treestar, Ashland, OR). Se realizó la tinción intracelular usando células fijadas en paraformaldehído al 2%, seguido por permeabilización y tinción en tampón que contenía saponina al 0,1%.

Análisis estadístico

Todas las barras de error representan una desviación estándar por encima y por debajo de la media.

Fenotipo de líneas supresoras derivadas de CD45RA⁺

Se analizaron las líneas celulares mediante citometría de flujo para detectar antígenos asociados con fenotipo de células supresoras. Se cultivaron líneas celulares supresoras en paralelo con líneas celulares derivadas de CD4⁺CD25⁺ que sirvieron como controles de células T convencionales. Las líneas celulares mantuvieron un fenotipo y una función relativamente estables durante las siguientes 3-5 semanas. Las líneas celulares CD25⁺ derivadas de CD45RA⁺ mantienen una expresión notablemente uniforme de múltiples antígenos, incluyendo CD25, CTLA4 intracelular, CD27 y CD62L. En comparación, las líneas celulares derivadas de CD45RA(-) eran heterogéneas para estos antígenos.

Las líneas celulares CD25⁺ derivadas de CD45RA⁺ mantuvieron una alta expresión de CD25 de superficie celular y CTLA4 intracelular, un patrón de expresión considerado típico del fenotipo de las células T_{reg}. Esto se produce a pesar del hecho de que otros antígenos de activación tales como CD69, CD71 y OX40 han regresado a la expresión de nivel inicial. Las líneas celulares supresoras derivadas de CD45RA⁺ también expresan uniformemente tanto CD62L como CD27. Dentro de las líneas celulares supresoras derivadas de adulto potentes, las células con función supresora residen dentro de este subconjunto doble positivo (Godfrey, *et al.*, 2004, Blood 104: 453-461). Las líneas celulares derivadas de CD25⁺ también mantienen la expresión de CD27, pero a un menor nivel que las líneas celulares derivadas de CD25⁺. Este patrón de expresión atenuado para CD27 también se observó con líneas celulares derivadas de CD25⁺ derivadas de adulto (Godfrey, *et al.*, 2004, Blood 104: 453-461).

EJEMPLO 6- Caracterización de células T_{reg} derivadas de sangre de cordón humana

PCR en tiempo real

Se extrajo el ARN total usando reactivo TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) o RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se sintetizó ADnc a partir de 1 µg de cada muestra de ARN usando mezcla maestra universal Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se usaron 10 ng en cada reacción de qPCR. Se procesaron todas las muestras AU por duplicado. Se adquirieron cebadores y sondas para FoxP3 y ciclofilina A de Applied Biosystems. Se realizó la PCR en tiempo real usando el instrumento ABI Prism 7900 (Advanced Biosystems). Se determinaron los niveles de mensaje de FoxP3 tras normalizar los datos para ciclofilina A.

Inmunotransferencia de tipo Western

Se prepararon extractos nucleares según las directrices del fabricante usando Active Motif (Carlsbad, CA) y se cargaron 70 µg de proteína por carril. Se procesaron las muestras en minigeles de Bis-Tris al 10% NuPage (Invitrogen). Se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-FoxP3 (AB2481) (Abeam, Cambridge, MA), seguido por anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-peroxidasa del rábano. Se revelaron las inmunotransferencias con el sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal WestPico (Pierce, Rockford, IL).

Análisis de citocinas

Se eliminaron por centrifugación las células de sobrenadantes de cultivo de MLR y se congelaron alícuotas a -80°C. Para las reestimulaciones, se usaron perlas anti-CD3/CD28 a una razón de uno a uno de perlas con respecto a células, o se usaron PMA a 2 ng/ml e ionomicina a 500 ng/ml. Se cultivaron las células a 1 millón de células/ml de medio en placas de 24 pocillos. Se evaluaron los sobrenadantes mediante el sistema de ensayo Luminex con un sistema de múltiples analitos basado en perlas de látex (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Anticuerpos monoclonales

Para evaluar la purificación, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD25-PE (clon M-A251) (BD Pharmingen, San Diego, CA), que no está bloqueado por microperlas anti-CD25. Otros anticuerpos para la citometría de flujo incluían anticuerpo anti-CD4-PerCP (clon SK3; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA); anticuerpo anti-CD152-PE (BNB), anticuerpo anti-CD27-FITC (M-T271), anticuerpo anti-CD62L-APC (Dreg56), anticuerpo anti-CD69-FITC (FN50), anticuerpo anti-CD134 (ACT35), de (BD Pharmingen); y anticuerpo anti-GITR-PE (110416), anticuerpo anti-LAP biotinilado (27240) de (R&D Systems). En experimentos funcionales diseñados para bloquear la supresión, se usaron anticuerpos neutralizantes a 10 µg/ml. Los anticuerpos incluían anticuerpo anti-CTLA4 (BN13) (BD Pharmingen), anticuerpo anti-PDI (JI 16) (eBioscience, San Diego, CA), anticuerpo anti-OX40 (L106; Becton Dickinson), y anticuerpo anti-GITR (MAB689), anticuerpo anti-GITR-L (MAB6941), anticuerpo anti-OX40L (MAB10541), anticuerpo anti-IL10 (MAB217), anticuerpo anti-IL10-Receptor-alfa (MAB274), anticuerpo anti-TGFbeta-u.s OD1 1), anticuerpo anti-TGFbeta-i (MAB1835), anticuerpo anti-TGFbetai/i 2 de pollo policlonal (AF-101-NA), anticuerpo anti-TGFbetaRH de cabra policlonal (AF-241-NA), anticuerpo anti-LAP (MAB246), anticuerpo anti-LAP de cabra policlonal (AF-246-NA), LAP recombinante (246-LP), y TGF-betaRII-Ig recombinante (1003-RT; R&D Systems).

Citometría de flujo

Para la tinción de inmunofluorescencia, se tiñeron las células durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron las células y se procesaron en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). Se analizaron los datos mediante el software FlowJo versión 4.5 (Treestar, Ashland, OR). Se realizó la tinción intracelular usando células fijadas en paraformaldehído al 2%, seguido por permeabilización y tinción en tampón que contenía saponina al 0,1%.

Expresión de FoxP3 y fenotipo de líneas supresoras derivadas de sangre de cordón

Se analizaron las líneas celulares mediante citometría de flujo para detectar antígenos asociados con fenotipo de células supresoras. Se cultivaron líneas celulares supresoras en paralelo con líneas celulares derivadas de CD4⁺CD25⁺ que sirvieron como controles de células T convencionales. Se evaluaron las líneas celulares tras 3 semanas de cultivo, momento en el que la activación basada en perlas casi se había resuelto, y las células habían regresado a un estado más quiescente. Las líneas celulares mantuvieron un fenotipo y una función relativamente estables durante las siguientes 3-5 semanas. Las líneas celulares CD25⁺ derivadas de cordón mantienen una expresión notablemente uniforme de múltiples antígenos, incluyendo CD25, CTLA4 intracelular, CD27 y CD62L (figura 10A). En comparación, las mejores líneas celulares supresoras derivadas de adulto, generadas mediante la purificación más rigurosa, eran ligeramente heterogéneas para estos antígenos (figuras 10A y 10B).

Las líneas celulares CD25⁺ derivadas de cordón mantenían una alta expresión de CD25 de superficie celular y CTLA4 intracelular, un patrón de expresión considerado típico del fenotipo de células T_{reg} (figura 10A). Esto se produce a pesar del hecho de que otros antígenos de activación tales como CD69, CD71 y OX40 han regresado a la expresión de nivel inicial. Las líneas celulares supresoras derivadas de cordón también expresan uniformemente tanto CD62L como CD27 (figura 10B). Se demostró anteriormente que dentro de líneas celulares supresoras derivadas de adulto potentes, las células con función supresora residen dentro de este subconjunto doble positivo (Godfrey, *et al.*, 2004, Blood 104: 453-461). Las líneas celulares derivadas de CD25 también mantienen la expresión de CD27, pero a un nivel menor que líneas celulares derivadas de CD25⁺. Este patrón de expresión atenuado para CD27 también se observó con líneas celulares derivadas de CD25 derivadas de adulto (Godfrey, *et al.*, 2004, Blood 104: 453-461).

Se ha propuesto que la expresión del factor de transcripción FoxP3 es el marcador más específico para células reguladoras en ratones (Ramsdell, *et al.*, 2003, Curr. Opin. Immunol., 15: 718-24). Los resultados dados a conocer en el presente documento demuestran que el mensaje de FoxP3 se expresaba a niveles superiores en células y líneas CD25⁺ en comparación con células T y líneas CD25⁻. Las células CD25⁺ recién aisladas de sangre de cordón contenían aproximadamente 64 veces más mensaje que células CD4⁺CD25⁻, o células T CD8⁺ nuevas (figura 11A). Las líneas celulares derivadas de CD25⁺ cultivadas contenían 2-4 veces más mensaje que células CD25⁺ recién aisladas. Aunque los niveles de mensaje son bajos en células CD25⁻ en aislamiento, aumentan aproximadamente 25-30 veces en cultivo. Esto se produjo incluso con depleción exhaustiva de células atenuadas/positivas para CD25 antes del cultivo (figura 11A). La reestimulación adicional de los cultivos celulares de 3-6 semanas de edad con perlas anti-CD3/CD28 no aumentó la expresión de mensaje, sino que más bien disminuyó ligeramente en ambos tipos de líneas celulares.

En contraposición a los datos con niveles de mensaje de ARNm, la inmunotransferencia de tipo Western con un

anticuerpo policlonal reveló que la expresión de proteína FoxP3 se expresaba principalmente en las líneas celulares derivadas de CD25⁺. A pesar de la expresión del mensaje, las líneas celulares derivadas de CD25⁻ expresaban niveles mínimos/de fondo de proteína FoxP3 (figura 11B). De manera importante, la reestimulación de las líneas celulares CD25⁺ aumentó notablemente la expresión de proteína FoxP3. El aumento en el nivel de proteína FoxP3 se produjo a pesar del cambio mínimo (disminución real) en los niveles de mensaje. La reestimulación de células CD25⁻ no indujo todavía proteína FoxP3 en líneas celulares derivadas de CD25⁻.

Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran varias facetas interesantes de la regulación de proteína y mensaje de ARNm de FoxP3. Y lo que es más importante, se encontró que la proteína FoxP3 era relativamente específica para células supresoras derivadas de CD25⁺, y estaba mínimamente presente en líneas celulares derivadas de CD25⁻. También se determinó que incluso líneas derivadas de células T CD4⁺ sometidas a depleción exhaustiva de CD25 podrían producir cantidades significativas de mensaje de FoxP3 tras la activación del cultivo, aproximadamente 20-30 veces más frente a células CD25⁻ en reposo. La discordancia entre expresión de proteína y ARNm de FoxP3 indica que los niveles de mensaje de FoxP3 no identifican ni cuantifican necesariamente células supresoras. Además, células CD25⁺ reestimuladas expresaban mucha más proteína FoxP3 a pesar de la disminución de los niveles de mensaje. Estos hallazgos indican que la expresión de FoxP3 aumenta con la activación, y sugieren que mecanismos postranscripcionales pueden contribuir a la regulación de la expresión de proteína FoxP3.

La reactivación de líneas celulares supresoras induce una producción de citocinas mínima y una expresión potenciada de LAP TGF-beta de superficie

Para determinar las capacidades funcionales de las líneas de células T supresoras frente a convencionales, se evaluaron estas células para determinar su potencial para la producción de citocinas y la expresión de moléculas de superficie celular tras reestimulación. Se reestimularon las líneas celulares con perlas anti-CD3/CD28 para lograr una reactivación potente, y se recogieron los sobrenadantes en puntos de tiempo definidos para el análisis del contenido en citocinas mediante ensayo basado en perlas Luminex. Las líneas celulares derivadas de CD25⁺ no produjeron esencialmente IL-2, IFN- γ ni IL-10 (figura 12A), mientras que las líneas celulares derivadas de CD25⁻ control produjeron altos niveles de estas citocinas. La acumulación de TNF, GM-CSF, IL-5 y la quimiocina IL-8 también se redujo notablemente en comparación con líneas celulares control (figura 12A). En cambio, la acumulación de TGF-beta, y las quimiocinas MIP1 α y RANTES no eran significativamente diferentes entre diferentes líneas celulares.

La reestimulación de las líneas celulares con los agentes farmacológicos PMA e ionomicina, que pueden evitar rutas de señalización proximales, conduce a niveles casi equivalentes de producción de citocinas por las líneas celulares derivadas tanto de CD25⁺ como de CD25⁻ (figura 12B). Por tanto, las líneas celulares derivadas de CD25⁺ parecen tener alteraciones de señalización de TCR y CD28 proximales que impiden la producción normal de múltiples citocinas. Además, las líneas celulares derivadas de CD25⁺ tenían una producción alterada de la citocina inmunosupresora IL-10, que no se restauró por la estimulación con PMA/ionomicina. Esto sugiere que la producción de IL-10 no es probablemente un mecanismo de supresión importante que se ve afectado por las líneas celulares derivadas de CD25⁺.

Para determinar si la activación general de líneas celulares CD25⁺ derivadas de sangre de cordón estaba alterada, se evaluó la expresión de antígenos de activación de superficie celular mediante análisis de citometría de flujo. Se reestimularon las líneas celulares con perlas anti-CD3/CD28 y se evaluaron tras el cultivo durante la noche para detectar expresión de CD69, OX40 (CD 134) y GITR. Los tres antígenos volvían a expresarse en las líneas celulares derivadas tanto de CD25⁺ como de CD25⁻ (figura 12C). La expresión de OX40 y GITR parecía ligeramente potenciada en las líneas celulares derivadas de CD25⁺ frente a las líneas celulares CD25⁻ reactivadas (McHugh, *et al*, 2002, *Immunity* 16: 311-323). De manera importante, la reactivación de las líneas celulares CD25⁺ estaba relativamente intacta, tal como se determinó mediante análisis de expresión de antígenos de activación de superficie celular, en contraposición a los resultados mostrados para la acumulación de citocinas.

Se ha notificado que la expresión en la superficie celular de la proteína asociada a latencia (LAP) TGF beta, la proteína precursora de TGF beta, está asociada con células T_{reg} (Nakamura, *et al*, 2004, *J. Immunol*, 172: 834-842). Además, se ha notificado recientemente que formas recombinantes de esta proteína neutralizan parcialmente la función supresora (Nakamura, *et al*, 2004, *J. Immunol*, 172: 834-842). Por tanto, se evaluó la expresión de LAP en las líneas celulares derivadas de CD25⁺ y CD25⁻. Ni la línea CD25⁺ ni la CD25⁻ expresaban esta proteína tras el cultivo durante 3-6 semanas, sin embargo, tras la reestimulación con perlas anti-CD3/CD28, había una expresión distinta de LAP de superficie celular en las líneas celulares derivadas de CD25⁺ (figura 12D), pero no en las líneas celulares derivadas de CD25⁻. No pudo detectarse expresión en la superficie celular de TGF-beta.

Se encontró que las células supresoras (en la reestimulación) tenían un potencial limitado para la producción de citocinas. Había una falta profunda de producción de IL-2, IFN-gamma e IL-10, y una capacidad notablemente reducida para producir GM-CSF, TNF, IL-5 e IL-8. En cambio, la activación tal como se evaluó por la expresión regulada por incremento de CD69, OX40 y GITR, y la producción de MIP-1 α y RANTES, estaba generalmente intacta. De manera interesante, se restauró la capacidad de producción de citocinas con estimulación con PMA/ionomicina. Esto indica un bloqueo de señalización de TCR proximal parcial en las células supresoras, y

concuera con las características de respuesta anérgica de las células supresoras a la estimulación con TCR.

Las células supresoras cultivadas funcionan mediante un mecanismo desconocido independiente de IL-10, TGF-beta y múltiples moléculas coestimuladoras

5 Para determinar si las líneas celulares supresoras cultivadas funcionan a través de proteínas reguladoras negativas de superficie celular o inmunosupresoras solubles conocidas, se trataron ensayos supresores de DC-MLR con anticuerpos monoclonales neutralizantes o bloqueantes. Se evaluaron los ensayos para detectar la reversión de la supresión mediante la reanudación de la proliferación. Inicialmente, se sometieron a prueba anticuerpos frente a IL-10, IL-10R y TGF-beta 1,2,3 solos o en diversas combinaciones con efecto mínimo. Sólo combinando los tres anticuerpos a altas dosis (30 µg/ml) se observaron efectos moderados y probablemente no específicos (figura 13A).
 10 Los cultivos control tratados también demostraron un aumento de la proliferación. También se sometieron a prueba anticuerpos frente a las moléculas de señalización coestimuladoras negativas CTLA4 y PDI y se encontró que no tenían esencialmente ningún efecto por sí mismas, sino de nuevo sólo en combinación se observó un efecto marginal sobre la supresión (figura 13B). Se sometieron a prueba anticuerpos agonistas frente a receptores cuya señalización se notifica que suprime o reduce la función supresora de células T_{reg} murinas en reposo, GITR (Ji, *et al*, 2004, J. Immunol., 172: 5823-5827) y OX40 (CD134) (Takeda, *et al*, 2004, J. Immunol, 172: 3580-3589), y se encontró que tenían efectos mínimos sobre las células supresoras cultivadas. El anticuerpo agonista frente a OX40 parecía alterar la función supresora en algunos donantes más que en otros (media del 32% de reversión, n=6, intervalo 15-75%). Sin embargo, el anticuerpo agonista frente a OX40 también aumentaba la magnitud de la MLR control, en correlación aproximada con la magnitud de reversión de la supresión (figura 13C). Anticuerpos frente a
 15 OX40L inhibían la MLR (con variabilidad de donante) pero también aumentaban la magnitud aparente de la supresión (media del 96% de supresión, n=5, intervalo 90-98%, frente al 90% para cultivos control) (figura 7C).

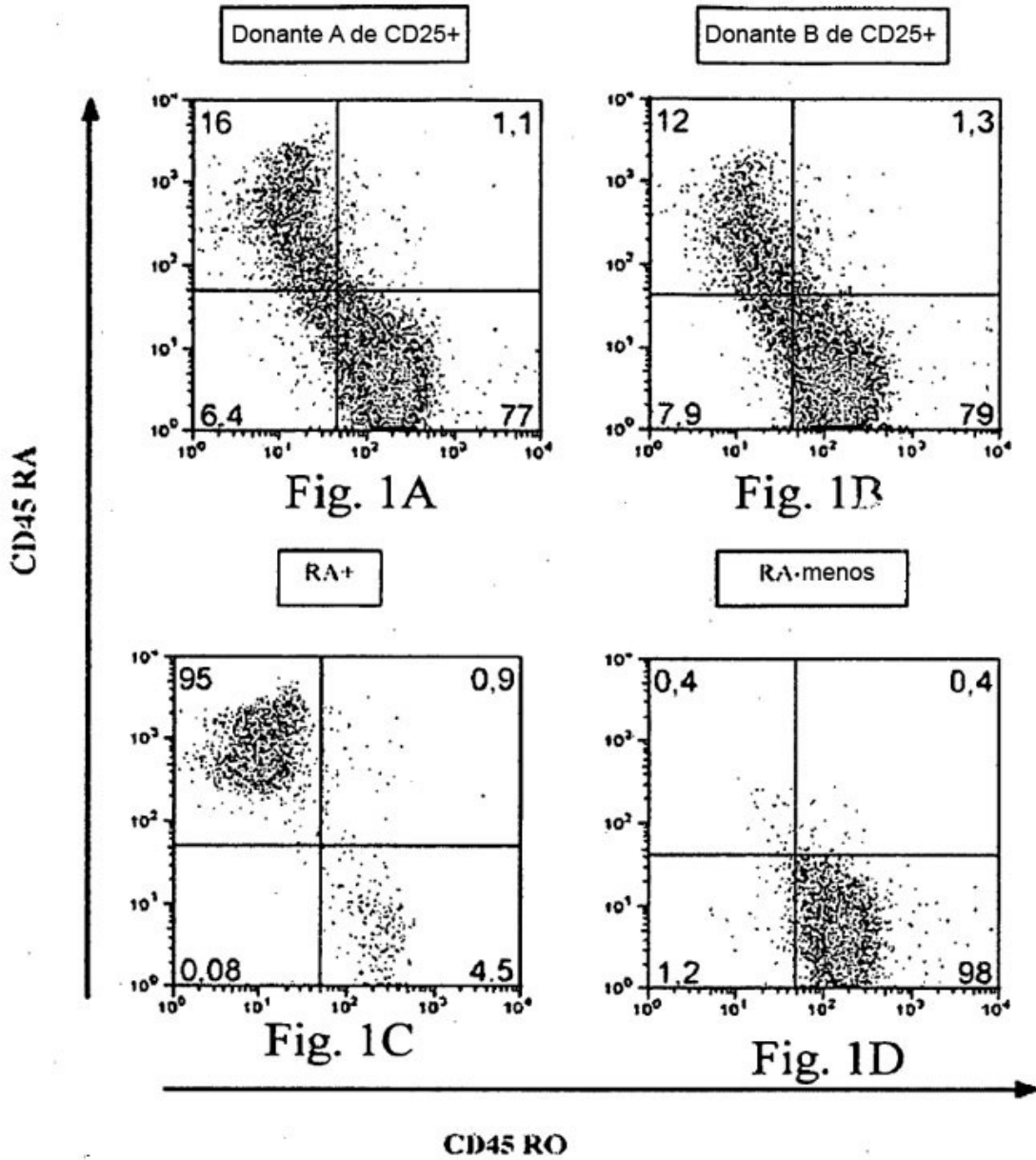
Debido a la expresión aumentada de LAP de superficie celular específica en células supresoras cultivadas reactivadas, y a la importancia sugerida de TGF-beta para la función supresora (Nakamura, *et al*, 2004, J. Immunol, 172: 834-842; Chen, *et al*, 2003, Cytokine Growth Factor Rev., 14: 85-89), se evaluaron múltiples agonistas de la
 25 ruta de TGF beta. Se sometieron a prueba anticuerpos neutralizantes, tanto monoclonales como policlonales, receptores solubles, LAP recombinante y anticuerpo frente a LAP en el sistema de MLR. Ninguno de los reactivos solos o en múltiples combinaciones pudo revertir la supresión mediada por las líneas celulares T_{reg} cultivadas. Se realizaron experimentos con un menor número de células supresoras, específicamente una razón 1:10 de células respondedoras con respecto a estimulador, para minimizar la potencia de la supresión, dando como resultado una inhibición de aproximadamente el 50% en MLR control. Incluso en estas condiciones, se observaron efectos
 30 mínimos (figura 13D).

Estos estudios demuestran que la sangre de cordón, en comparación con la sangre de adulto, es una fuente mejorada para el aislamiento y cultivo de células T_{reg}. Se aislaron líneas celulares supresoras potentes de prácticamente todos los donantes, y estos resultados se obtuvieron con una purificación basada en MACS directa sencilla. Los perfiles de citometría de flujo de la expresión de antígeno en líneas celulares T_{reg} de sangre de cordón eran sorprendentemente uniformes. Se usó este sistema para caracterizar adicionalmente el fenotipo y la función de
 35 células supresoras.

REIVINDICACIONES

1. Método para proporcionar células T_{reg} , que son células supresoras potentes, a partir de una población de células sanguíneas con fenotipo $CD45RA^+$, para suprimir la proliferación de células T con una actividad supresora potente mayor del 95% de supresión de reacción mixta de linfocitos alérgica, comprendiendo el método:
 - a) aislar una población de células mononucleares de una muestra de sangre de cordón umbilical humana;
 - b) poner en contacto dicha población de células mononucleares con un anticuerpo que se une específicamente a CD25 en condiciones adecuadas para la formación de un complejo célula mononuclear-anticuerpo;
 - c) separar sustancialmente dicho complejo célula mononuclear-anticuerpo de dicha población de células mononucleares; aislando de ese modo dichas células T_{reg} a partir de una población de células sanguíneas con fenotipo $CD45RA^+$; y
 - d) que comprende multiplicar las células T_{reg} aisladas obtenidas tras c) cultivando dichas células T_{reg} sin células alimentadoras en un medio que comprende un anticuerpo frente a CD3, un anticuerpo frente a CD28 y adicionalmente IL-2.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo que se une específicamente a CD25, dicho anticuerpo frente a CD3 o dicho anticuerpo frente a CD28 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo aislado, una muestra biológica que comprende un anticuerpo, un anticuerpo unido a un soporte físico y un anticuerpo unido a una célula.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo sintético, un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo, y combinaciones de los mismos.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho fragmento biológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv y un fragmento scFv.
5. Método según la reivindicación 2, en el que dicho soporte físico se selecciona del grupo que consiste en una microperla, una perla magnética, una columna de absorción y una membrana de adsorción.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho complejo célula mononuclear-anticuerpo se separa sustancialmente de dicha población de células mononucleares mediante un método seleccionado del grupo que consiste en clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y clasificación celular activada por magnetismo (MACS).
7. Método según la reivindicación 1, en el que se repiten las etapas b) y c).
8. Método según la reivindicación 1, en el que dicha célula T_{reg} expresa antígenos CD25, CD4 y CTLA4 y uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en CD27, CD26L y FoxP3.

35



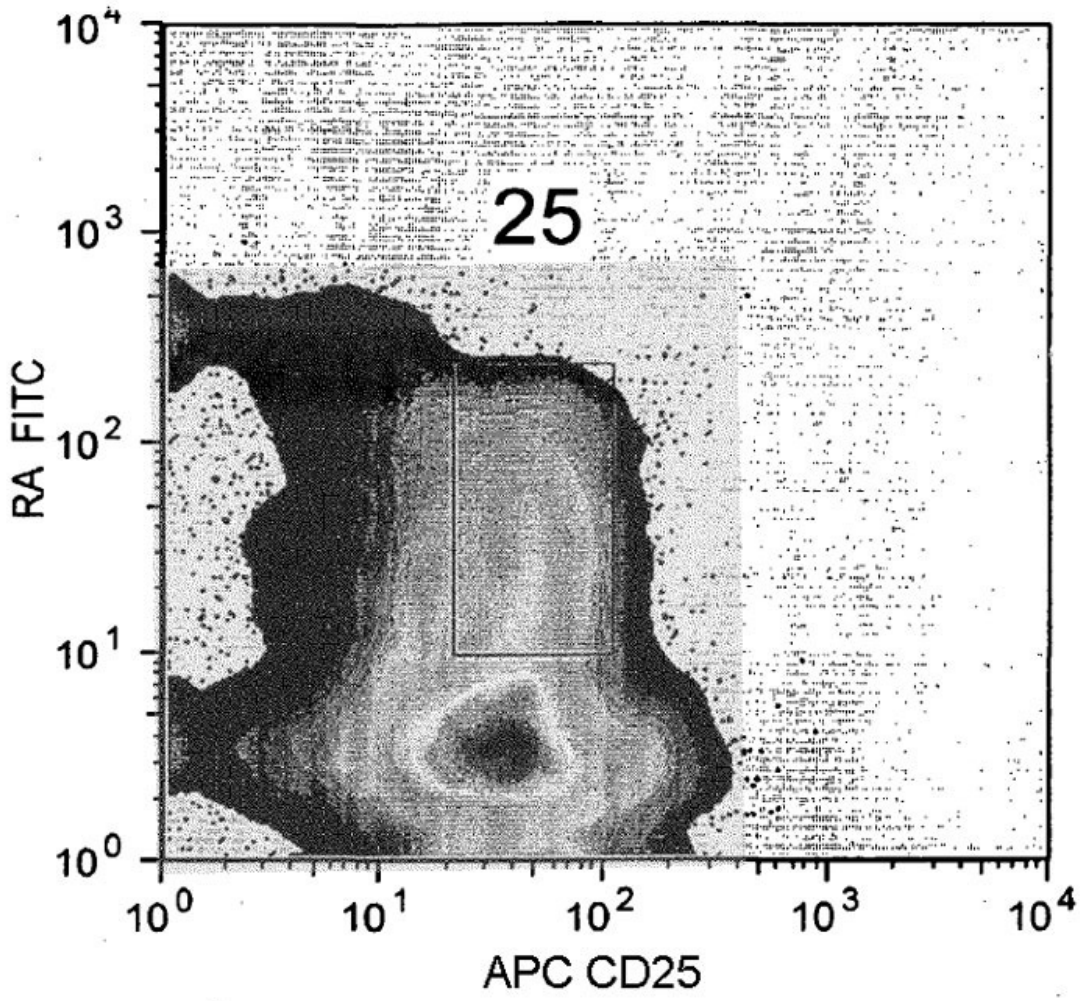


Fig. 2

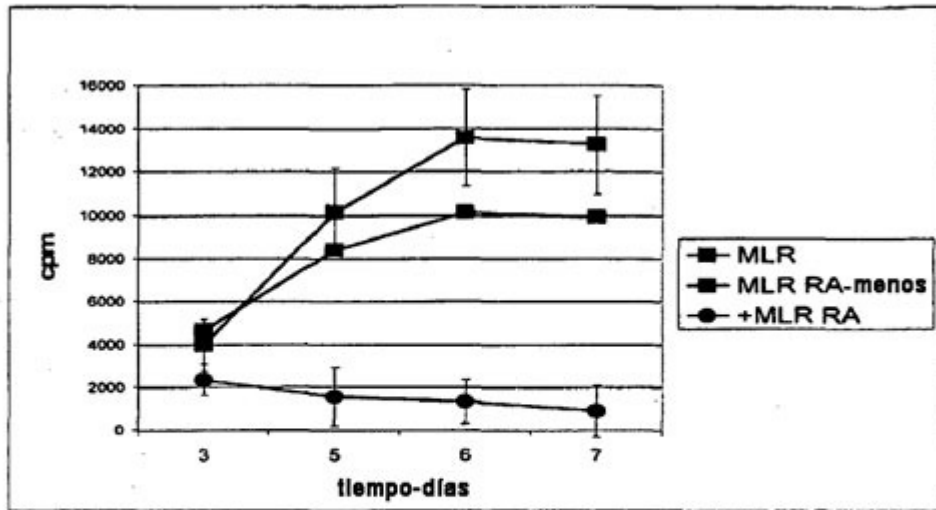


Fig. 3A

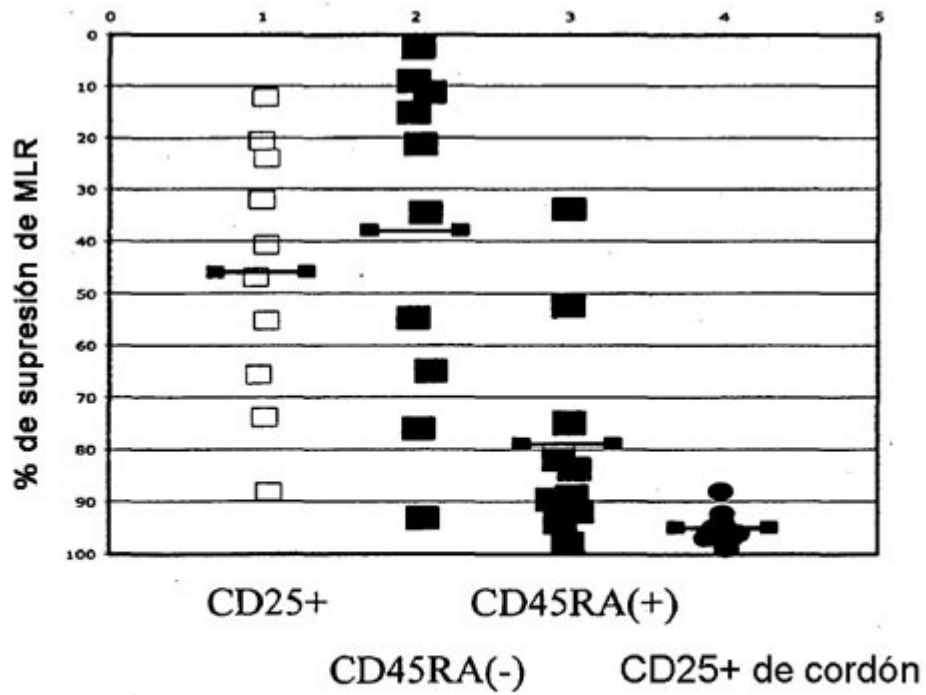


Fig. 3B

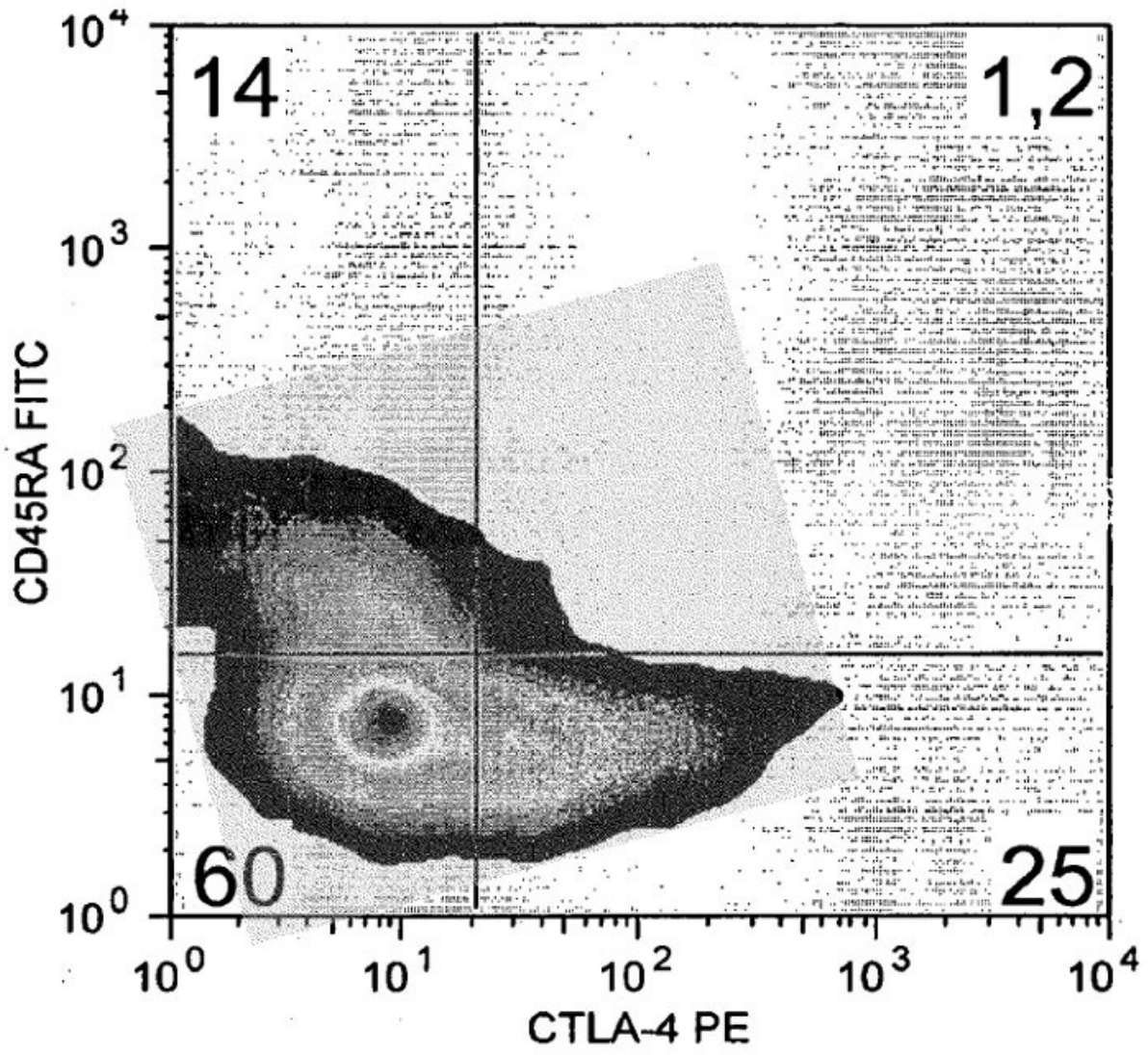


Fig. 4A

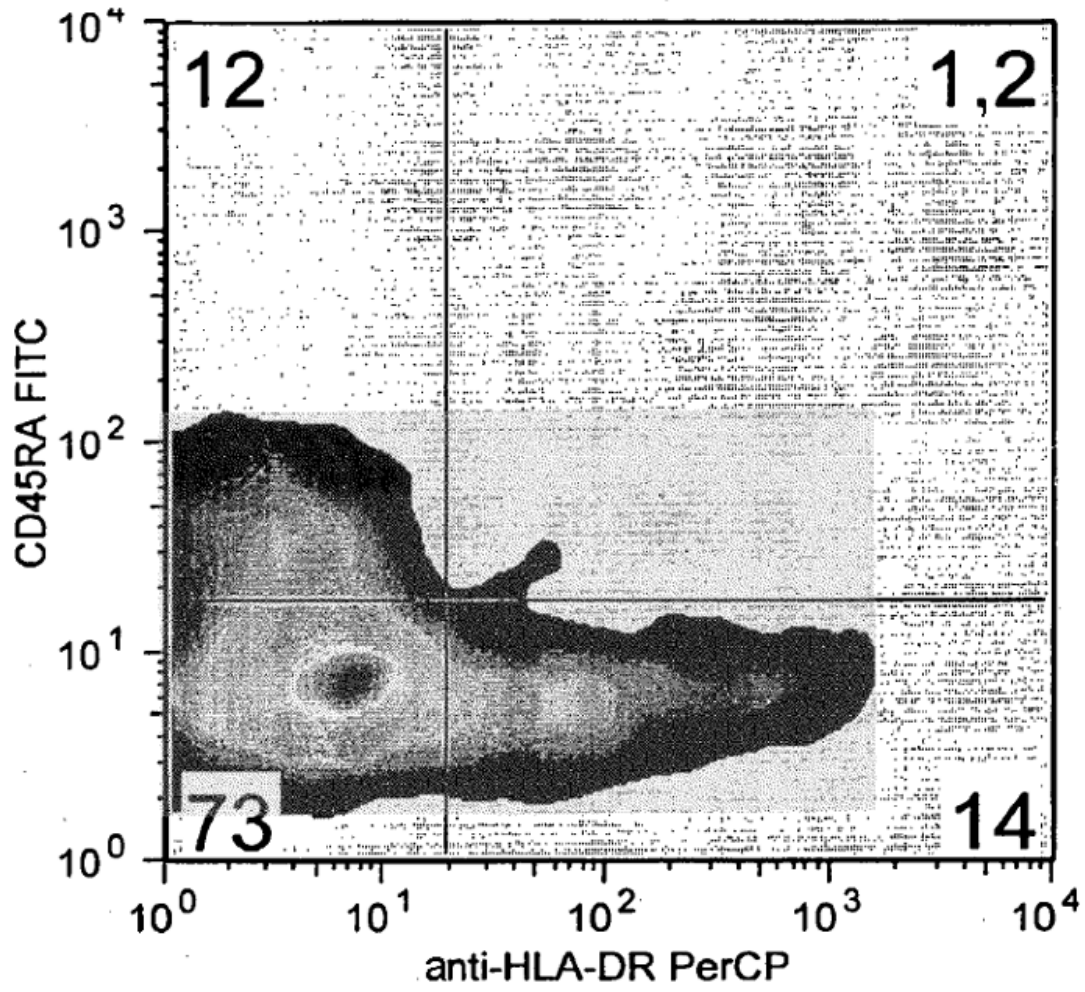


Fig. 4B

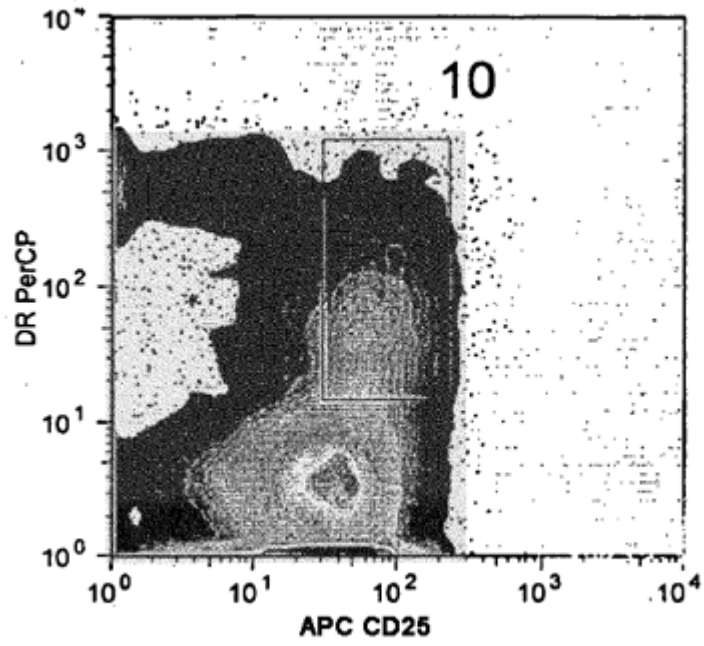


Fig. 4B

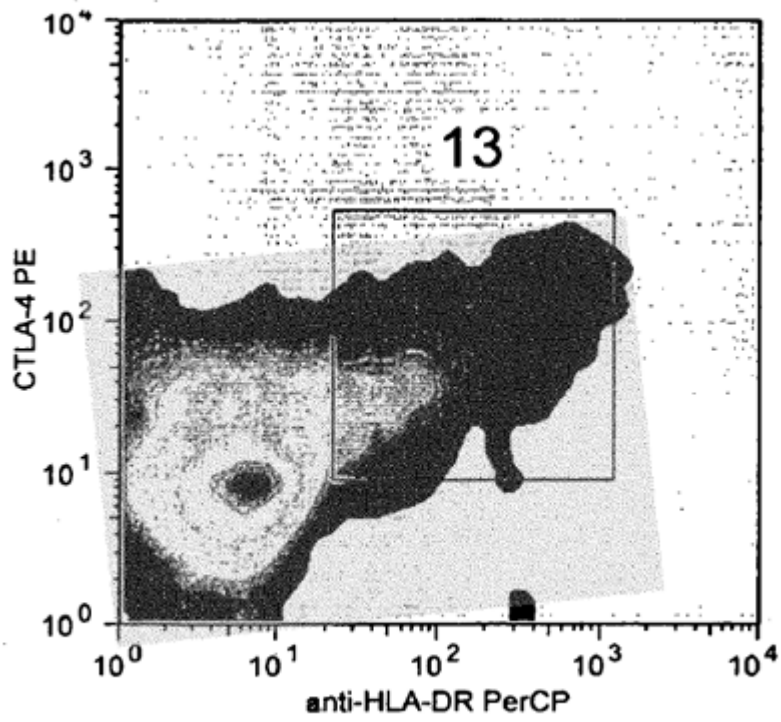


Fig. 4C

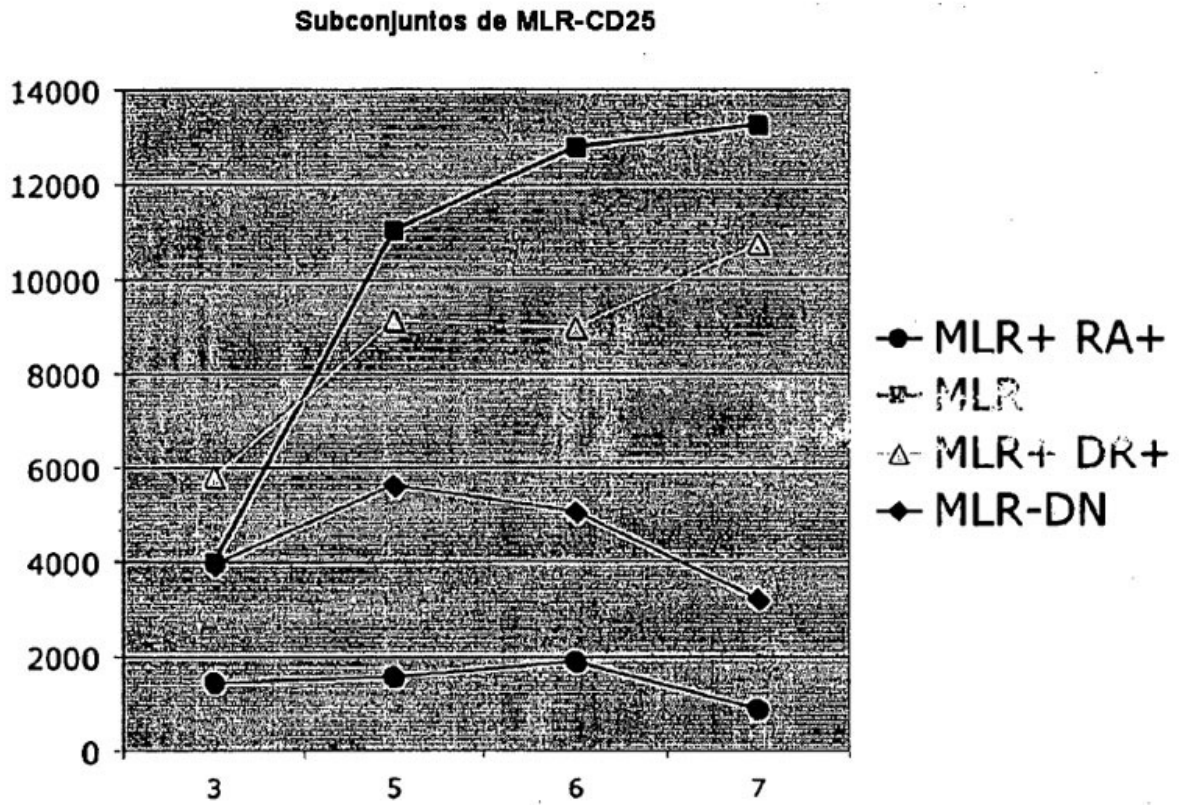
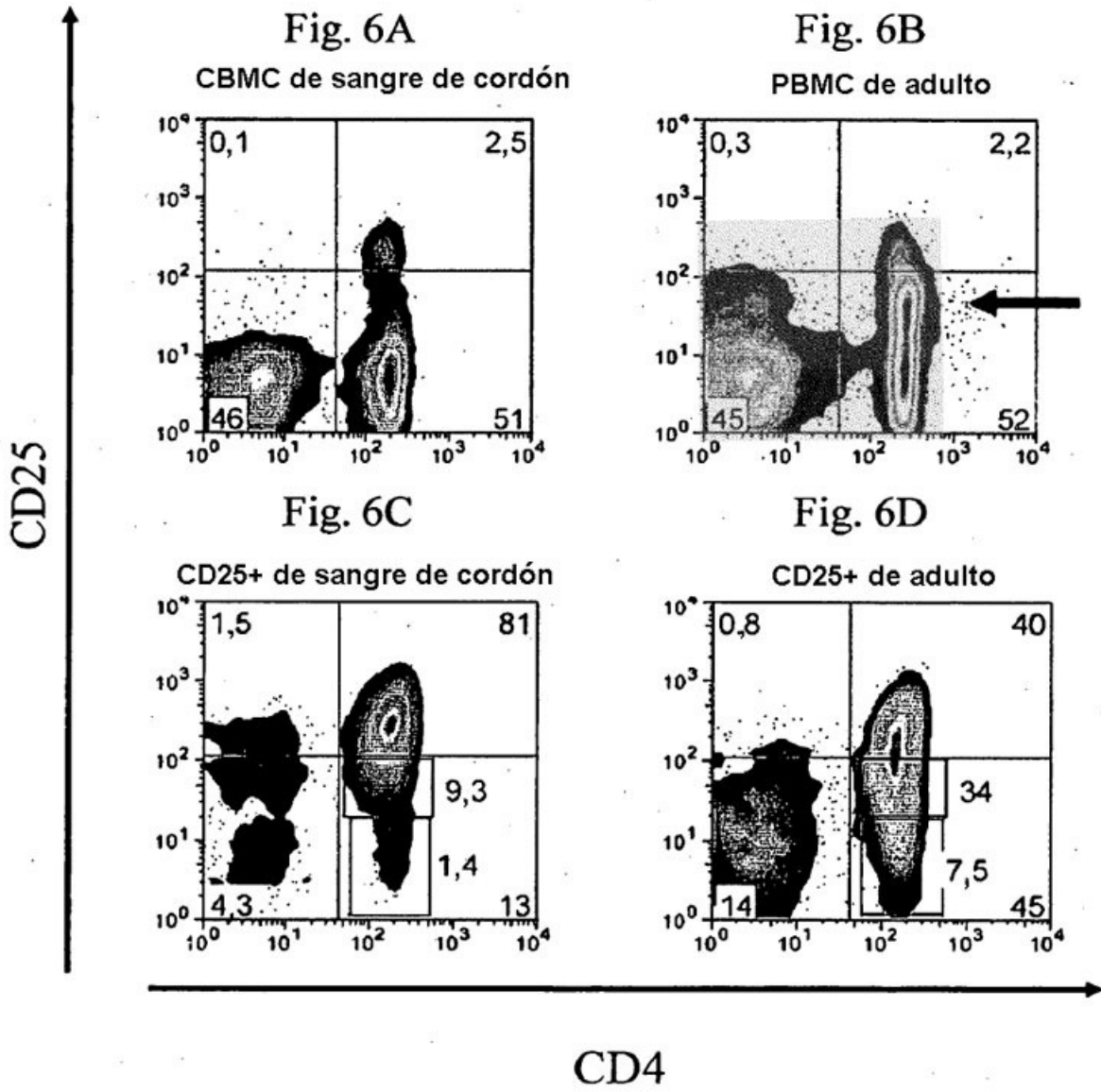


Fig. 5



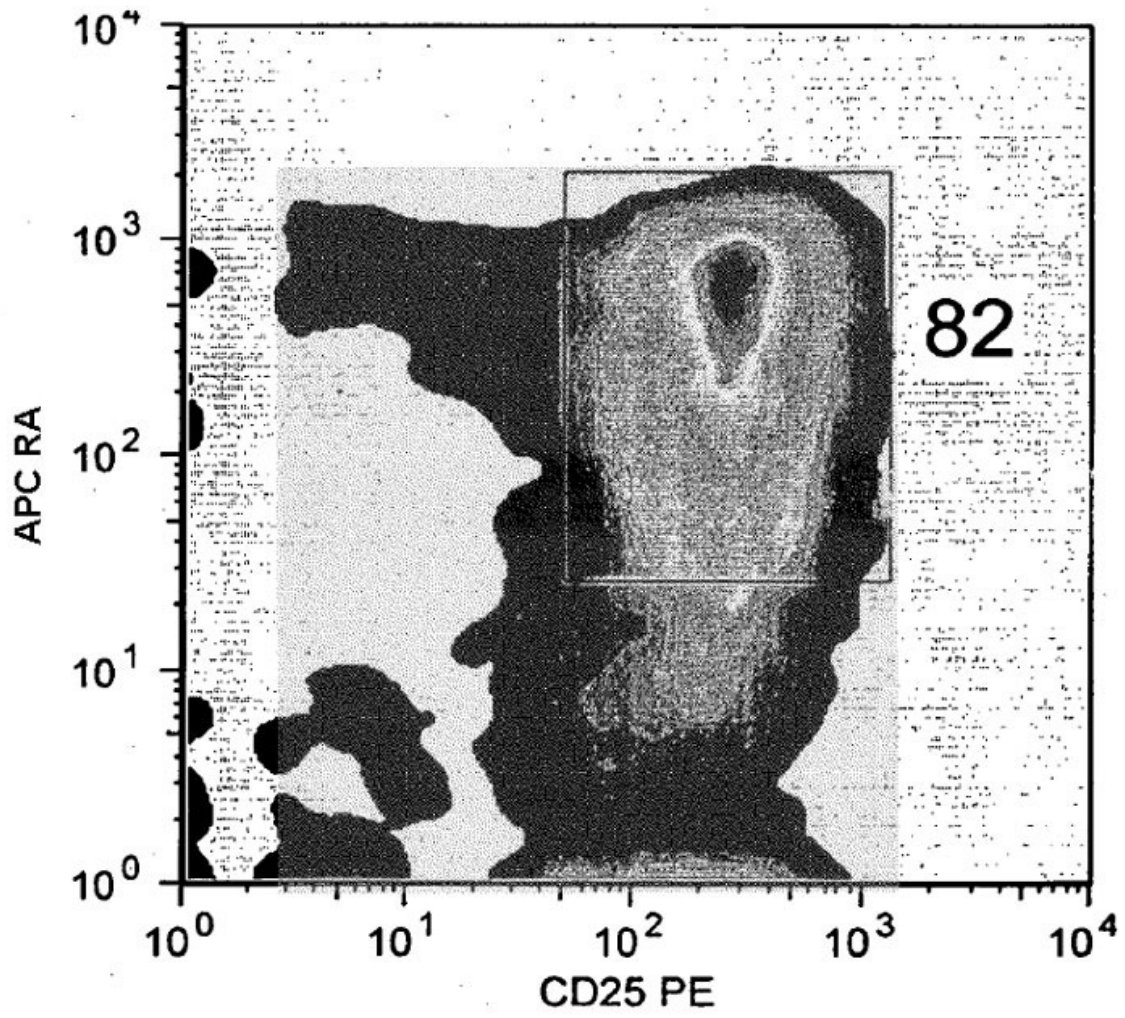


Fig. 7

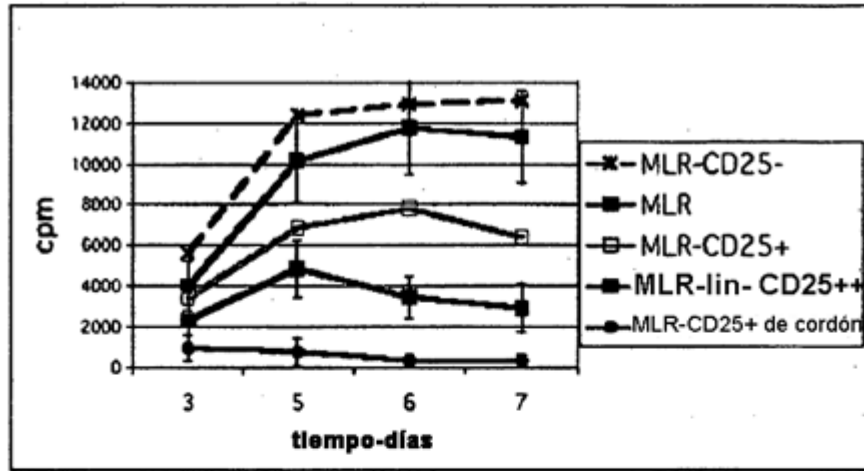


Fig. 8A

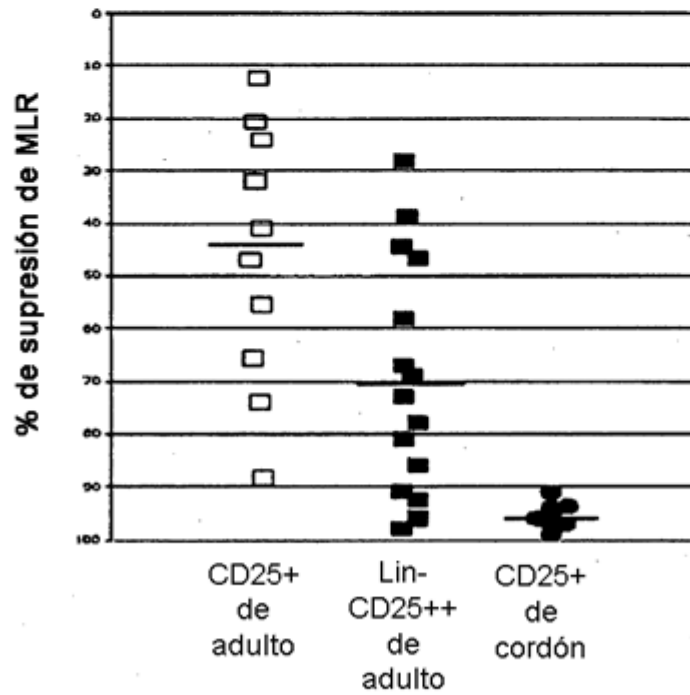


Fig. 8B

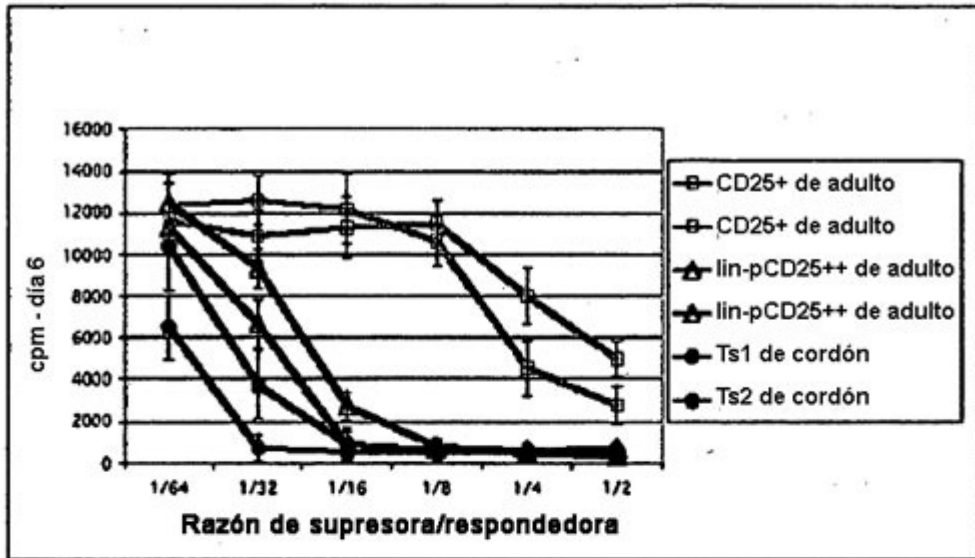


Fig. 8C

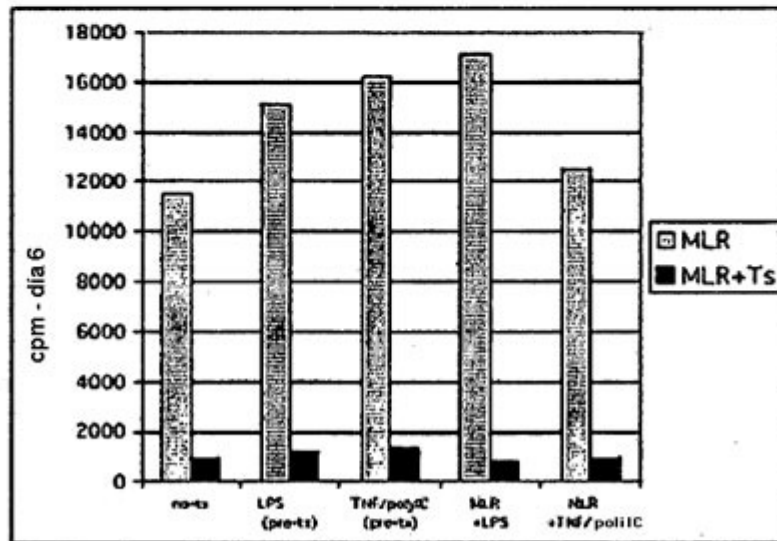


Fig. 8D

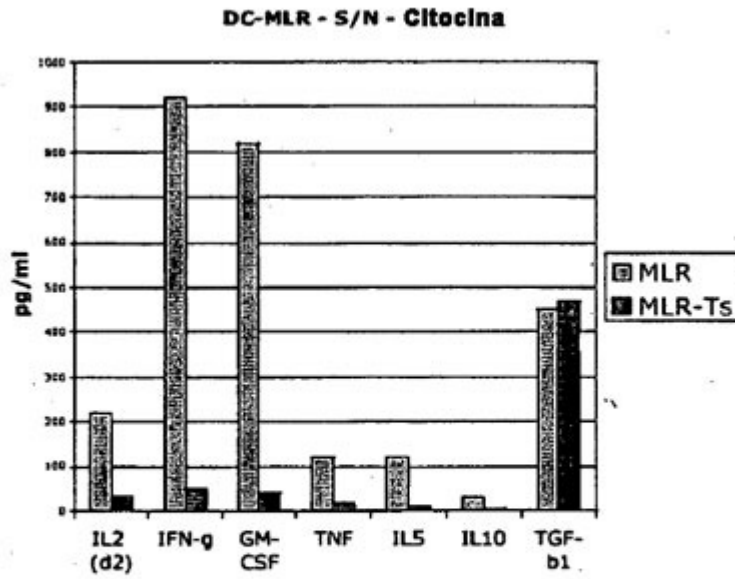


Fig. 9A

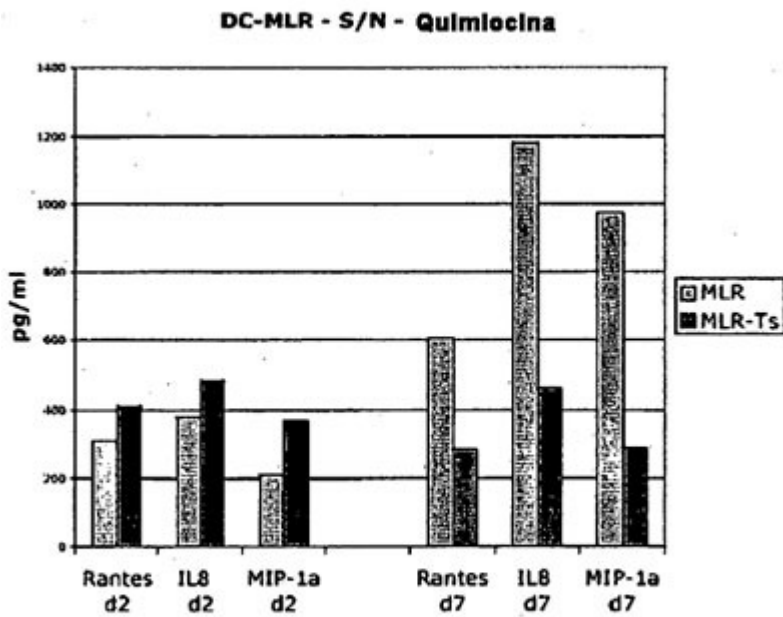


Fig. 9B

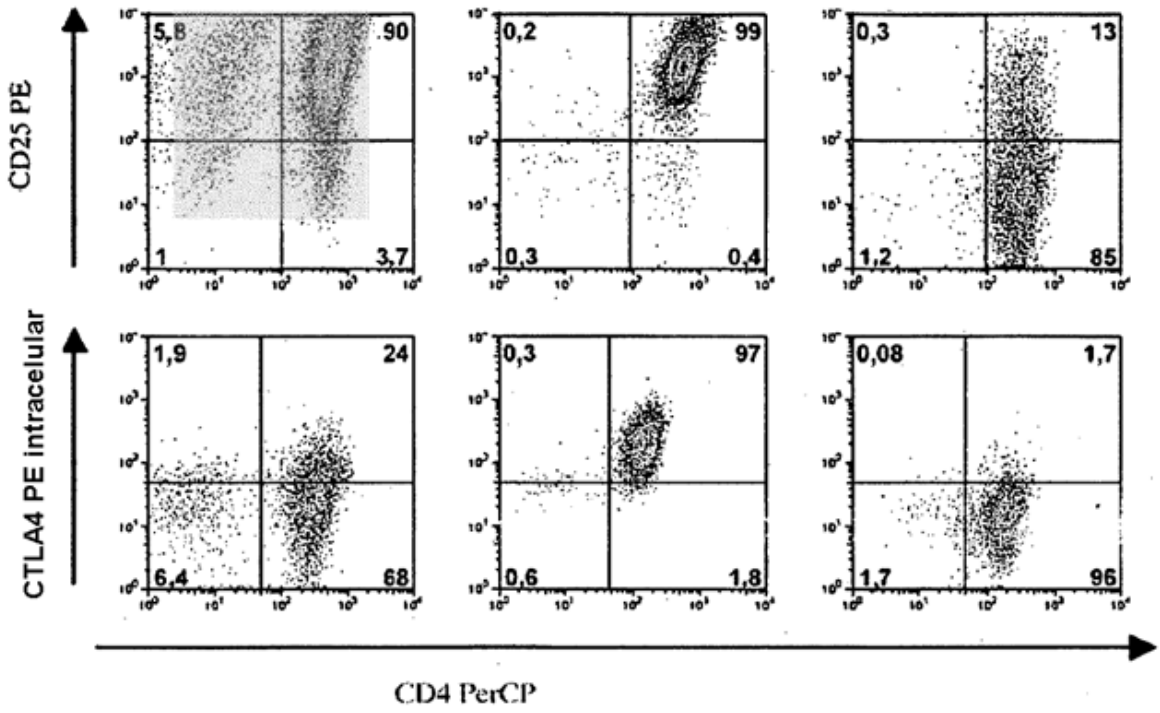


Fig. 10A

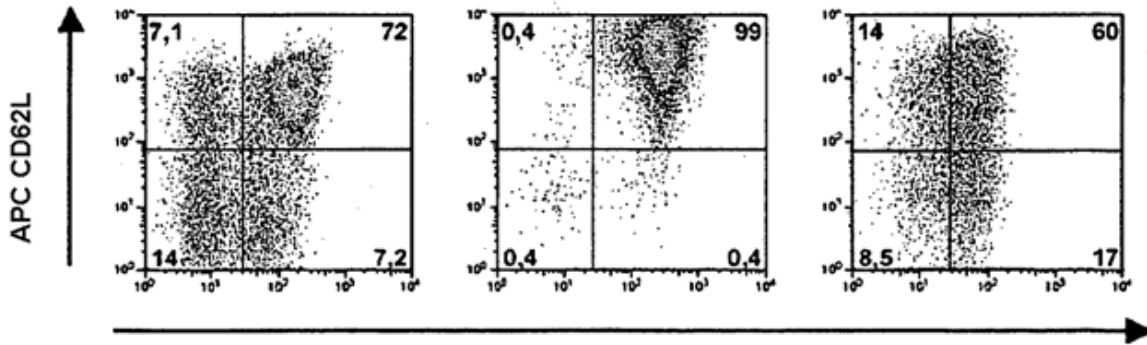


Fig. 10B

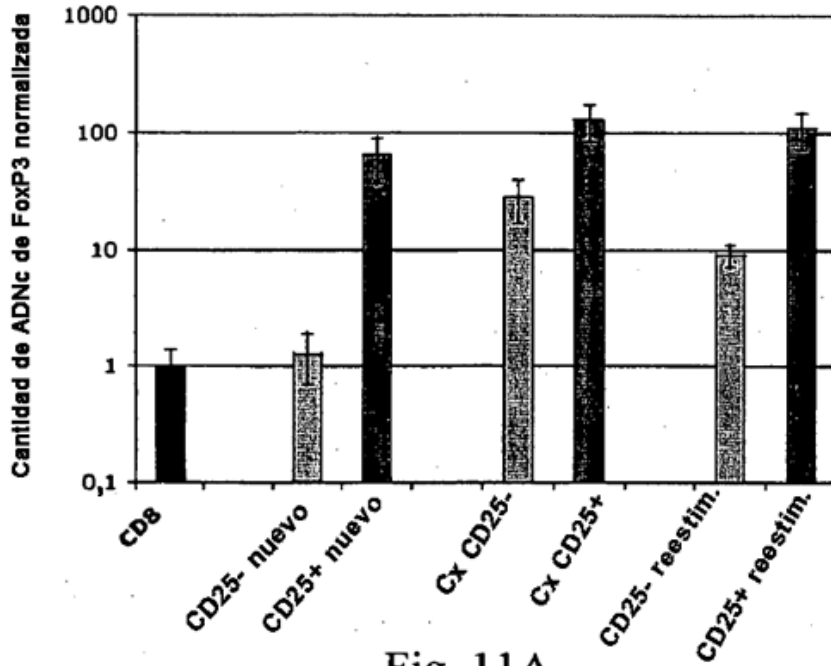


Fig. 11A

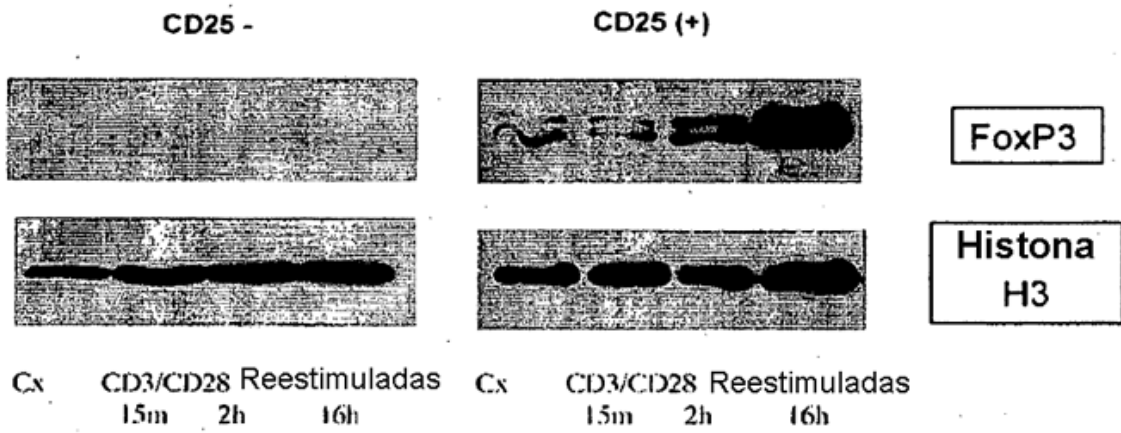


Fig. 11B

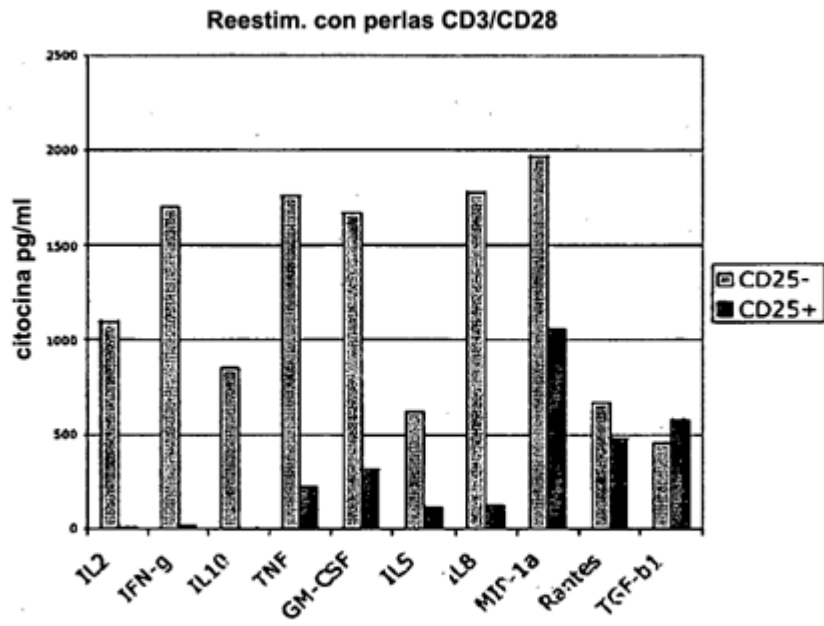


Fig. 12A

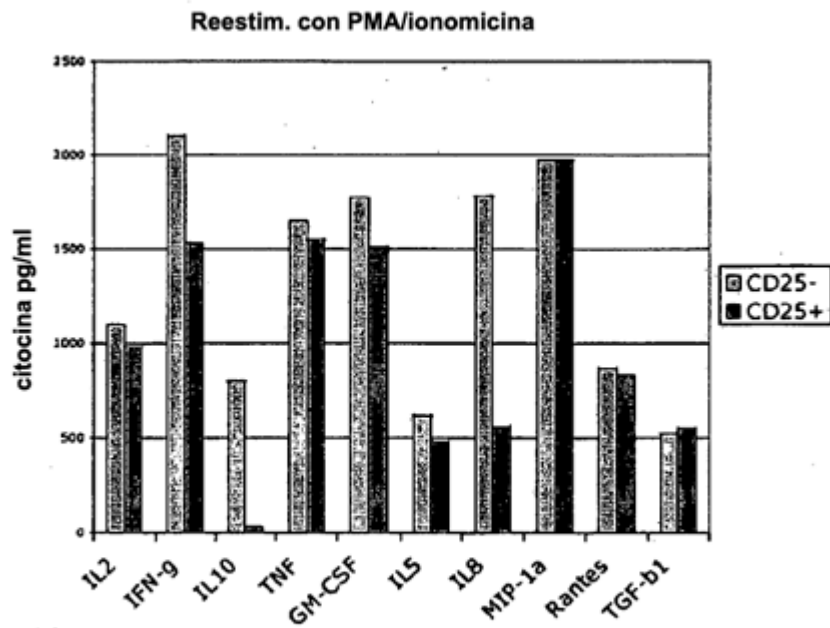


Fig. 12B

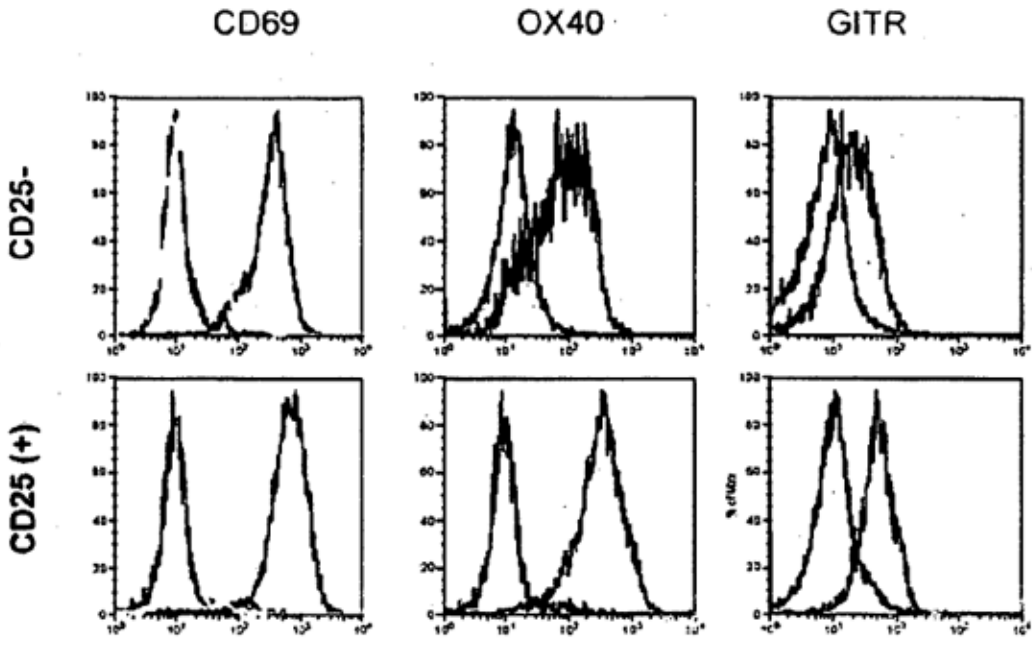


Fig. 12C

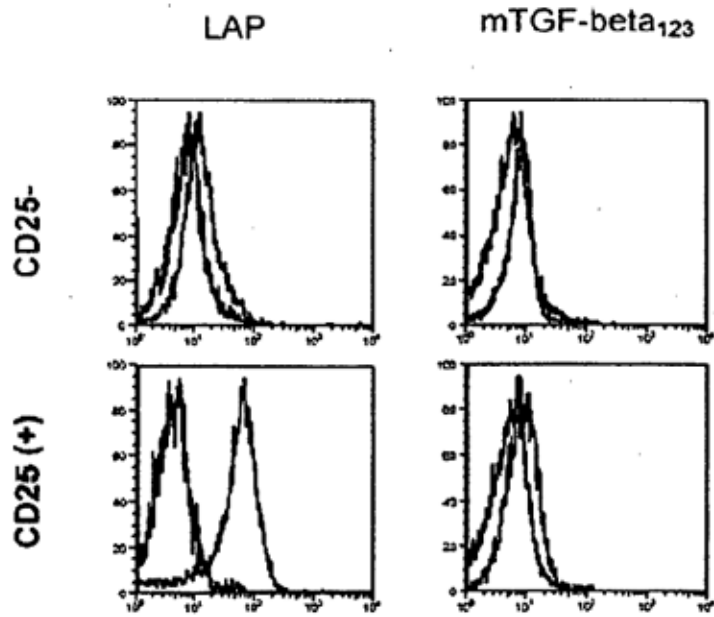


Fig. 12D

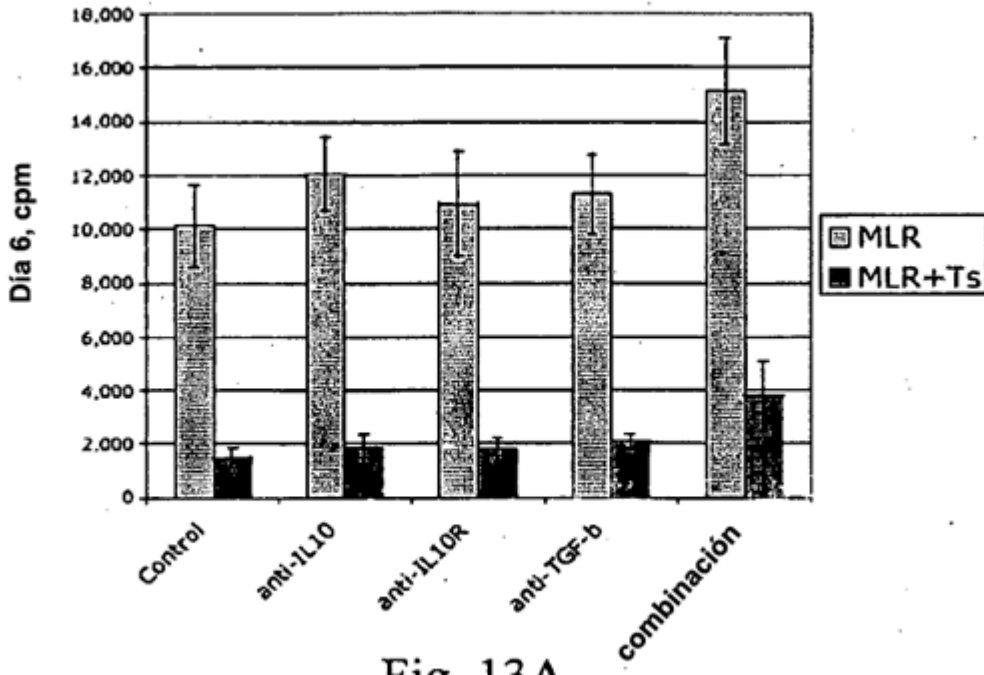


Fig. 13A

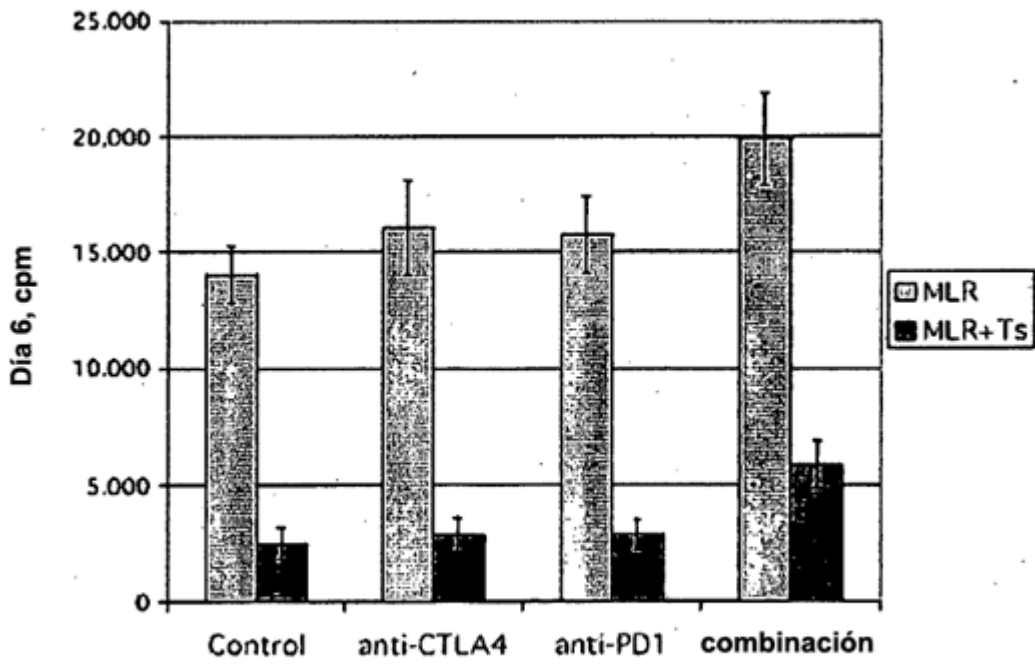


Fig. 13B

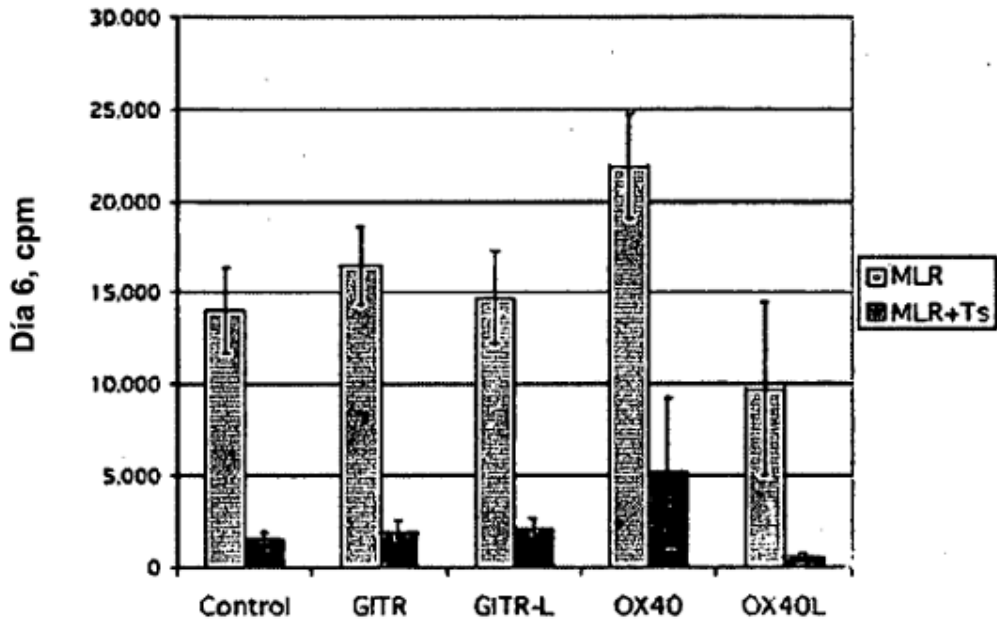


Fig. 13C

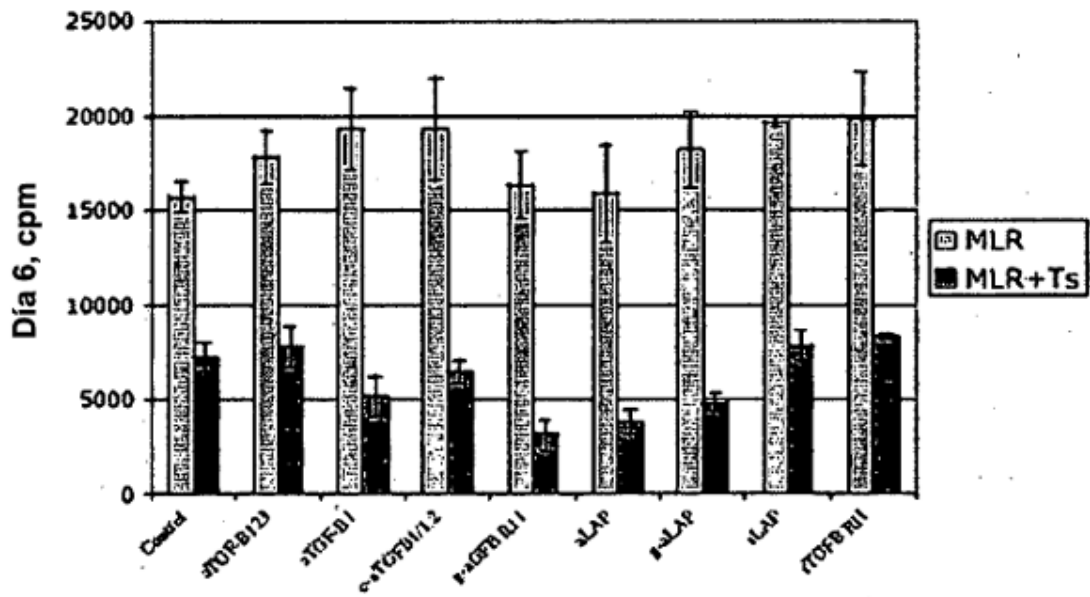


Fig. 13D