(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 650 236**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0783 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2009 PCT/EP2009/051807**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009 WO09101207**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 09711368 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2245059**

(54) Título: **Linfocitos T CD4+ con propiedades citolíticas**

(30) Prioridad:

14.02.2008 EP 08447006
12.03.2008 US 35908

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2018

(73) Titular/es:

LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW (50.0%)
Herestraat 49, bus 913
3000 Leuven, BE y
KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)

(72) Inventor/es:

SAINT-REMY, JEAN-MARIE

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Linfocitos T CD4+ con propiedades citolíticas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a linfocitos T CD4+, más específicamente a linfocitos T CD4+ citolíticos o citotóxicos y a métodos de obtención e identificación de los mismos.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos T reguladores naturales (Treg) se seleccionan activamente en el timo y ejercen potente actividad supresora en la periferia para la inducción y mantenimiento de la tolerancia. Estas células se caracterizan por un fenotipo distinto que incluye alta expresión de proteínas de superficie celular CD25 y GITR, alta expresión intracelular de CTLA-4, pero ausencia de IL7R. Son anérgicos e hiposensibles en ausencia de factores de crecimiento exógenos, y no producen IL-2. La expresión del represor de transcripción Foxp3 es la marca característica de dichos Treg naturales. La actividad supresora de los Treg naturales demostró estar ligada a un defecto en la fosforilación de AKT, una serina-treonina cinasa dependiente de fosfatidilinositido-3 cinasa (Pl3K; Crellin *et al*. (2007) Blood 109: 2014-2022).

El uso de dichos Treg naturales en el control de los trastornos inmunitarios por transferencia adoptiva de células está muy limitado por la frecuencia muy baja de células de especificidad definida, la dificultad de expandirlas *in vitro* y por la ausencia de métodos eficaces por los cuales puedan expandirse *in vivo*. Más allá de ello, la actividad funcional de los linfocitos T reguladores naturales es no específica, ya que producen citocinas supresoras tales como IL-10 y TGF-beta. Por tanto, hay una necesidad de linfocitos T supresores con especificidad aumentada que sean además más susceptibles a expansión.

Louis S. *et al*. (2006) Transplantation 81, 398-407 describen la caracterización de linfocitos T CD4+ en pacientes trasplantados con rechazo crónico. Estas células expresan CD25, CTLA-4, GITR y NKG2D, aunque no expresan FoxP3 y CD28.
Hori, S. (2003) Science. 299, 1057-1061 divulga linfocitos T citotóxicos CD4+, CD25+, GITR+, Foxp3- derivados de ratones.
Saez-Borderias (2006) Eur J Immunol. 36, 3198-206 describen linfocitos T citotóxicos que son CD4+, CD28-, NKG2D+, AKT/PI3K+, restringidos a MHCII y producen IFN-γ tras estimulación con antígeno.
Haveman, L. (2005) ASH Ann. Meeting Abst. 2005, 106, 3238 describe linfocitos T citotóxicos CD4+, GATA3+, T-bet+, INFgamma+ TGF-beta+ e IL10bajo que son específicos de adenovirus.
Maynard CL. (2007) Nat. Immunol. 8, 931-41 describe linfocitos T CD4+, CD25+, GITR+, FoxP3-, IL-10-.
El documento WO2008/017517 describe antígenos usados para inducir linfocitos T CD4+ citotóxicos. Estos linfocitos T citotóxicos se caracterizan como CD4+, CD25+, GITR+, CTLA4+, Tbet+, IFN2+, FasL+, TCRbeta+ reordenado, CD28-, Foxp3-, IL-10-, TGF-beta, IL-2- y restringidos a MHCII.
Maeda M. *et al*. (2004) J Immunol. 172, 6115-6122 y Eberl G. *et al*. (1999) J Immunol. 162, 6410-6419 divulgan linfocitos T citotóxicos no restringidos a CD1d que son CD4+, CD49b-, no expresan una cadena α de TCR invariante, pero expresan una cadena β de TCR reordenada.

Sumario de la invención

La invención se refiere a métodos *in vitro* de identificación de una población de linfocitos T CD4+ citolíticos que inducen apoptosis. Estos métodos comprenden las etapas de:

- proporcionar linfocitos T reguladores CD4+ sospechosos de ser citolíticos, y
- determinar que estos linfocitos T presentan expresión indetectable del represor de la transcripción Foxp3 y presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales aislados, una actividad aumentada de la serina-treonina cinasa AKT.

Las realizaciones de estos métodos comprenden la etapa de determinar que los linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citolíticos presentan producción indetectable de TGF-beta y producción indetectable o muy baja de IL-10 en comparación con linfocitos T reguladores CD4+ naturales aislados.

Las realizaciones de estos métodos comprenden la etapa de determinar la inducción de la apoptosis en células presentadoras de antígeno.

En realizaciones específicas, los linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citolíticos están en estado de reposo.

En este documento, se divulgan poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos (en estado de reposo o activado) caracterizados, en comparación con linfocitos T reguladores CD4+ naturales, por la ausencia de expresión o expresión indetectable del represor de la transcripción Foxp3. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, en

estado activado/tras estimulación antigénica, se caracteriza adicionalmente, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, por una fuerte fosforilación de PI3K y de AKT. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente por la producción, tras estimulación antigénica, de altas concentraciones de IFN-gamma con concentraciones variables de IL-4, IL5, IL-10 y TNF-alfa (dependiendo del cometido de las citocinas del clon efector correspondiente), pero producción ausente o indetectable de IL-17 o TGF-beta, todo en comparación con linfocitos T reguladores CD4+ naturales. Más específicamente, las concentraciones de IL-10 de los linfocitos T CD4+ activados están significativa y drásticamente reducidos en comparación con las concentraciones de IL-10 en linfocitos T reguladores CD4+ naturales activados. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse adicionalmente por la producción, tras estimulación antigénica, de altas concentraciones de FasL soluble (ligando de Fas) en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales.

En este documento, se divulgan poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos caracterizados, en comparación con linfocitos T efectores CD4+, por expresión constitutiva (es decir, independiente de si los linfocitos T CD4+ citotóxicos están en reposo o activados) de las proteínas de superficie celular CD25, GITR y CTLA-4 intracelular, pero expresión ausente o indetectable de CD28 o CD127. En este documento, la expresión constitutiva se refiere a la expresión de una proteína en linfocitos T CD4+ citotóxicos después de un periodo de reposo (es decir, sin estimulación antigénica) de aproximadamente 12 a 15 días. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse adicionalmente, en comparación con linfocitos T efectores CD4+, por la expresión de NKG2D. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente, tras estimulación antigénica, por la producción de altas concentraciones de FasL soluble en comparación con linfocitos T efectores CD4+. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente, tras estimulación antigénica, por la expresión combinada de los factores de transcripción T-bet y GATA3 en comparación con linfocitos T efectores CD4+. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente por la ausencia de transcripción de IL-2 (detectable) en comparación con linfocitos T efectores CD4+. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, en comparación con linfocitos T efectores CD4+, también puede caracterizarse adicionalmente por la capacidad de inducir apoptosis de APC, después de estimulación antigénica por interacción afín con el péptido presentado por determinantes MHC de clase II. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente, en comparación con linfocitos T efectores CD4+, por la capacidad de inducir la apoptosis de linfocitos T espectadores.

Se divulgan adicionalmente poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos caracterizados, en comparación con linfocitos NK, por la expresión del correceptor CD4. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente, en comparación con linfocitos NK, por la ausencia de CD49b (detectada por la unión del anticuerpo DX5). Estas características respecto a los linfocitos NK son independientes del estado de activación de los linfocitos T CD4+ citotóxicos y, por tanto, son detectables tanto en células en reposo como en células activadas.

Las poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos se caracterizan, en comparación con linfocitos NKT, por la expresión de un receptor de linfocitos T alfa-beta con cadena alfa invariante y cadena beta reordenada. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse adicionalmente, en comparación con linfocitos NKT, por la ausencia de expresión (detectable) de la expresión de TCR Valfa14 (ratón) o Valfa24 (ser humano). Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse adicionalmente, en comparación con linfocitos NKT, por la ausencia de restricción CD1 d. Estas características respecto a los linfocitos NKT son independientes del estado de activación de los linfocitos T CD4+ citotóxicos y, por tanto, son detectables tanto en células en reposo como en células activadas.

En este documento, se divulgan poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos que presentan cualquier combinación posible de cualquiera de las características descritas anteriormente y respecto a los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, los linfocitos T efectores CD4+, los linfocitos NK y/o los linfocitos NKT o caracterizadas por una combinación de todas estas características.

En este documento se divulgan métodos para obtener o inducir poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos como se describe anteriormente, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

(i) proporcionar linfocitos T CD4+ no expuestos previamente o de memoria naturales aislados;
(ii) poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprende un epítopo de linfocitos T y, adyacente a dicho epítopo de linfocitos T o separado del mismo por un conector de como mucho 7 aminoácidos, un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C; y
(iii) expandir dichas células en presencia de IL-2.

Se divulgan adicionalmente métodos de identificación de una población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, comprendiendo dicho método las etapas de:

(i) proporcionar linfocitos T CD4+ naturales aislados tales como linfocitos T reguladores CD4+ naturales, células efectoras CD4+, linfocitos NK o linfocitos NKT;

(ii) proporcionar linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citotóxicos; y
(iii) determinar que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T proporcionados en (i), las características respectivas descritas anteriormente.

Este método puede identificar linfocitos T CD4+ citotóxicos determinando en la etapa (iii) la ausencia de o la expresión indetectable del receptor de transcripción Foxp3 en comparación con la expresión de Foxp3 en linfocitos T reguladores CD4+ naturales. Dicho método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), una actividad cinasa aumentada de la serina-treonina cinasa AKT. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), producción indetectable de TGF-beta y producción indetectable o muy baja de IL-10. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), altas concentraciones de producción de IFN-gamma. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), producción de altas concentraciones de FasL soluble.

Este método puede identificar poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos comparándolos con células efectoras CD4+. Por tanto, dichos métodos pueden comprender la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), expresión constitutiva de las proteínas de superficie celular CD25, GITR y CTLA-4 intracelular, pero no de CD28 o CD127. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), expresión de NKG2D sobre la superficie celular. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), coexpresión de los factores de transcripción T-bet y GATA3. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), una ausencia de transcripción de IL-2. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), la capacidad de inducir apoptosis de APC, después de estimulación antigénica por interacción afín con el péptido presentado por determinantes MHC de clase II. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), la capacidad de inducir apoptosis de linfocitos T espectadores.

Este método puede identificar poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos comparándolos con linfocitos NK. Por tanto, dichos métodos pueden comprender la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NK proporcionados en (i), expresión del correceptor CD4. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NK proporcionados en (i), la ausencia de expresión de CD49b.

Se divulgan en este documento métodos para identificar poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos comparándolos con linfocitos NKT. Dichos métodos pueden comprender la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NKT proporcionados en (i), expresión de un receptor de linfocitos T alfa-beta con cadena beta reordenada. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NKT proporcionados en (i), ausencia de expresión de TCR Valfa14 (ratón) o Valfa24 (ser humano). Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NKT proporcionados en (i), ausencia de restricción CD1 d.

En los métodos anteriores también es posible identificar linfocitos T CD4+ sospechosos de ser linfocitos T CD4+ citotóxicos proporcionados en la etapa (ii), determinando en la etapa (iii) cualquier combinación posible de alguna o todas las características descritas anteriormente y respecto a los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, los linfocitos T efectores CD4+, los linfocitos NK y/o linfocitos NKT proporcionados en la etapa (i), estando descritas también anteriormente dichas combinaciones.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Los clones de linfocitos T CD4+ citolíticos expresan marcadores asociados con linfocitos T reguladores. Véase el ejemplo 2 para una explicación detallada.
Figura 2. Los clones de linfocitos T CD4+ citolíticos coexpresan los factores de transcripción T-bet y GATA3, pero no Foxp3. Véase el ejemplo 3 para una explicación detallada.
Figura 3. Los linfocitos T CD4+ citolíticos son distintos de los linfocitos NK. Véase el ejemplo 5 para una explicación detallada.
Figura 4. Los linfocitos T CD4+ citolíticos son distintos de los linfocitos NKT. Véase el ejemplo 6 para una

explicación detallada.
Figura 5. Los linfocitos T CD4+ citolíticos muestran fosforilación de AKT en contraste con las células reguladoras CD4+ naturales. Véase el ejemplo 7 para una explicación detallada.
Figura 6. Los linfocitos T CD4+ citolíticos inducen apoptosis de células presentadoras de antígeno después del reconocimiento del péptido afín. Véase el ejemplo 8 para una explicación detallada.
Figura 7. Los linfocitos T CD4+ citolíticos inducen apoptosis de linfocitos T espectadores. Véase el ejemplo 9 para una explicación detallada.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "**péptido**" cuando se usa en este documento se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados por enlaces peptídicos, pero que puede comprender estructuras que no son de aminoácido (como, por ejemplo, un compuesto orgánico de unión). Los péptidos pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos que no son de origen natural incorporados por síntesis peptídica química o por modificación química o enzimática.

El término "**epítopo**" cuando se usa en este documento se refiere a una o varias partes (que pueden definir un epítopo conformacional) de una proteína que se reconocen específicamente y se unen por un anticuerpo o una parte del mismo (Fab1, Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito B o T, y que es capaz, mediante dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

El término "**antígeno**" cuando se usa en este documento se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos y/o que comprende uno o más epítopos de linfocitos T. Típicamente, dicha macromolécula es una proteína o péptido (con o sin polisacáridos) o está compuesta por una composición proteica y comprende uno o más epítopos; dicha macromolécula en este documento puede mencionarse de forma alternativa como "**proteína antigénica**" o "**péptido antigénico**".

La expresión "**epítopo de linfocitos T**" en el contexto de la presente invención se refiere a un epítopo de linfocitos T dominante, subdominante o minoritario, es decir, una parte de una proteína antigénica que se reconoce específicamente y se une por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Que un epítopo sea dominante, subdominante o minoritario depende de la reacción inmunitaria provocada contra el epítopo. La dominancia depende de la frecuencia a la que dichos epítopos se reconocen por linfocitos T y son capaces de activarlos, entre todos los posibles epítopos de linfocitos T de una proteína. En particular, un epítopo de linfocitos T es un epítopo unido por moléculas MHC de clase I o MHC de clase II.

La expresión "**células efectoras CD4+**" se refiere a células que pertenecen al subconjunto CD4 positivo de linfocitos T cuya función es proporcionar ayuda a otras células, tales como, por ejemplo, linfocitos B. Estas células efectoras se mencionan convencionalmente como células Th (para linfocitos T auxiliares), con diferentes conjuntos tales como células ThO, Th1, Th2 y Th17.

La expresión "**trastornos inmunitarios**" o "**enfermedades inmunitarias**" se refiere a enfermedades en las que una reacción del sistema inmunitario es responsable de o mantiene una disfunción o situación no fisiológica en un organismo. Se incluyen en los trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos alérgicos, enfermedades autoinmunitarias, reacciones de aloinmunización, rechazo de vectores víricos usados en terapia génica/vacunación génica.

En la memoria descriptiva, se usan los siguientes acrónimos y abreviaturas:

AKT: Grupo de serina/proteína cinasas que comprenden AKT 1, AKT2 y AKT3 (también conocida como proteína cinasa B (PKB))
CD1d: Antígeno de timocitos CD1 D
CD25: Receptor de interleucina 2, cadena alfa (también conocido como IL2RA, TCGFR y antígeno TAC)
CTLA-4: Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (también conocido como CD152)
CD49b: Integrina, alfa2 (también conocida como ITGA2, VLAA2)
FasL: Ligando de FAS (también conocido como TNFSF, APT1 LG1, CD95L, CD178)
Foxp3: Secuencia P3 de Forkhead (también conocida como SCURFIN o JM2)
GATA3: Proteína 3 de unión a GATA
GITR: Gen relacionado con Tnfr inducido por glucocorticoides (también conocido como AITR)
IFN: Interferón
NKG2D: Subfamilia K del receptor de tipo lectina de células citolíticas, miembro 1 (también conocido como KLRK1, CD314)
T-bet: Secuencia T expresada en linfocitos T (también conocida como T-BOX 21, TBX21)
TGF-beta: Factor beta de crecimiento transformante

IL: Interleucina
NK: linfocitos citolíticos naturales
NKT: linfocitos T citolíticos naturales

Descripción detallada

La presente invención se basa en la caracterización de un subconjunto de linfocitos T CD4+ que tienen características novedosas. Este nuevo subconjunto de linfocitos T CD4+ comparte características de linfocitos T reguladores, de células efectoras y de linfocitos NK/NKT, pero portan características y expresan propiedades que los distinguen claramente de las células reguladoras, las células efectoras y los linfocitos NK/NKT. Dichos nuevos linfocitos T CD4+ se llaman linfocitos T citolíticos (o citotóxicos) CD4+ (linfocitos T cCD4+ en forma abreviada). Los linfocitos T cCD4+ son anérgicos, de larga vida y quedan activados solamente cuando reconocen un péptido afín presentado por células presentadoras de antígeno (APC). Estos linfocitos T cCD4+, por tanto, son estrictamente específicos de antígeno. Además, pueden expandirse fácilmente (tal como en condiciones *ex vivo* o *in vitro*) en presencia de IL-2. Existe una ventaja adicional de los linfocitos T cCD4+ de que no producen citocinas supresoras, lo que limita el riesgo de efectos no específicos. Claramente, las ventajas mostradas por los linfocitos T cCD4+ los hacen candidatos excelentes para tratar trastornos inmunitarios mediante transferencia adoptiva de células.

Estos linfocitos T cCD4+ son distintos de los Treg naturales por la ausencia de la expresión o la expresión indetectable del represor de la transcripción Foxp3, por la producción de altas concentraciones de IFN-gamma tras la estimulación con concentraciones variables de IL-4, IL5 y TNF-alfa (dependiendo del cometido de las citocinas del clon efector correspondiente), pero IL-17 o TGF-beta indetectables, o ausencia de IL-17 o TGF-beta (factor beta de crecimiento transformante). En los linfocitos T cCD4+, las concentraciones de IL-10 están significativa o drásticamente reducidas o disminuidas en comparación con las células reguladoras CD4+ naturales. Además, estos linfocitos T cCD4+ presentan fuerte fosforilación de PI3K y AKT, y producción de altas concentraciones de FasL soluble, aunque todas estas características no están necesariamente presentes juntas.

Estos linfocitos T cCD4+ son distintos de los linfocitos T efectores CD4+ por la expresión constitutiva de las proteínas de superficie celular CD25, GITR y CTLA-4 intracelular, pero expresión ausente o indetectable de CD28 o CD127, por la expresión celular de NKG2D, por la producción de altas concentraciones de FasL soluble, por la coexpresión de los factores de transcripción T-bet y GATA3, por la ausencia de transcripción de IL-2, por la capacidad de inducir apoptosis de células presentadoras de antígeno (APC), después de la estimulación antigénica por reconocimiento equivalente de péptidos presentados por determinantes MHC de clase II y por la capacidad de inducir apoptosis de linfocitos T espectadores, aunque todas estas características no están necesariamente presentes juntas.

Estos linfocitos T cCD4+ son distintos de los linfocitos NK por la expresión del correceptor CD4, por la expresión constitutiva de las proteínas de superficie celular CD25, GITR y CTLA-4 intracelular y por la ausencia de expresión (detectable) de CD49b. Los linfocitos NK no expresan el corrector CD4, pero expresan CD49b.

Estos linfocitos T cCD4+ son distintos de los linfocitos NKT por la expresión de un receptor de linfocitos T alfa-beta con cadena beta reordenada, por la ausencia de expresión de TCR Valfa14 (ratón) o Valfa24 (ser humano) y por la ausencia de restricción CD1 d, aunque todas estas características no están necesariamente presentes juntas.

En este documento se divulgan poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos (en estado de reposo o activado) caracterizados, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, por la ausencia de expresión o expresión indetectable del represor de la transcripción Foxp3. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, en estado activado/tras estimulación antigénica, pueden caracterizarse además, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, por la fuerte fosforilación de PI3K y de AKT. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse además por la producción, tras la estimulación, de altas concentraciones de IFN-gamma con concentraciones variables de IL-4, IL-5, IL-10 y TNF-alfa (dependiendo del cometido de las citocinas del clon efector correspondiente), pero producción ausente o indetectable de IL-17 o TGF-beta, todo en comparación con linfocitos T reguladores CD4+ naturales. Más específicamente, las concentraciones de IL-10 de los linfocitos T CD4+ activados están significativa y drásticamente reducidas en comparación con las concentraciones de IL-10 en linfocitos T reguladores CD4+ naturales activados. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse además por la producción, tras la estimulación antigénica, de altas concentraciones de FasL (ligando de Fas) soluble en comparación con linfocitos T reguladores CD4+ naturales.

En este documento se divulgan poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos caracterizados, en comparación con linfocitos T efectores CD4+, por la expresión constitutiva (es decir, independiente de si los linfocitos T CD4+ citotóxicos están en reposo o activados) de las proteínas de superficie celular CD25, GITR y CTLA-4 intracelular, pero expresión ausente o indetectable de CD28 o CD127. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse además, en comparación con los linfocitos T efectores CD4+, por la expresión constitutiva de NKG2D. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos también puede caracterizarse además, tras la estimulación antigénica, por la producción de altas concentraciones de FasL soluble en comparación con los

linfocitos T efectores CD4+. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse además, después de la estimulación antigénica, por la coexpresión de los factores de transcripción T-bet y GATA3 en comparación con los linfocitos T efectores CD4+. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos se caracteriza además por la ausencia de transcripción (detectable) de IL-2 en comparación con linfocitos T efectores CD4+. La población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse además, en comparación con los linfocitos T efectores CD4+, por la capacidad de inducir la apoptosis de APC, después de estimulación antigénica por interacción afín con péptido presentado por determinantes MHC de clase II. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse además, en comparación con los linfocitos T efectores CD4+, por la capacidad de inducir la apoptosis de linfocitos T espectadores.

En este documento se divulgan además poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos caracterizados, en comparación con los linfocitos NK, por la expresión del correceptor CD4. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse además, en comparación con los linfocitos NK, por la ausencia de expresión de CD49b. Estas características respecto a los linfocitos NK son independientes del estado de activación de los linfocitos T CD4+ citotóxicos y, por tanto, son detectables tanto en células en reposo como activadas.

Se divulgan en este documento poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos caracterizados, en comparación con los linfocitos NKT, por la expresión de un receptor de linfocitos T alfa-beta con cadena beta reordenada. Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, en comparación con los linfocitos NKT, se puede caracterizar además por la ausencia de expresión (detectable) de la expresión de TCR Valfa14 (ratón) o Valfa24 (ser humano). Esta población de linfocitos T CD4+ citotóxicos puede caracterizarse además, en comparación con los linfocitos NKT, por la ausencia de restricción de CD1 d. Estas características respecto a los linfocitos NKT son independientes del estado de activación de los linfocitos T CD4+ citotóxicos y, por tanto, son detectables tanto en células en reposo como activadas.

En este documento se divulgan además poblaciones aisladas de linfocitos T CD4+ citotóxicos que presentan cualquier combinación posible de cualquiera de las características descritas anteriormente y respecto a los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, los linfocitos T efectores CD4+, los linfocitos NK y/o los linfocitos NKT o caracterizados por una combinación de todas estas características.

Estos linfocitos T CD4+ pueden producirse a partir de linfocitos T CD4+ no expuestos previamente, así como a partir de linfocitos T CD4+ de memoria, más particularmente por incubación con epítopos de linfocitos T modificados por adhesión de una secuencia de motivo consenso con actividad tiorreductasa (motivo [CST]XX[CST], donde [CST] es un aminoácido seleccionado de cisteína, serina y treonina, y X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina). Después de la producción, pueden expandirse en un medio de cultivo adecuado que comprende IL-2.

Se divulgan además métodos para obtener o inducir poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos como se describe anteriormente, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

(i) proporcionar linfocitos T CD4+ no expuestos previamente o de memoria naturales aislados;
(ii) poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprende un epítopo de linfocitos T y, adyacente a dicho epítopo de linfocitos T o separado del mismo por un conector de como mucho 7 aminoácidos, un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C; y
(iii) expandir dichas células en presencia de IL-2.

En este método, los linfocitos T CD4+ citotóxicos pueden obtenerse o inducirse *in vivo* o *ex vivo*. Cuando se hace *in vivo*, las etapas (i) y (iii) en el método anterior son redundantes ya que el contacto de las células con el epítopo de linfocitos T como se describe en (ii) se está produciendo al administrar el epítopo de linfocitos T al sujeto que lo necesita, y los linfocitos T CD4+ citotóxicos resultantes se expandirán en el organismo del sujeto.

En este documento se divulgan además métodos para obtener o inducir poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos como se describe anteriormente, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

(i) administrar a un sujeto que lo necesita un péptido inmunogénico que comprende un epítopo de linfocitos T y, adyacente a dicho epítopo de linfocitos T o separados del mismo por un conector de como mucho 7 aminoácidos, un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, induciendo de ese modo linfocitos T CD4+ citotóxicos; y
(ii) aislar u obtener los linfocitos T CD4+ citotóxicos inducidos en (i).

Como alternativa, estos linfocitos T cCD4+ pueden obtenerse por incubación en presencia de APC que presentan el péptido inmunogénico mencionado anteriormente después de la transducción o transfección de las APC con una construcción genética capaz de dirigir la expresión de dicho péptido inmunogénico. Dichas APC pueden administrarse en sí mismas, de hecho, a un sujeto que necesita activar *in vivo* en dicho sujeto la inducción del subconjunto beneficioso de linfocitos T cCD4+. En otro método alternativo, los linfocitos T cCD4+ pueden generarse *in vivo*, es decir, por la administración del péptido inmunogénico mencionado anteriormente a un sujeto, y la recogida de los linfocitos T cCD4+ generados *in vivo*. Por consiguiente, se describe además la generación de los linfocitos T cCD4+ tanto *in vivo* como *in vitro* (*ex vivo*) usando los péptidos inmunogénicos o APC que presentan dichos péptidos

inmunogénicos.

Los sujetos que padecen, o que tienen un trastorno inmunitario, o que se han diagnosticado como predestinados a desarrollar un trastorno inmunitario, pueden tratarse administrando (una cantidad suficiente o eficaz de) los linfocitos T cCD4+, donde dichos linfocitos T cCD4+ son específicos para un epítopo de linfocitos T relevante para el trastorno inmunitario a tratar o prevenir. La administración profiláctica, el tratamiento o la prevención de los trastornos inmunitarios sería deseable en sujetos predestinados a desarrollar un trastorno inmunitario. Dicha predestinación puede diagnosticarse, por ejemplo, por un diagnostico positivo de un defecto genético que se sabe que predestina a un sujeto a desarrollar un trastorno inmunitario o que se sabe que aumenta la probabilidad de desarrollar un trastorno inmunitario. Como alternativa, los trastornos inmunitarios hereditarios que se han manifestado por sí mismos en uno o más de los antepasados o dentro de la familia de un sujeto pueden aumentar la probabilidad de que desarrolle/pueden predestinar a dicho sujeto a desarrollar el trastorno inmunitario, por lo tanto, dichos sujetos también pueden ser elegibles para tratamiento profiláctico con los linfocitos T cCD4+.

Los linfocitos T cCD4+ que se pueden obtener por los métodos anteriores son de particular interés para su uso en la fabricación de un medicamento para prevención (profilácticamente), supresión o tratamiento de un trastorno inmunitario en un mamífero. Se prevé el uso de linfocitos T cCD4+ tanto alogénicos como autogénicos. Cualquier método que comprenda la administración de dichos linfocitos T cCD4+ a un sujeto que lo necesita se conoce como terapia celular adoptiva. Como se menciona anteriormente, los linfocitos T cCD4+ a incluir en el medicamento tendrían que "educarse", es decir, tendrían que ser específicos, para un epítopo de linfocitos T de un antígeno que se sabe que es relevante en el trastorno inmunitario a tratar.

Los péptidos inmunogénicos mencionados anteriormente en general comprenden (i) al menos un epítopo de linfocitos T de un antígeno de elección con el potencial de activar una reacción inmunitaria, que se acopla a (ii) un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como un motivo de secuencia de tiorreductasa. El antígeno de elección variará junto con (y se determinará por) el trastorno inmunitario a prevenir o suprimir. El epítopo de linfocitos T y el compuesto orgánico están opcionalmente separados por una secuencia conectora. Opcionalmente, el péptido inmunogénico comprende además una secuencia de dirección al endosoma (por ejemplo, secuencia tardía de dirección al endosoma) y/o secuencias "flanqueantes" adicionales. Los péptidos inmunogénicos pueden representarse esquemáticamente como A-L-B o B-L-A, donde A representa un epítopo de linfocitos T de un antígeno (propio o no propio) con un potencial de activar una reacción inmunitaria, L representa un conector y B representa un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora. La actividad reductora de un compuesto orgánico puede ensayarse por su capacidad de reducir un grupo sulfhidrilo tal como en el ensayo de solubilidad de insulina conocido en la técnica, donde la solubilidad de la insulina se altera tras la reducción, o con una insulina marcada con fluorescencia. El compuesto orgánico reductor puede acoplarse al lado amino-terminal del epítopo de linfocitos T o en el lado carboxi-terminal del epítopo de linfocitos T.

En general, el compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en tiorreductasas que son enzimas pequeñas que reducen disulfuro, incluyendo glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras oxidorreductasas de tiol/disulfuro. Ejercen actividad reductora de enlaces disulfuro sobre proteínas (tales como enzimas) a través de cisteínas activas de oxidorreducción dentro de secuencias consenso de dominio activo conservado: C-X(2)-C, C-X(2)-S, C-X(2)-T, S-X(2)-C, T-X(2)-C (Fomenko *et al.* (2003) Biochemistry 42, 11214-11225), en que X significa cualquier aminoácido. Dichos dominios también se encuentran en proteínas más grandes tales como proteína disulfuro isomerasa (PDI) y fosfolipasa C específica de fosfoinosítido. En particular, los péptidos inmunogénicos comprenden como motivo de oxidorreducción el motivo de secuencia de tiorreductasa [CST]-X(2)-[CST], estando dicho motivo [CST]-X(2)-[CST] situado en sentido N-terminal del epítopo de linfocitos T. Más específicamente, en dicho motivo de oxidorreducción al menos una de las posiciones "CST" está ocupada por una Cys; por tanto, el motivo es [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C]. En la presente solicitud dicho tetrapéptido se mencionará como "el motivo" o "el motivo de oxidorreducción". Más en particular, los péptidos inmunogénicos pueden contener el motivo de secuencia [C]-X(2)-[CS] o [CS]-X(2)-[C]. Incluso más particularmente, los péptidos inmunogénicos contienen el motivo de secuencia C-X(2)-S, S-X(2)-C o C-X(2)-C.

Los péptidos inmunogénicos anteriores pueden prepararse por síntesis química, que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, en el motivo de oxidorreducción, la C que representa cisteína puede estar reemplazada por otro aminoácido con un grupo tiol tal como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Para tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo no deben existir como parte de un puente disulfuro de cisteína. No obstante, el motivo puede comprender cisteínas modificadas tales como cisteína metilada, que se convierte en cisteína con grupos tiol libres *in vivo*. El aminoácido X en el motivo [CST]-X(2)-[CST] de los compuestos reductores puede ser cualquier aminoácido natural, incluyendo S, C o T o puede ser un aminoácido no natural. En particular, X puede ser un aminoácido con una cadena lateral pequeña tal como Gly, Ala, Ser o Thr. Más particularmente, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa tal como Tyr; o al menos un X en el motivo [CST]-X(2)-[CST] puede ser His o Pro.

El motivo en los péptidos inmunogénicos anteriores se sitúa inmediatamente adyacente a la secuencia epitópica dentro del péptido, o se separa del epítopo de linfocitos T por un conector. Más particularmente, el conector

comprende una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos o menos. Más particularmente, el conector comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Como alternativa, un conector puede comprender 6, 8 o 10 aminoácidos. Los aminoácidos típicos usados en conectores son serina y treonina. Son ejemplos de péptidos con conectores CXXC-G epítopo (SEQ ID NO: 17), CXXC-GG epítopo (SEQ ID NO: 18), CXXC-SSS epítopo (SEQ ID NO: 19), CXXC-SGSG epítopo (SEQ ID NO: 20) y similares.

Los péptidos inmunogénicos pueden comprender cortas secuencias adicionales de aminoácidos en sentido N o C-terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítopo de linfocitos T y el compuesto (motivo) reductor. Dicha secuencia de aminoácidos generalmente se menciona en este documento como "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante puede estar colocada en sentido N y/o C-terminal del motivo de oxidorreducción y/o del epítopo de linfocitos T en el péptido inmunogénico. Cuando el péptido inmunogénico comprende una secuencia de dirección al endosoma, puede haber una secuencia flanqueante presente entre el epítopo y una secuencia de dirección al endosoma y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo, motivo) y una secuencia de dirección al endosoma. Más particularmente una secuencia flanqueante es una secuencia de hasta 10 aminoácidos, o de entre 1 y 7 aminoácidos, tal como una secuencia de 2 aminoácidos.

El motivo de oxidorreducción en el péptido inmunogénico puede estar localizado en sentido N-terminal del epítopo.

Como se detalla anteriormente, los péptidos inmunogénicos comprenden un motivo reductor como se describe en este documento unido a una secuencia epitópica de linfocitos T. En casos particulares, los epítopos de linfocitos T se obtienen de proteínas que no comprenden dentro de su secuencia natural nativa una secuencia de aminoácidos con propiedades de oxidorreducción dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C-terminal adyacente al epítopo de linfocitos T de interés.
El epítopo de linfocitos T puede obtenerse de un alérgeno o un autoantígeno.

Los alérgenos que pueden usarse para la selección de epítopos de linfocitos T son típicamente alérgenos tales como:

- alérgenos alimentarios presentes, por ejemplo, en cacahuetes, pescado, por ejemplo, bacalao, clara de huevo, crustáceos, por ejemplo, camarones, leche, por ejemplo, leche de vaca, trigo, cereales, frutos de la familia Rosacea, hortalizas de las familias Liliacea, Cruciferae, Solanaceae y Umbelliferae, frutos secos de árbol, sésamo, cacahuete, soja y otros alérgenos de la familia de las legumbres, especias, melón, aguacate, mango, higo, plátano;
- alérgenos de ácaros del polvo del hogar obtenidos de *Dermatophagoides* spp o *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *D. microceras, Euroglyphus maynei* o *Blomia* sp.,
- alérgenos de insectos presentes en cucarachas o Hymenoptera,
- alérgenos del polen, especialmente pólenes de árboles, gramíneas y malezas,
- alérgenos de animales, especialmente en gato, perro, caballo y roedor,
- alérgenos de hongos, especialmente de *Aspergillus*, *Alternaria* o *Cladosporium*, y
- alérgenos relativos a la profesión presentes en productos tales como látex, amilasa, etc. Autoantígenos que pueden usarse para la selección de epítopos de linfocitos T son típicamente antígenos tales como:
- tiroglobulina, peroxidasa tiroidea o receptor de TSH (enfermedades autoinmunitarias de tiroides);
- insulina (proinsulina), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), tirosina fosfatasa IA-2, proteína de choque térmico HSP65, proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfato específica de islotes (IGRP) (diabetes de tipo 1);
- 21-OH hidroxilasa (adrenalitis);
- 17-alfa hidroxilasa, histidina descarboxilasa, Trp hidroxilasa, Tyr hidroxilasa (síndromes poliendocrinos);
- factor intrínseco de H+/K+ ATPasa (gastritis y anemia perniciosa);
- glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) (esclerosis múltiple);
- receptor de acetilcolina (miastenia grave);
- proteína de unión a retinol (RBP) (enfermedades oculares);
- colágeno de tipo II (artritis reumatoide), de tipo II y de tipo IX (enfermedades del oído interno);
- transglutaminasa tisular (enfermedad celíaca);
- proteína de histona 1H pANCA (enfermedades inflamatorias del intestino);
- proteína de choque térmico HSP60 (aterosclerosis);
- receptor de angiotensina (hipertensión arterial y preeclampsia)
- alfa-sinucleína nitrada (enfermedad de Parkinson).

Otros antígenos que pueden usarse para la selección de epítopos de linfocitos T incluyen proteínas aloantigénicas derivadas de (presentes en/desprendidas de) células u órganos aloinjertados, aloproteínas solubles (tales como administradas en terapia de reemplazo), proteínas de vectores víricos que se usan en terapia génica/vacunación génica, antígenos derivados de patógenos intracelulares y antígenos derivados de tumores o células tumorales.

Se divulgan métodos de identificación de una población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, comprendiendo dicho método las etapas de:

(i) proporcionar linfocitos T CD4+ naturales aislados tales como linfocitos T reguladores CD4+ naturales, células efectoras CD4+, linfocitos NK o linfocitos NKT;
(ii) proporcionar linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citotóxicos; y
(iii) determinar que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T proporcionados en (i) las características respectivas como se describe anteriormente.

En particular, las células a proporcionar en la etapa (ii) se pueden obtener por o pueden inducirse u obtenerse por el método descrito anteriormente. Las células proporcionadas en (i) son de una fuente tal que no comprenden linfocitos T CD4+ citotóxicos. Dependiendo de la característica a determinar en la etapa (iii), las células proporcionadas en las etapas (i) y/o (ii) pueden necesitar activarse por un epítopo de linfocitos T equivalente; dicha necesidad se puede obtener de las características de los linfocitos T CD4+ como se describe anteriormente. El método mencionado anteriormente de identificación de una población de linfocitos T CD4+ citotóxicos, por tanto, puede formularse de una manera más extensiva de la siguiente manera:

(i) proporcionar linfocitos T CD4+ naturales aislados tales como linfocitos T reguladores CD4+ naturales, células efectoras CD4+, linfocitos NK o linfocitos NKT y, opcionalmente, o cuando se requiera, activar estas células;
(ii) proporcionar linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citotóxicos, siendo dicha células inducibles u obtenibles como se describe anteriormente y, opcionalmente, o cuando se requiera, activar estas células; y
(iii) determinar que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T proporcionados en (i), las características respectivas como se describe anteriormente.

Por tanto, este método puede identificar linfocitos T CD4+ citotóxicos determinando en la etapa (iii) la ausencia de o la expresión indetectable del receptor de transcripción Foxp3 en comparación con la expresión de Foxp3 en linfocitos T reguladores CD4+ naturales. Dicho método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), una actividad cinasa aumentada de la serina-treonina cinasa AKT. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), producción indetectable de TGF-beta y producción indetectable o muy baja de IL-10. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), altas concentraciones de producción de IFN-gamma. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales proporcionados en (i), producción de altas concentraciones de FasL soluble.

Este método puede identificar poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos comparándolos con células efectoras CD4+. Por tanto, dichos métodos pueden comprender determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), expresión constitutiva de las proteínas de superficie celular CD25, GITR y CTLA-4 intracelular, pero no de CD28 o CD127. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), la expresión de NKG2D en la superficie celular. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), expresión combinada de los factores de transcripción T-bet y GATA3. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), una ausencia de transcripción de IL-2. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionada en (i), la capacidad de inducir apoptosis de APC, después de estimulación antigénica por interacción afín con un péptido presentado por determinantes MHC de clase II. Este método puede comprender además determinar en la etapa (iii) que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con las células efectoras CD4+ proporcionadas en (i), la capacidad de inducir apoptosis de linfocitos T espectadores.

El método puede identificar poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos comparándolos con linfocitos NK. Por tanto, dichos métodos pueden comprender la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NK proporcionados en (i), la expresión del correceptor CD4. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NK proporcionados en (i), la ausencia de expresión de CD49b.

En este documento se divulgan métodos para identificar poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos comparándolos con linfocitos NKT. Dichos métodos pueden comprender la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NKT proporcionados en (i), la expresión de un receptor de linfocitos T alfa-beta con cadena beta reordenada. Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NKT proporcionados en (i), la ausencia de expresión de TCR Valfa14 (ratón) o Valfa24 (ser humano). Este método puede comprender además la determinación en la etapa (iii) de que los linfocitos T proporcionados en (ii) presentan, en comparación con los linfocitos NKT proporcionados en (i), la ausencia de restricción de CD1 d.

En los métodos anteriores, además es posible identificar linfocitos T CD4+ sospechosos de ser linfocitos T CD4+ citotóxicos como se proporciona en la etapa (ii) determinando en la etapa (iii) cualquier combinación posible de alguna o todas las características descritas anteriormente y respecto a los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, los linfocitos T efectores CD4+, los linfocitos NK y/o los linfocitos NKT proporcionados en la etapa (i), describiéndose también anteriormente dichas combinaciones.

Por consiguiente, se proporcionan diferentes marcadores y propiedades funcionales, que pueden usarse en solitario o en combinación para identificar y/o seleccionar y/o para usar en el control de calidad de los linfocitos T cCD4+. Los métodos pueden comprender una comparación con linfocitos T reguladores naturales, células efectoras CD4+ y linfocitos NK/NKT. Sin embargo, se prevé que determinando la concentración de los marcadores mencionados anteriormente tal cual, puede ser suficiente para identificar las células (basándose en las concentraciones de expresión conocidas o propiedades funcionales en linfocitos T reguladores naturales, células efectoras CD4+ y linfocitos NK/NKT). Por consiguiente, la determinación de la actividad o expresión aumentada de un marcador también puede proporcionar opcionalmente la determinación de (altas) concentraciones de expresión de dicho marcador.

En general, una actividad potenciada de una cinasa puede provocarse por una expresión aumentada de esa cinasa o por fosforilación/desfosforilación de la propia cinasa que aumenta su actividad enzimática. La actividad de una cinasa se determina midiendo directa o indirectamente la cantidad de fosfato que se incorpora en un sustrato natural o modelo (por ejemplo, péptido sintético). La actividad de una cinasa a menudo depende de la fosforilación de esa misma cinasa. Por consiguiente, el grado de fosforilación de una cinasa puede ser indicativo de su actividad como es el caso de la cinasa AKT. En lo anterior, el grado de actividad cinasa de la serina-treonina cinasa AKT y de PI3K puede estimarse por transferencia de Western usando un anticuerpo específico para AKT o PI3K fosforilada, respectivamente. La fosforilación puede caracterizarse por exploración densitométrica de la transferencia de Western. Otros métodos cuantitativos comprenden métodos donde se cuantifican las transferencias de Western con técnicas de quimioluminiscencia (por ejemplo, formación de imágenes con fósforo). Como alternativa, la fosforilación puede determinarse cuantitativamente midiendo la incorporación de fosfato radiactivo en un sustrato. La expresión del represor de la transcripción Foxp3, de los activadores de la transcripción T-bet y GATA3 y la expresión de IL-2 puede estimarse mediante transferencia de Northern o de ARN usando una sonda marcada específica para el transcrito respectivo. Los niveles de expresión pueden caracterizarse posteriormente por exploración densitométrica de la transferencia de Northern. Los niveles de expresión de ciertos marcadores pueden determinarse, como alternativa, a nivel de ARNm por métodos de PCR con transcriptasa inversa. La expresión indetectable determinada por RT-PCR se refiere a experimentos donde no se detecta ninguna señal después de 35 ciclos de amplificación.

La expresión de marcadores superficiales puede evaluarse usando anticuerpos específicos y un clasificador de células activadas por fluorescencia (Facs). El análisis Facs permite determinar la cantidad relativa de células que expresan un cierto marcador o una combinación de marcadores. En este contexto, la expresión indetectable de un marcador (por ejemplo, de Foxp3), se refiere a una población de células donde menos de un 1 %, menos de un 0,5 % o incluso menos de un 0,1 % de las células expresan dicho marcador o combinación de marcadores.

El análisis Facs también se usa en este documento para determinar si dos o más marcadores se coexpresan. En este contexto, dos proteínas se consideran coexpresadas cuando al menos un 70, 80, 90, 95 o 99 % de las células en una población de células se tiñen positivas para dichos dos o más marcadores en un análisis Facs.

La producción de citocinas tales como IL-10 y TGF-beta, IFN-gamma, IL-4, IL5, IL-17 e IL13, y de FasL soluble se determinó por ELISA, pero también puede determinarse por un ensayo ELISPOT. Las concentraciones de citocinas son cuantificables por determinación de densidad óptica en solución (ELISA) o pueden contarse manualmente las manchas que indican la presencia de citocinas (por ejemplo, con un microscopio de disección) o usando un lector automatizado para capturar las imágenes de los micropocillos y para analizar el número y tamaño de manchas (ELISPOT). La producción de citocinas determinada por ELISA se considera "indetectable" cuando la concentración está por debajo de 50 pg/ml, por debajo de 20 pg/ml o incluso por debajo de 10 pg/ml, y puede depender del tipo de anticuerpo y el proveedor). La producción de citocinas determinada por ELISA se considera "muy baja" cuando la concentración está entre 50 y 1000 pg/ml, entre 100 y 1000 pg/ml o entre 200 y 1000 pg/ml. La producción de citocinas determinada por ELISA se considera "elevada" cuando la concentración está por encima de 1000 pg/ml, 2000 pg/ml, 5000 pg/ml o incluso por encima de 7500 pg/ml.

La producción de proteínas transmembrana (tales como FasL) determinada por ELISA se considera "elevada" cuando la concentración está por encima de 50 pg/ml, 75 pg/ml, 100 pg/ml o incluso por encima de 150 pg/ml.

En general, las mediciones de concentración se refieren a condiciones donde la producción de proteínas de aproximadamente 100 000 células se ensaya en un volumen de 200 µl.

La inducción de la apoptosis en APC o linfocitos T espectadores puede medirse evaluando la unión de anexina V a fosfatidilserina expuesta como resultado de la apoptosis.

El aumento de la actividad cinasa de la serina-treonina cinasa AKT en los linfocitos T reguladores CD4+ citolíticos o citotóxicos es de aproximadamente 2 veces en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales, o puede ser de hasta 3, 4, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, y puede determinarse por métodos conocidos en la técnica como se explica anteriormente.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención limitante. Además, todas las referencias descritas en este documento se incluyen explícitamente en este documento por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1. Lista de péptidos usados en los ejemplos

SEQ ID NO: 1, CHGSEPCIIHRGKPF (mencionada en las figuras como Der p2), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 21 a 35 del alérgeno Der p 2 y que contiene un epítopo de linfocitos T y una secuencia de tiorreductasa (subrayada).

SEQ ID NO: 2, CGPCGGYRSPFSRVVHLYRNGK (mencionada en las figuras como MOG+), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 40-55 derivada de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y modificada por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) separado del primer resto de anclaje de MHC de clase II por una secuencia Gly-Gly.

SEQ ID NO: 3, CGPCGGYVPFHIQVP (mencionada en las figuras como LP HAdV5), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 555-563 de la proteína 2 tardía (familia de proteínas de hexón) derivada de adenovirus 5 humano (HAdV-5) y modificada por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) separado del primer resto de anclaje de MHC de clase II por una secuencia Gly-Gly.

SEQ ID NO: 4, CGHCGGAAHAEINEAGR (mencionada en las figuras como OVA+), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 330-340 derivada de ovoalbúmina de pollo y modificada por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) separado del primer resto de anclaje de MHC de clase II por una secuencia Gly-Gly.

SEQ ID NO: 5, CHGCGGEPCIIHRGKPF (mencionada en las figuras como Der p2+), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 25 a 35 del alérgeno Der p 2 y modificada por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) separado del primer resto de anclaje de MHC de clase II por una secuencia Gly-Gly.

SEQ ID NO: 6, YRSPFSRVVHLYRNGK (mencionada en las figuras como MOG-), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 40-55 derivada de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG).

SEQ ID NO: 7, IIARYIRLHPTHYSIRST (mencionada en las figuras como fVIII-), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 2144-2161 derivada del dominio C1 del factor VIII humano.

SEQ ID NO: 8, CGFSSNYCQIYPPNANKIR (mencionada en las figuras como Der p1+), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 114 a 128 del alérgeno Der p 1 y modificada por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) a la parte amino-terminal del primer resto de anclaje de MHC de clase II.

SEQ ID NO: 9, NACHYMKCPLVKGQQ (mencionada en las figuras como Der p2*), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 71 a 85 del alérgeno Der p 2.

SEQ ID NO: 10, CHGAEPCIIHRGKPF (mencionada en las figuras como Der p2mut), correspondiente al péptido de la SEQ ID NO: 1 que contiene una única mutación de S a A (subrayada) que anula la actividad tiorreductasa del péptido.

SEQ ID NO: 11, TYLRLVKIN (mencionada en las figuras como gD HSV1-), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 188 a 196 derivada de la glucoproteína D del herpesvirus 1 humano.

SEQ ID NO: 12, CGHCTYLRLVKIN (mencionada en las figuras como gD HSV1+), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 188 a 196 derivada de la glucoproteína D del herpesvirus 1 humano y modificada por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) a la parte amino-terminal del primer resto de anclaje de MHC de clase II.

SEQ ID NO: 13, SNYCQIYPPNANKIR (mencionada en las figuras como Der p1-), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 114 a 128 del alérgeno Der p 1.

SEQ ID NO: 14, ISQAVHAAHAEINEAGR (mencionada en las figuras como OVA-) correspondiente a la secuencia de aminoácidos 324-340 derivada de ovoalbúmina de pollo.

Ejemplo 2. Los clones de linfocitos T CD4+ citolíticos expresan marcadores asociados con linfocitos T reguladores

El fenotipo de los linfocitos T reguladores naturales se caracteriza por elevada expresión de CD25 en reposo, junto con una elevada expresión de CTLA-4 intracelular y GITR superficial (receptor de TNF inducido por glucocorticoides), que distingue los linfocitos T reguladores de las células efectoras.

Se usaron péptidos derivados de 4 antígenos distintos: un alérgeno, un autoantígeno y un antígeno de superficie derivado de virus y un antígeno común.

Los linfocitos T CD4+ se obtuvieron del bazo de ratones BALB/c inmunizados con el péptido p21-35 (SEQ ID NO: 1, CHGSEPCIIHRGKPF), seguido de purificación por clasificación con microesferas magnéticas. Se obtuvo un clon de linfocitos T por estimulación *in vitro* con APC cargadas de péptido (cargadas con el péptido de la SEQ ID NO: 1). Las

células clonales se analizaron en el día 15 después de la estimulación por clasificación celular activada por fluorescencia (Facs) usando un citómetro de flujo FACSCalibur©. Los linfocitos T CD4+ se tiñeron con un anticuerpo que reconocía CD25, después se permeabilizaron con saponina antes de la incubación con un anticuerpo específico para CTLA-4. Los datos muestran una fuerte positividad tanto para CD25 como para CTLA-4 (figura 1A). El clon de linfocitos T también se ensayó para la expresión de GITR y CD28, que muestra una fuerte positividad para GITR (figura 1D), pero ausencia de CD28 (figura 1F). Un clon de linfocitos T CD4+ obtenido después de inmunización de los ratones con el péptido de la SEQ ID NO: 2 (CGPCGGYRSPFSRVVHLYRNGK) se ensayó con respecto a la expresión de CD25 (figura 1B) y CD28 (figura 1G), que muestra fuerte expresión de CD25, pero ausencia de CD28. Además, se demostró la expresión de CD25 (figura 1C) o la ausencia de expresión de CD28 (figura 1H) para un clon obtenido después de inmunización con el péptido de la SEQ ID NO: 3 (CGPCGGYVPFHIQVP). La expresión de GITR superficial, un rasgo característico de los 3 clones mostrados anteriormente también se observó con un clon de linfocitos T CD4 específico para el péptido de la SEQ ID NO: 4 (CGHCGGAAHAEINEAGR), figura 1E.

Ejemplo 3. Los clones de linfocitos T CD4+ citolíticos coexpresan los factores de transcripción T-bet y GATA3, pero no Foxp3

T-bet se considera un marcador de células Th1 y GATA3 como un marcador de células Th2. En células auxiliares, la expresión de T-bet excluye la expresión de GATA3 y viceversa.

Se obtuvo un clon de linfocitos T como se describe en el ejemplo 2 con un péptido de la SEQ ID NO: 1. Después de la estimulación antigénica, las células se fijaron y permeabilizaron antes de la tinción intracelular con anticuerpos específicos contra Foxp3, T-bet o GATA3 y se analizaron por Facs como se describe en el ejemplo 2. Las células demostraron ser positivas tanto para T-bet como para GATA3, pero no para Foxp3 (figura 2A). También se muestra tinción doble con T-bet y GATA3 de un clon de linfocitos T obtenido por inmunización con el péptido de la SEQ ID NO: 4 (figura 2B, panel superior) o por el péptido de la SEQ ID NO: 2 (figura 2C, panel inferior).

Ejemplo 4. Los clones de linfocitos T CD4+ citolíticos producen FasL soluble e IFN-gamma.

El perfil de citocinas producidas por las células efectoras caracteriza el subconjunto al que pertenecen las células. Las células Th1 producen IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa, las células Th2 producen IL-4, IL5, IL13 e IL-10, y las células Th17 producen IL-17 e IL-6.

Se obtuvieron dos clones distintos de linfocitos T de 2 ratones inmunizados con un péptido que contenía un motivo de tiorreductasa (SEQ ID NO: 5, CHGCGGEPCIIHRGKPF).

Además, se obtuvieron líneas de linfocitos T de ratones inmunizados con un epítopo de linfocitos T en la secuencia natural (SEQ ID NO: 6, YRSPFSRVVHLYRNGK) derivada de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y se estimularon *in vitro* en presencia del mismo epítopo de linfocitos T modificado por adición de un motivo de tiorreductasa (subrayado) separado del primer resto de anclaje de MHC de clase II por una secuencia Gly-Gly (SEQ ID NO: 2, CGPCGGYRSPFSRVVHLYRNGK).

Los dos clones de linfocitos T CD4 específicos para la SEQ ID NO: 5 y una línea de linfocitos T CD4 específica para la SEQ ID NO: 6 se estimularon con péptidos durante 48 h y los sobrenadantes se evaluaron con respecto a la presencia de citocinas y de FasL usando ELISA con anticuerpos específicos. La tabla 1 muestra que los dos clones de linfocitos T CD4 obtenidos de la inmunización con péptido de la SEQ ID NO: 5 y el clon de linfocitos T CD4 obtenido con la secuencia natural SEQ ID NO: 6, cuando se estimulan *in vitro* con el péptido de la SEQ ID NO: 5 para los dos primeros clones o el péptido de la SEQ ID NO: 2 para el tercer clon, se detectaban cantidades significativas de FasL soluble en los sobrenadantes. Por comparación, el clon de linfocitos T obtenido por inmunización con el péptido de la SEQ ID NO: 6 se estimuló *in vitro* con el mismo péptido, no se detectó FasL. Se muestra un control adicional, preparado a partir de un clon de linfocitos T estimulado por el péptido de la SEQ ID NO: 7 (IIARYIRLHPTHYSIRST, un epítopo de linfocitos T derivado del factor VIII humano), que no contiene un motivo tiorreductasa.

Tabla 1

Especificidad de linfocitos T	sFAS-L (pg/ml)
T cCD4 (R3TB7) para la SEQ ID NO: 5	115,1
T cCD4 (22N) para la SEQ ID NO: 5	176,1
T cCD4 para la SEQ ID NO: 2	50,8
T CD4 para la SEQ ID NO: 6	ND
T CD4 (p352a) para la SEQ ID NO: 7	ND

Un hallazgo coherente con todos los clones obtenidos por inmunización con péptidos que contienen un motivo tiorreductasa, o linfocitos T CD4 efectores estimulados *in vitro* con péptidos que contienen un motivo tiorreductasa, fue la producción mantenida de IFN-gamma, mientras que no se detectó IL-2, TGF-beta e IL-17 (ND). Pudieron detectarse bajas concentraciones de IL-4, IL5 e IL-10, que se correlacionan con el perfil de citocinas de la célula efectora correspondiente (tabla 2).

Tabla 2

	TGF-β	IL-17	IFN-γ	IL5	IL-4	IL-10	IL-2
T cCD4 (R3TB7) para la SEQ ID NO: 5	ND	ND	4151	8	ND	ND	ND
T cCD4 (22N) para la SEQ ID NO: 5	ND	ND	9139	2	ND	102	ND
T cCD4 para la SEQ ID NO: 2	ND	ND	133	16	ND	ND	ND
T CD4 para la SEQ ID NO: 6	ND	ND	4652	2538	42	5001	7
T CD4 (p352a) para la SEQ ID NO: 7	ND	ND	131	725	252	3847	19
las concentraciones de citocinas se expresan como pg/ml							

Ejemplo 5. Los linfocitos T CD4+ citolíticos son distintos de los linfocitos NK

Los linfocitos NK se caracterizan por la expresión de CD49b y NKG2D, pero no CD4.

Se obtuvieron clones de linfocitos T de ratones inmunizados con los péptidos de la SEQ ID NO: 5 o de la SEQ ID NO: 4. Dichos clones se analizaron por clasificación celular activada por fluorescencia para la expresión del marcador celular CD49b en el día 14 después de la reestimulación *in vitro*. Se usaron anticuerpos específicos para CD49b (anticuerpo DX5) en el análisis FACS.

Los resultados indicaron que los dos clones (figura 3A y figura 3B, respectivamente) eran uniformemente negativos para CD49b, distinguiendo de ese modo los clones de linfocitos T citolíticos de los linfocitos NK.

Las figuras 3C y 3D muestran la expresión de NKG2D en células CD4 citolíticas obtenidas de ratones inmunizados con el péptido de SEQ ID NO: 5 o el péptido de la SEQ ID NO: 8 (CGFSSNYCQIYPPNANKIR), respectivamente.

Por comparación, se evaluó la expresión de NKG2D sobre clones de linfocitos T CD4 efectores obtenidos por inmunización por el péptido de la SEQ ID NO: 9 (NACHYMKCPLVKGQQ) o de la SEQ ID NO: 7, que no contenía motivo tiorreductasa (figuras 3E y 3F, respectivamente) y los linfocitos T CD4 efectores obtenidos por inmunización con un alérgeno completo, Der p2 (figura 3G, indicado en la figura 3G como Der p2 FL). Ninguno de estos linfocitos T CD4 efectores no citolíticos expresaba NKG2D.

Ejemplo 6. Los linfocitos T CD4+ citolíticos son distintos de los linfocitos NKT

Los linfocitos NKT portan una cadena alfa invariante (Valfa14-Jalfa281 en el ratón, Valfa24-JQ en el ser humano) y una cadena beta variable pero no reordenada a nivel TCR. Además, los linfocitos NKT producen altas concentraciones de IL-4, y la mayoría de los linfocitos NKT están restringidos por la molécula CD1 d. La restricción de CD1 d se refiere al hecho de que el reconocimiento de un antígeno cargado por una célula CD1 d+ (célula presentadora de antígeno) está mediado a través del reconocimiento del antígeno por un linfocito T cuando dicho antígeno se presenta por la molécula CD1 d. En el presente ejemplo, la célula presentadora de antígeno se reemplaza por una soluble de CD1 d (BD™ DimerX; Becton Dickinson).

Se evaluó un clon de linfocitos T obtenido como en el ejemplo 5 por estimulación con el péptido de la SEQ ID NO: 5 en el día 14 después de la reestimulación. La tabla 2 muestra que dicho clon (R3TB7) no produce concentraciones detectables de IL-4, distinguiendo este clon de los linfocitos NKT. Las células se analizaron adicionalmente por Facs usando anticuerpos específicos contra el TCR Vbeta8-1 (figura 4A). Además, la secuencia de la cadena alfa del TCR se obtuvo por PCR. Los resultados indican que el clon expresaba una cadena Vbeta reordenada y una secuencia Valfa que pertenece a la subfamilia Valfaδ (y no la secuencia de la cadena TCR Valfa14-Jalfa281 invariante), distinguiendo de ese modo los linfocitos T CD4+ citolíticos (R3TB7) de los linfocitos NKT (figura 4B). El clon de linfocitos T se ensayó adicionalmente para tinción con el péptido de la SEQ ID NO: 5 - CD1 d cargado - molécula Ig (BD™ DimerX; Becton Dickinson) y se analizó por Facs. Este experimento demuestra que el péptido antigénico no se carga en CD1 d soluble y/o que el linfocito T cCD4+ no está equipado con el receptor apropiado para reconocer el péptido asociado con la molécula CD1 d.

Los resultados indican que las células CD4+ citolíticas no estaban restringidas por la molécula CD1 d, distinguiéndolas adicionalmente de los linfocitos NKT CD4+ (figura 4C). Los datos son representativos de diferentes clones con distinta especificidad de antígeno.

Ejemplo 7. Los linfocitos T CD4+ citolíticos muestran fosforilación de AKT en contraste con las células reguladoras CD4+ naturales

En linfocitos T CD4, la fosforilación de Ser473 de la serina-treonina cinasa AKT es indicativa de su actividad. Para demostrar que la actividad cinasa de AKT estaba presente y/o aumentada cuando los linfocitos T CD4+ se incubaban con péptidos que contienen un motivo tiorreductasa, se hizo uso del péptido de la SEQ ID NO: 5 (que contiene dicho motivo) y el péptido de la SEQ ID NO: 10 (CHGAEPCIIHRGKPF, que contiene una única mutación de S a A (subrayada) que anula la actividad tiorreductasa del péptido de la SEQ ID NO: 1).

El clon de linfocitos T CD4+ citolítico R3TB7 se obtuvo por inmunización con el péptido de la SEQ ID NO: 1, seguido por clonación y amplificación en presencia de células dendríticas que presentan el mismo péptido. El clon de linfocitos T CD4+ R3TB7 se incubó durante 30 minutos con células presentadoras de antígeno (células dendríticas) sin péptido (figura 5, carril 1), con APC precargada con péptido de oxidorreducción inactiva de la SEQ ID NO: 10 (figura 5, carril 2) o con APC precargada con un péptido de oxidorreducción activa de la SEQ ID NO: 5 (figura 5, carril 3). Las células después se lisaron y se procesó una alícuota en SDS-PAGE, las proteínas entonces se transfirieron a una membrana de PVDF y se sondearon para la forma fosforilada de AKT (Ser473) usando un anticuerpo específico. También se incluyó un control que no contenía linfocitos T (carril 4). La fosforilación resultante de la serina-treonina cinasa AKT en linfocitos T CD4+ incubados con péptido de oxidorreducción activa de la SEQ ID NO: 5 fue 5,5 veces mayor en comparación con AKT en los mismos linfocitos T CD4+ incubados sin APC no cargadas (figura 5, carril 1, que imita los linfocitos T reguladores CD4+ naturales), y 2 veces mayor en comparación con AKT en los mismos linfocitos T CD4+ incubados con el péptido de oxidorreducción inactiva de la SEQ ID NO: 10.

Por tanto, el clon de linfocitos T CD4+ obtenido de animales inmunizados con un péptido que contiene tiorreductasa muestra fuerte actividad cinasa de AKT cuando se incuba *in vitro* con un péptido que contiene una actividad tiorreductasa (péptido de la SEQ ID NO: 5), aún mantiene actividad cinasa AKT cuando se incuba con un péptido del que se ha eliminado la actividad tiorreductasa por mutación (péptido de la SEQ ID NO: 10), lo que ilustra el cometido estable del clon de linfocitos T en condiciones de estimulación *in vitro*. Estos resultados ilustrados se obtuvieron después de una única incubación de células con péptidos. Esta observación inesperada contrasta con los resultados divulgados por Crellin *et al*. (2007) Blood 109, 2014-2022) que demuestra una actividad cinasa disminuida de AKT asociada con linfocitos T reguladores CD4+ naturales, y enfatiza la diferencia entre los linfocitos T CD4+ citolíticos con propiedades supresoras y los linfocitos T reguladores CD4+ naturales.

Para determinar si los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente mostraban actividad cinasa AKT aumentada cuando se incubaban *in vitro* con péptidos que contienen un motivo tiorreductasa, se purificaron linfocitos T CD4 de esplenocitos de ratones C57BL/6 sin tratar previamente que expresaban un transgén TCR específico para el péptido de la SEQ ID NO: 6. Las células se estimularon una vez durante 15 minutos con esplenocitos reducidos en linfocitos T precargados con el péptido de la SEQ ID NO: 6 (figura 5, carril 5) que no contenía motivo tiorreductasa, o con péptido de la SEQ ID NO: 2 (figura 5, carril 6) que contiene un motivo tiorreductasa. La lisis celular y la electroforesis por SDS-PAGE se realizaron como se describe anteriormente. La membrana se sondeó con el anticuerpo que reconoce AKT activada (Ser473). El análisis densitométrico mostró que la fosforilación de AKT era un 30 % mayor cuando se estimulaban células sin tratar previamente con el péptido de la SEQ ID NO: 2 que la fosforilación obtenida con el péptido de la SEQ ID NO: 6. Por tanto, una única incubación de linfocitos T CD4 no expuestos previamente con un péptido que contiene un motivo tiorreductasa es suficiente para provocar actividad cinasa significativamente mayor de AKT que la observada con células incubadas con el mismo péptido pero sin motivo tiorreductasa.

Ejemplo 8. Los linfocitos T CD4+ citolíticos inducen apoptosis de células presentadoras de antígeno después de reconocimiento de péptidos afines

Se cargaron dos poblaciones distintas de APC (células WEHI) durante 1 h con péptido de la SEQ ID NO: 1 o con péptido de la SEQ ID NO: 9. Las células cargadas con péptido de la SEQ ID NO: 1 se marcaron con CFSE 80 nM; las cargadas con péptido de la SEQ ID NO: 9 se marcaron con CFSE 300 nM. Las dos poblaciones de APC podían distinguirse con ello entre sí. CFSE es un marcador de proteínas citoplasmáticas que posibilita el seguimiento de las divisiones celulares basándose en la intensidad de tinción, que se reduce en un 50 % después de cada división celular, pero también la identificación de una población celular dentro de mezclas complejas de células en cultivo. Las células marcadas con CFSE se mezclaron y posteriormente se incubaron durante 18 h con un clon de linfocitos T CD4 citolítico (G121) obtenido por inmunización con el péptido de la SEQ ID NO: 1. El péptido p71 -85 (SEQ ID NO: 9, Der p2*-) representa un epítopo de linfocitos T principal alternativo derivado de Der p2, pero no comprende un motivo de tiorreductasa activa. La apoptosis de APC marcadas con CFSE se midió por la unión de anexina V. Las células WEHI que presentan p21 -35 se lisaron completamente, mientras que solo aproximadamente un 40 % de las células cargadas con p71 -85 (SEQ ID NO: 1, Der p2) se veían afectadas. Como control, se usaron APC no cargadas. Los resultados se representan en la figura 6A.

La figura 6B muestra que los linfocitos B esplénicos de ratones C57BL/6 sin tratar previamente se inducían a apoptosis cuando se cultivaban durante 18 h con un clon de linfocitos T CD4 citolítico obtenido de ratones inmunizados con el péptido de la SEQ ID NO: 2, como se muestra por la tinción doble con anexina V y 7-AAD (figura 6B, panel inferior) pero no cuando el antígeno estaba ausente (figura 6B, panel superior).

La figura 6C muestra la eliminación de las células WEHI B teñidas con CFSE cargadas con el péptido de la SEQ ID NO: 11 (TYLRLVKIN, un epítopo T derivado del virus HSV-1) y cocultivadas durante 18 h con una línea celular obtenida de ratones inmunizados con el péptido de la SEQ ID NO: 12 (CGHCTYLRLVKIN), que comprende un motivo tiorreductasa. Más de un 65 % de las células WEHI se tiñeron positivas para anexina V (figura 6C, panel inferior), en oposición a la tinción de fondo (19 %) obtenida cuando se usaba una línea de linfocitos T de control derivada de ratones inmunizados con un péptido de la SEQ ID NO: 11 (figura 6C, panel superior).

Ejemplo 9. Los linfocitos T CD4+ citolíticos inducen apoptosis por linfocitos T espectadores

Se examinó el mecanismo de supresión de linfocitos T espectadores con linfocitos T CD4+CD25(-) policlonales y con diversos clones de linfocitos T efectores CD4+.

Se ensayó la capacidad de los linfocitos T CD4+ citolíticos de suprimir la proliferación de linfocitos T CD4+CD25(-) marcados con CFSE activados por incubación con un anticuerpo contra CD3 en presencia de células presentadoras de antígeno. Se usaron dos clones de linfocitos T CD4+ citolíticos provocados por inmunización con el péptido de la SEQ ID NO: 1 (G121 y R3TB7, respectivamente; indicados en la figura 7A como "clon CD4+ (Der p2)"). Las APC se cargaron con el péptido de la SEQ ID NO: 5 (indicado en la figura 7A como "APC (Der p 2+)"). El número de linfocitos T CD4+CD25(-) detectables (tramos), así como el número de divisiones observadas disminuía drásticamente en 48 h de incubación cuando se añadía uno de los dos clones citolíticos (figura 7A, paneles central y derecho). De forma interesante, se lisaban solamente los linfocitos T CD4+CD25(-) activados. El experimento de control en que los linfocitos T CD4+ citolíticos se reemplazaban por un número idéntico de linfocitos T CD4+CD25(-) no marcados eliminaba un posible artefacto relacionado con números variables de células totales en el medio de cultivo (figura 7A, panel izquierdo). P1 a P3 en la figura representan la disminución en el marcaje con CFSE como una función del número de divisiones celulares.

Un clon de linfocitos T CD4+ efector obtenido de ratones BALB/c inmunizados con un epítopo principal del alérgeno Der p1 (SNYCQIYPPNANKIR, SEQ ID NO: 13) se marcó con CFSE y se incubó con APC cargada con el mismo péptido (114-128). Cuando se añadió un número idéntico de células efectoras no marcadas, se observaba una mortalidad basal de un 40 % de las células marcadas con CFSE. Cuando se cultivaban con un clon de células CD4 citolíticas obtenidas de ratones inmunizados con el péptido de la SEQ ID NO: 8, moría más de un 73 % de los linfocitos T efectores.

Se obtuvieron resultados similares cuando se usaba una línea de linfocitos T CD4 obtenida de ratones inmunizados con el epítopo natural de ovoalbúmina (ISQAVHAAHAEINEAGR, SEQ ID NO: 14) como diana espectadora para apoptosis. La línea celular se marcó con CFSE (indicada en la figura 7B como "CD4+ (OVA-) marcada") y se cultivó con APC esplénica cargada con péptido de la SEQ ID NO: 14 (indicada en la figura 7B como "APC (OVA-)") seguido por tinción con los marcadores de apoptosis anexina V y 7-AAD.

La figura 7B muestra que un 27 % o un 24 % de las células CD4 espectadoras estaban vivas (negativas para anexina V y 7-AAD) cuando se cultivaban con APC en solitario (panel izquierdo) o con APC y la misma línea de linfocitos T CD4+ no marcados (indicada en la figura 7B como "CD4+ (OVA-) no marcada"; panel derecho de la figura 7B), respectivamente. Cuando se cocultivaban con una línea de linfocitos T derivada de ratones inmunizados con el péptido de ovoalbúmina que comprende el motivo tiorreductasa (SEQ ID NO: 4; línea celular indicada en la figura 7B como "CD4+ (OVA+)"), se detectaba menos de un 1 % de las células espectadoras marcadas dentro de la región doble negativa correspondiente a células vivas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Life Sciences Research Partners VZW Saint-Remy, Jean-Marie

<120> Linfocitos T CD4+ con propiedades citolíticas

<130> T5213-PCT (047)

<150> EP 08447006.1
<151> 14-02-2008

<150> US 61/035.908
<151> 12-03-2008

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos 21-35 del alérgeno Der p2

<400> 1

Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
1 5 10 15

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T de MOG modificado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> conector Gly-Gly

<400> 2

Cys Gly Pro Cys Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His
1 5 10 15

Leu Tyr Arg Asn Gly Lys 20

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T de HAdV-5 modificado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> conector Gly-Gly

<400> 3

Cys Gly Pro Cys Gly Gly Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro
1 5 10 15

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T de ovoalbúmina de pollo modificado

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> conector Gly-Gly

<400> 4

Cys Gly His Cys Gly Gly Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T de Der p2 modificado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> conector Gly-Gly

<400> 5

Cys His Gly Cys Gly Gly Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro
1 5 10 15

Phe

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T de MOG, aminoácidos 40-55 de MOG

<400> 6

Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys
1 5 10 15

<210> 7
<211> 18
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos 2144-2161 del factor VIII humano

<400> 7

Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
1 5 10 15

Ser Thr

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T modificado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

<400> 8

Cys Gly Phe Ser Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn
1 5 10 15

Lys Ile Arg

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos 71-85 del alérgeno Der p2

<400> 9

Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alérgeno Der p2 mutado con mutación de Ser a Ala en la posición 4

<400> 10

Cys His Gly Ala Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
1 5 10 15

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos 188-196 de la glucoproteína D de herpesvirus 1 humano

<400> 11

Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn
1 5

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo de linfocitos T modificado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

<400> 12

Cys Gly His Cys Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos 114-128 del alérgeno Der p1

<400> 13

Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
1 5 10 15

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> aminoácidos 324-340 de ovoalbúmina de pollo

<400> 14

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 15
<211> 28
<212> PRT
<213> ratón

<400> 15

Cys Ala Ala Arg Ser Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ile Phe Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Gln Leu Thr Val Met Pro Asp Ile Gln Asn Pro
20 25

<210> 16
<211> 25
<212> PRT
<213> ratón

<400> 16

Cys Val Val Gly Asp Arg Gly Ser Ala Leu Gly Arg Leu His Phe Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Gln Leu Ile Val Ile Pro
20 25

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia general del péptido de la invención

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítopo de linfocitos T

<400> 17

Cys Xaa Xaa Cys Gly Xaa
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia general del péptido de la invención

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítopo de linfocitos T

<400> 18

Cys Xaa Xaa Cys Gly Gly Xaa
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia general del péptido de la invención

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítopo de linfocitos T

<400> 19

Cys Xaa Xaa Cys Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia general del péptido de la invención

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítopo de linfocitos T

<400> 20

Cys Xaa Xaa Cys Ser Gly Ser Gly Xaa
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de identificación de una población de linfocitos T CD4+ citolíticos que inducen apoptosis, comprendiendo dicho método las etapas de:

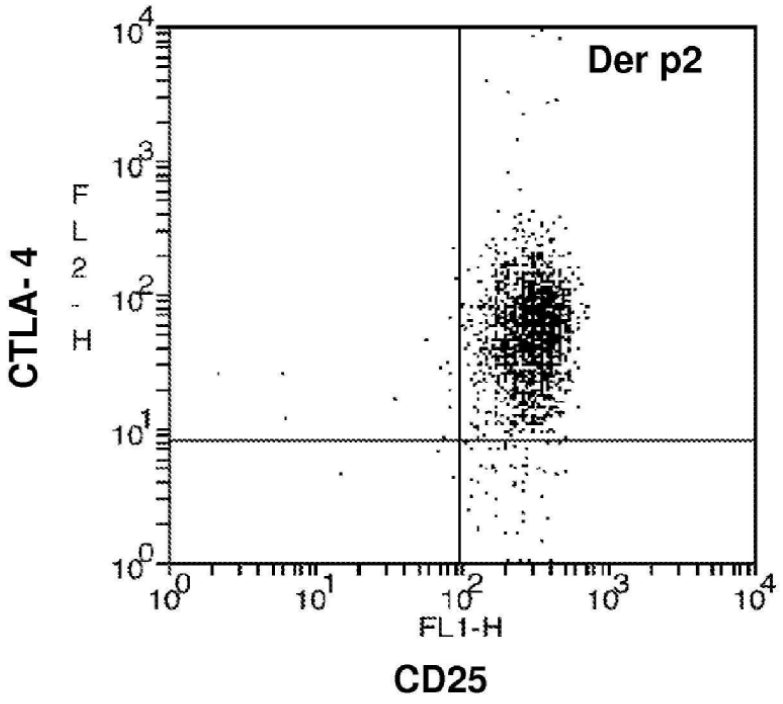
- proporcionar linfocitos T reguladores CD4+ sospechosos de ser citolíticos, y
- determinar que dichos linfocitos T presentan expresión indetectable del represor de la transcripción Foxp3 y presentan, en comparación con los linfocitos T reguladores CD4+ naturales aislados, una actividad aumentada de la serina-treonina cinasa AKT.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente dicho método la etapa de determinar que dichos linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citolíticos presentan producción indetectable de TGF-beta y producción indetectable o muy baja de IL-10 en comparación con linfocitos T reguladores CD4+ naturales aislados.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente la etapa de determinar la inducción de la apoptosis en células presentadoras de antígeno.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos linfocitos T CD4+ sospechosos de ser citolíticos están en estado de reposo.

A



B

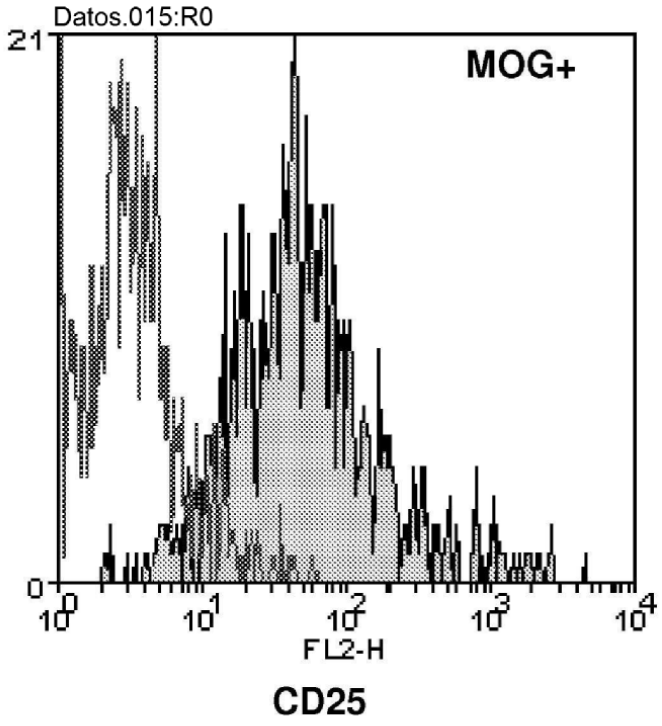
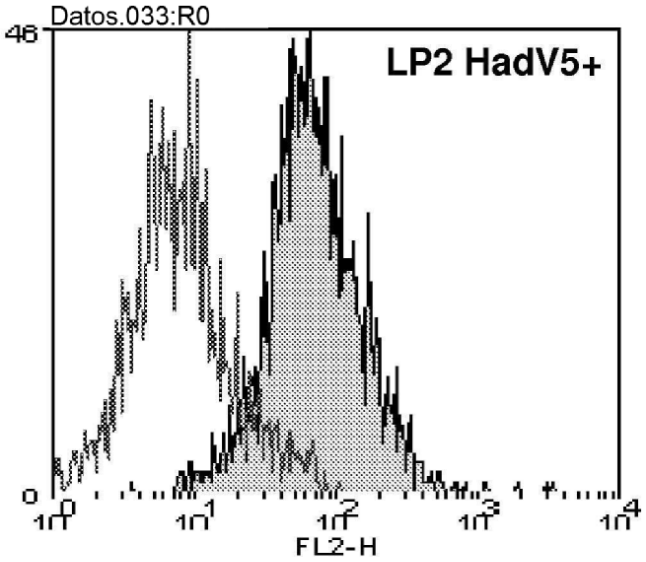


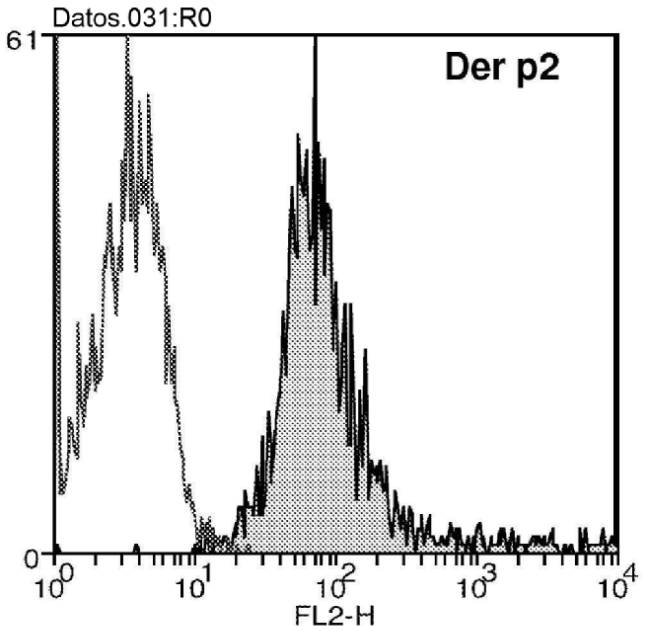
FIGURA 1

C



CD25 FITC

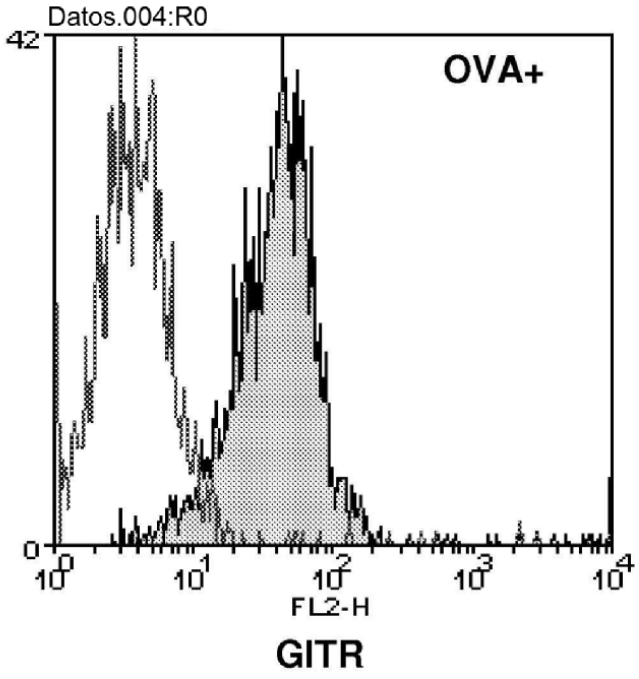
D



GITR

FIGURA 1 (continuación)

E



F

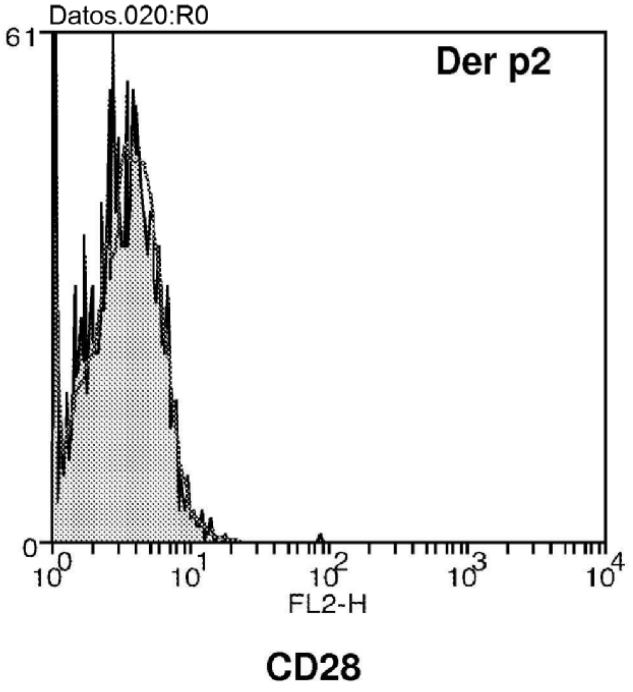
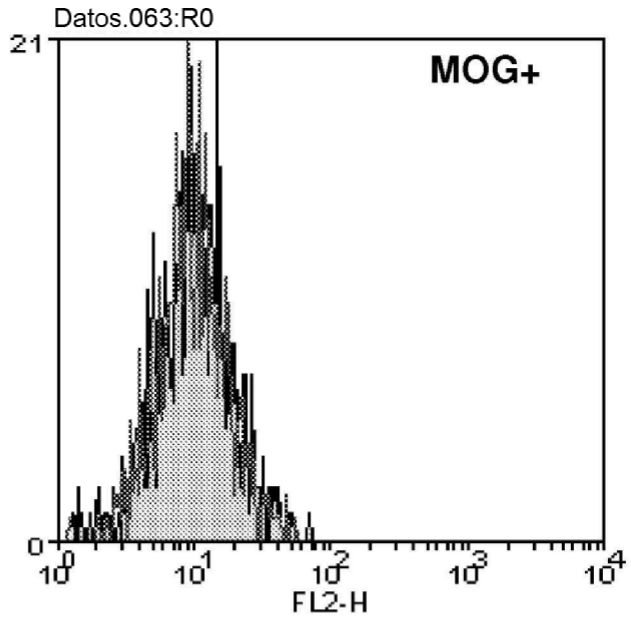


FIGURA 1 (continuación)

G



H

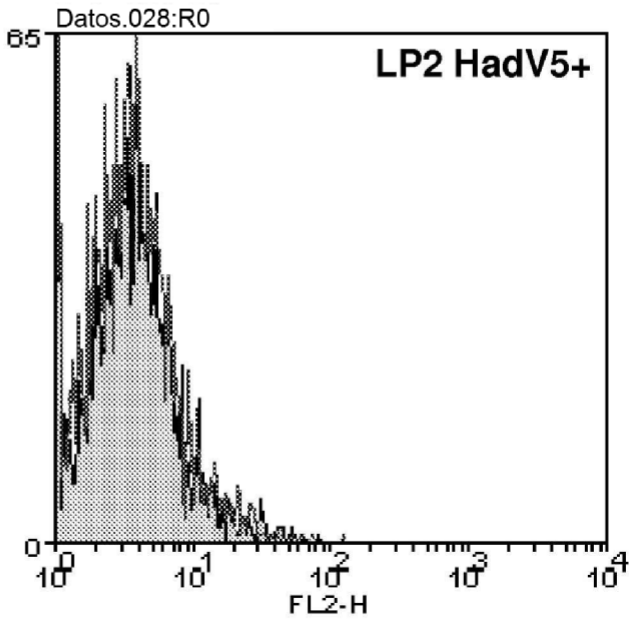


FIGURA 1 (continuación)

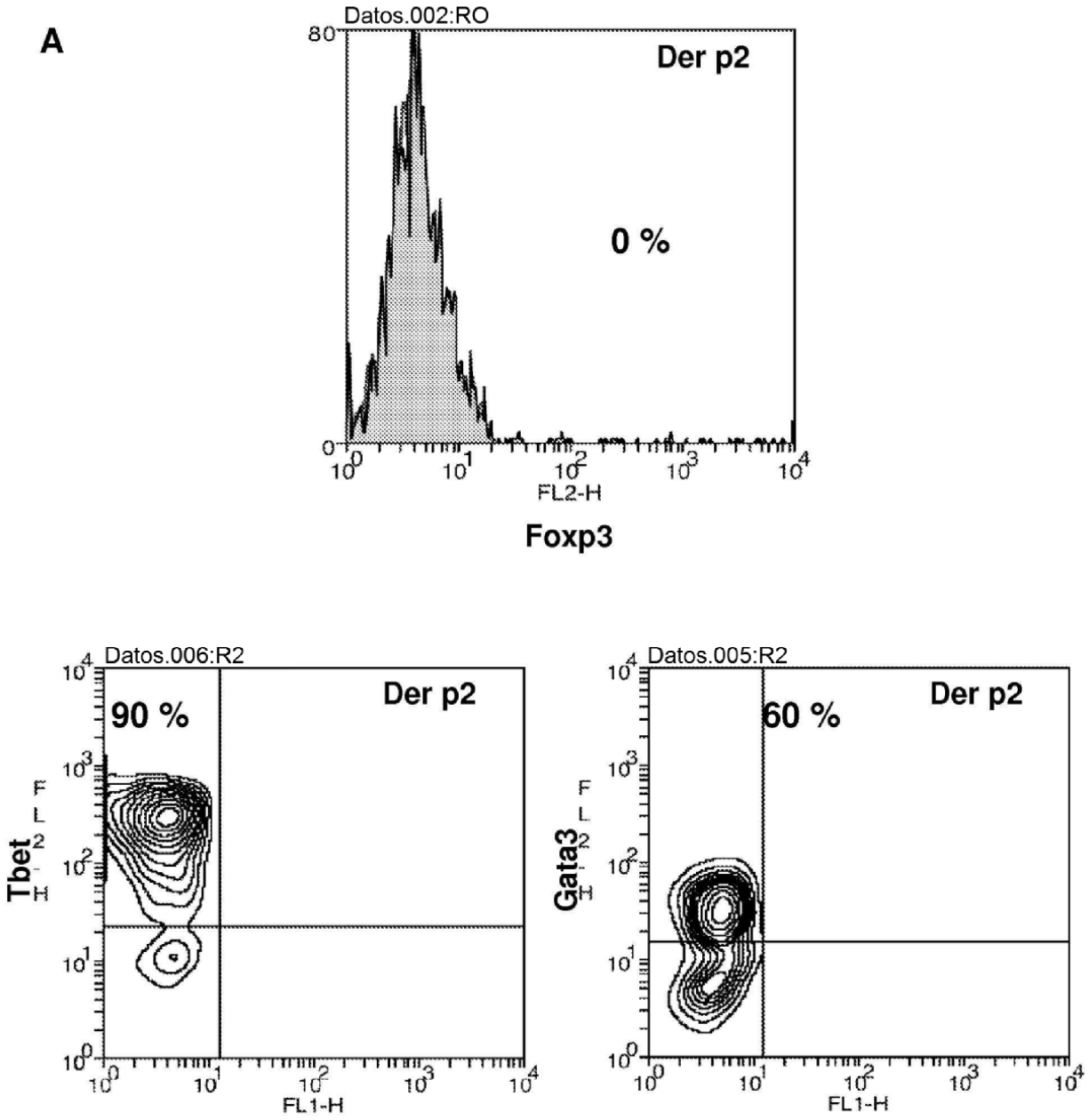

A
Datos.002:RO
Der p2
0 %
FL2-H
Foxp3
Datos.006:R2
Der p2
90 %
Tbet
FL1-H
Datos.005:R2
Der p2
60 %
Gata3
FL1-H

FIGURA 2

B

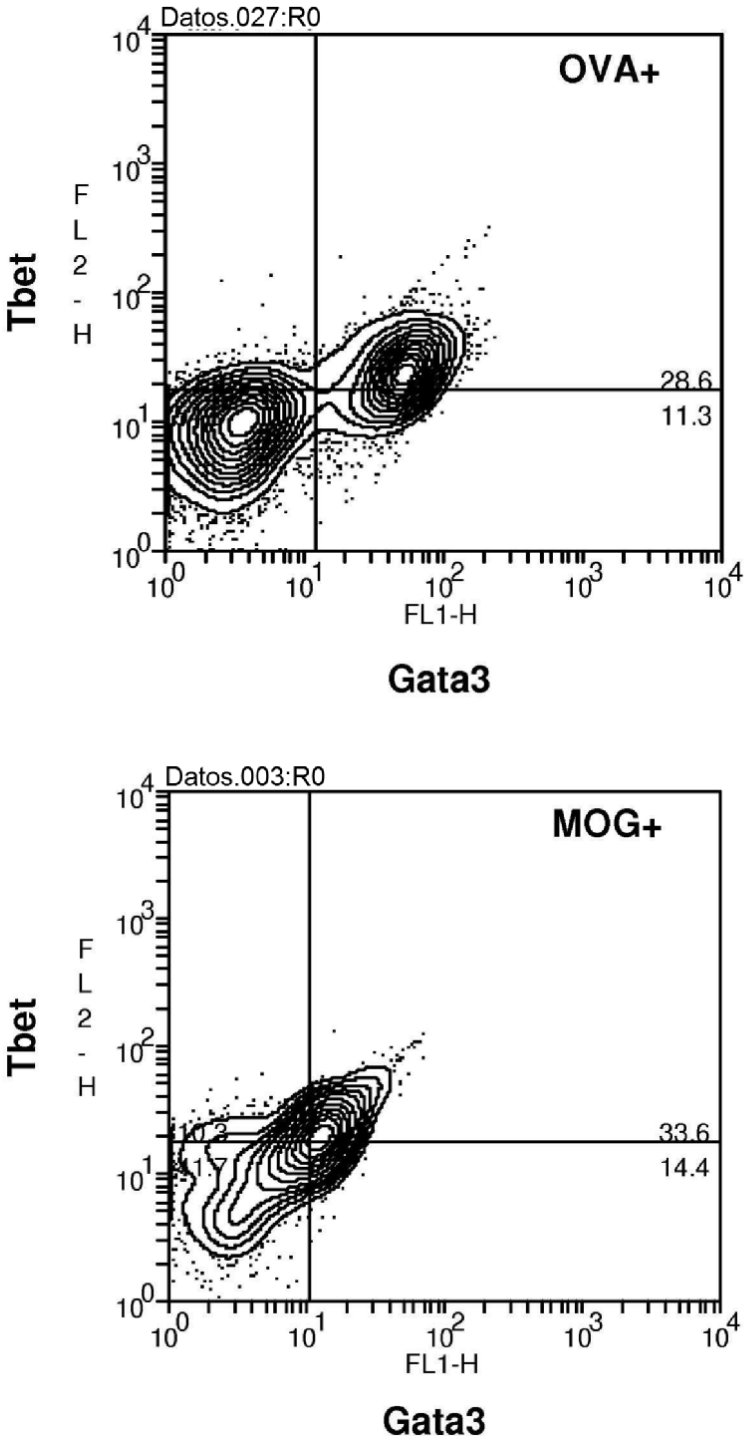
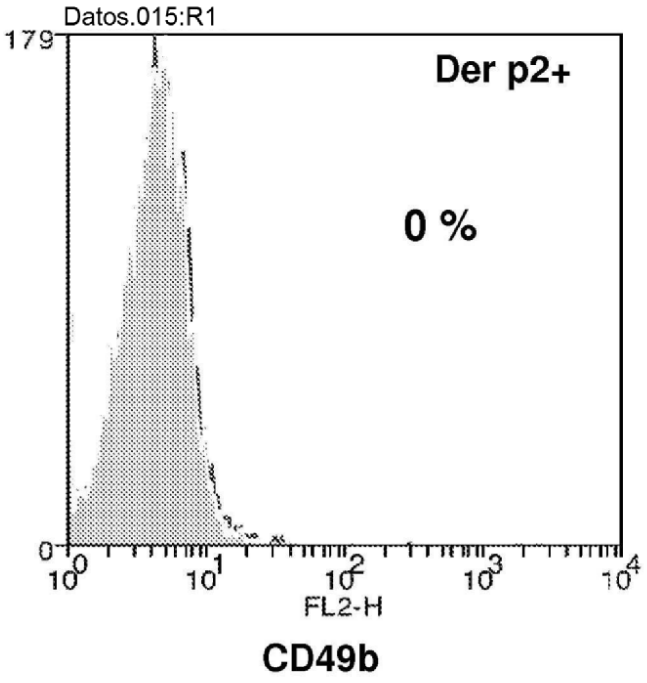


FIGURA 2 (continuación)

A


Datos.015:R1
179
Der p2+
0 %
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
CD49b

B

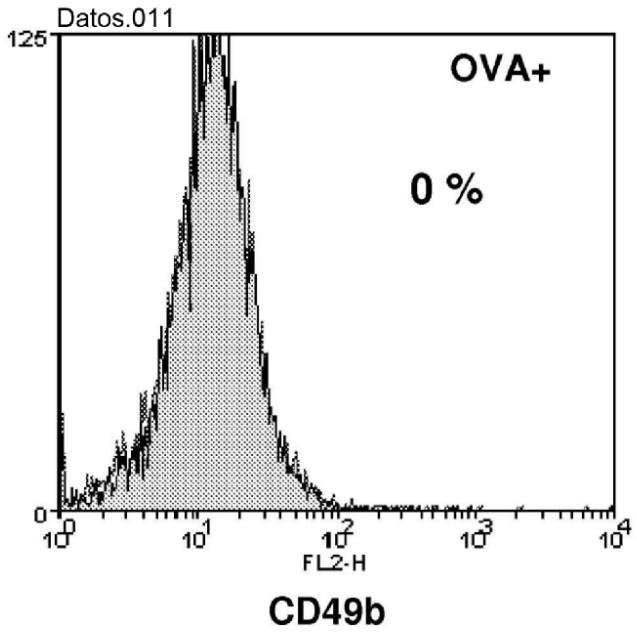
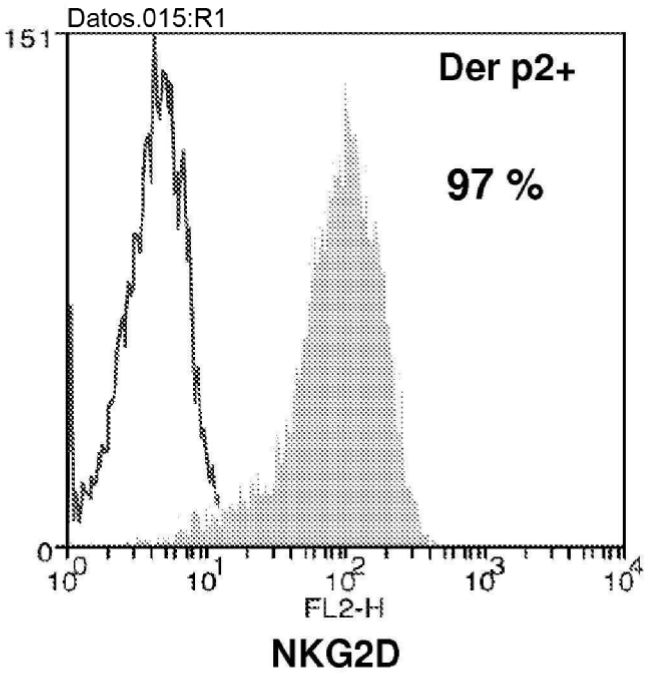

Datos.011
125
OVA+
0 %
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
CD49b

FIGURA 3

C



D

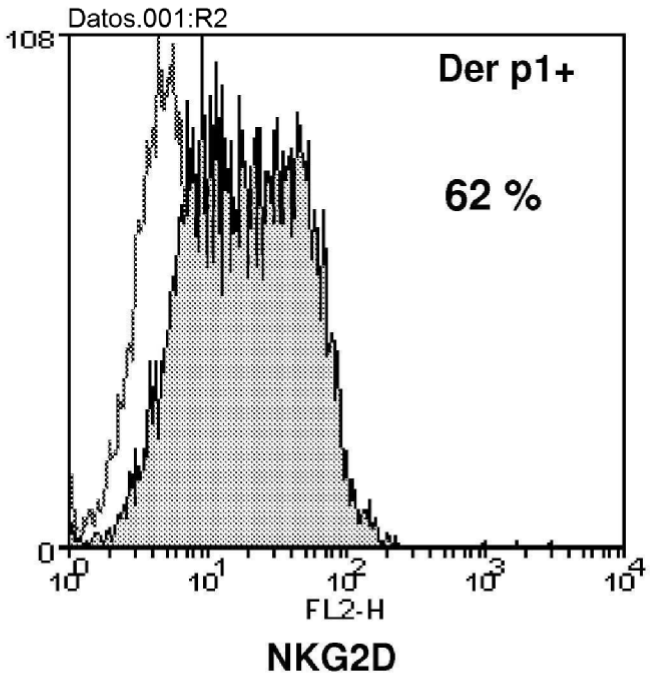
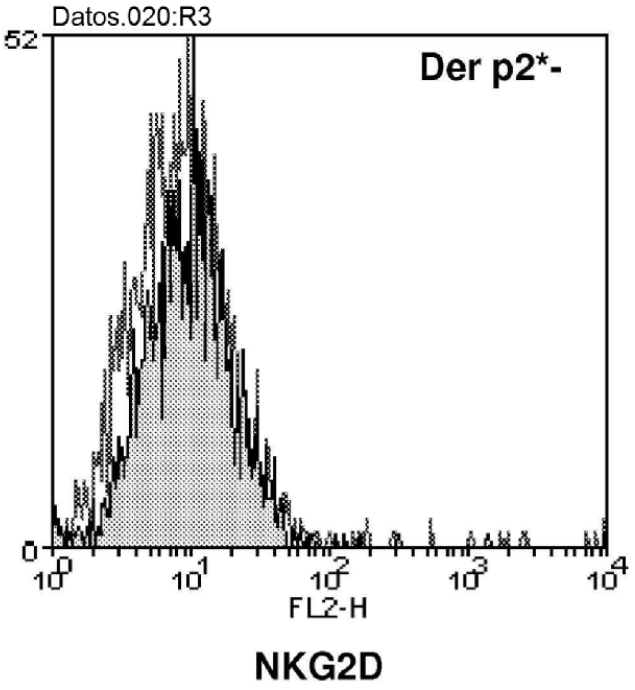


FIGURA 3 (continuación)

E



F

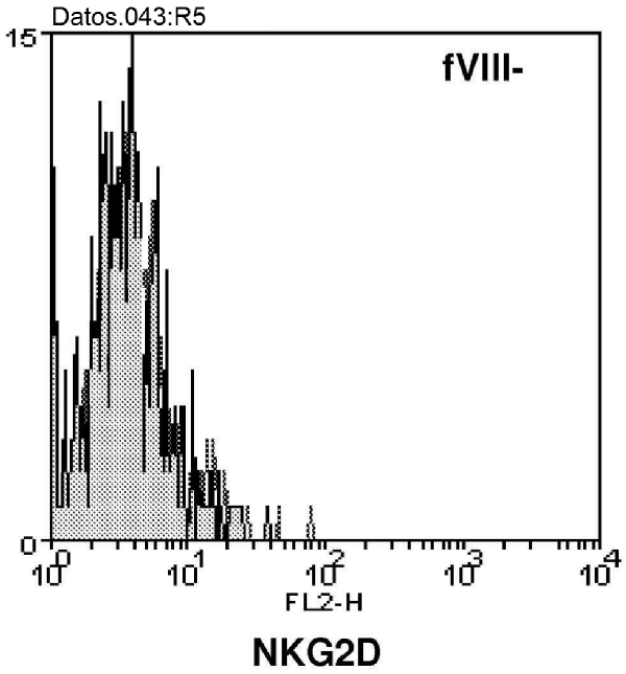
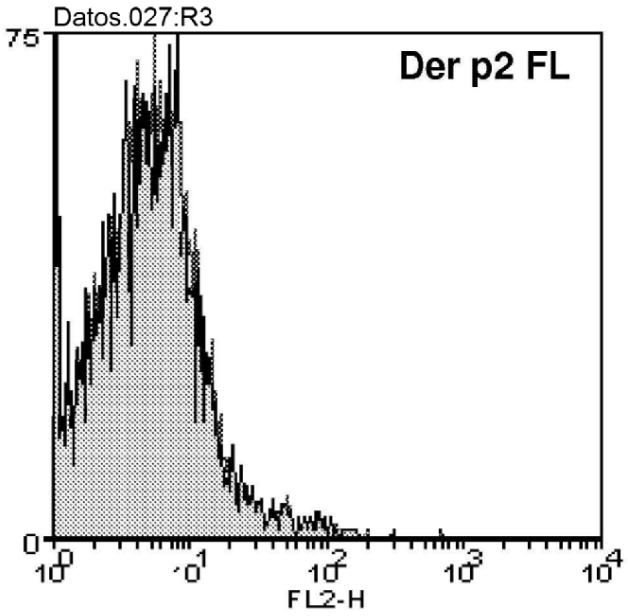


FIGURA 3 (continuación)

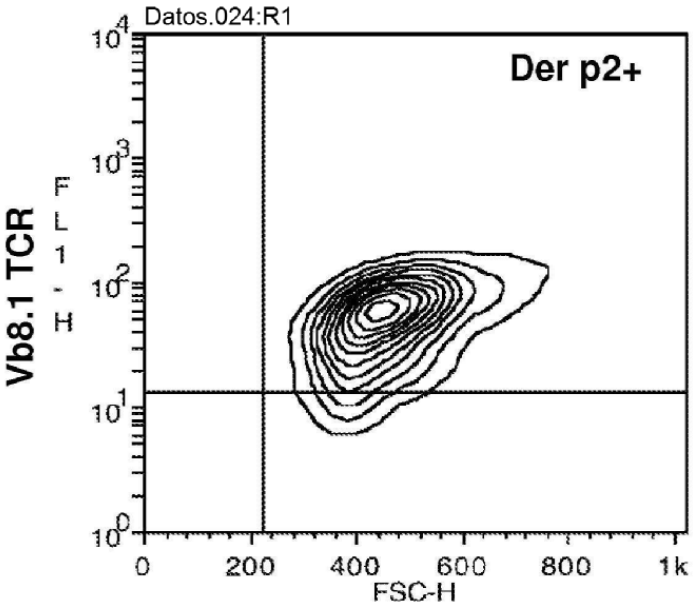
G



NKG2D

FIGURA 3 (continuación)

A



B

	90	CDR3	100
Clon CD4 (Vα5)	CAARSSGSWQLIFGSGTQLTVMPDIQNP (SEQ ID NO:15)		
Vα14-Jα281	CVVGDRGSALGRLHFGAGTQLIVIP (SEQ ID NO:16)		

C

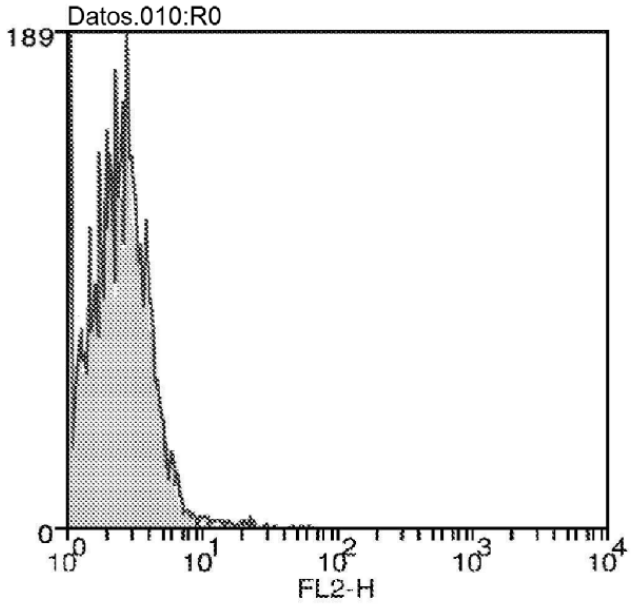


FIGURA 4

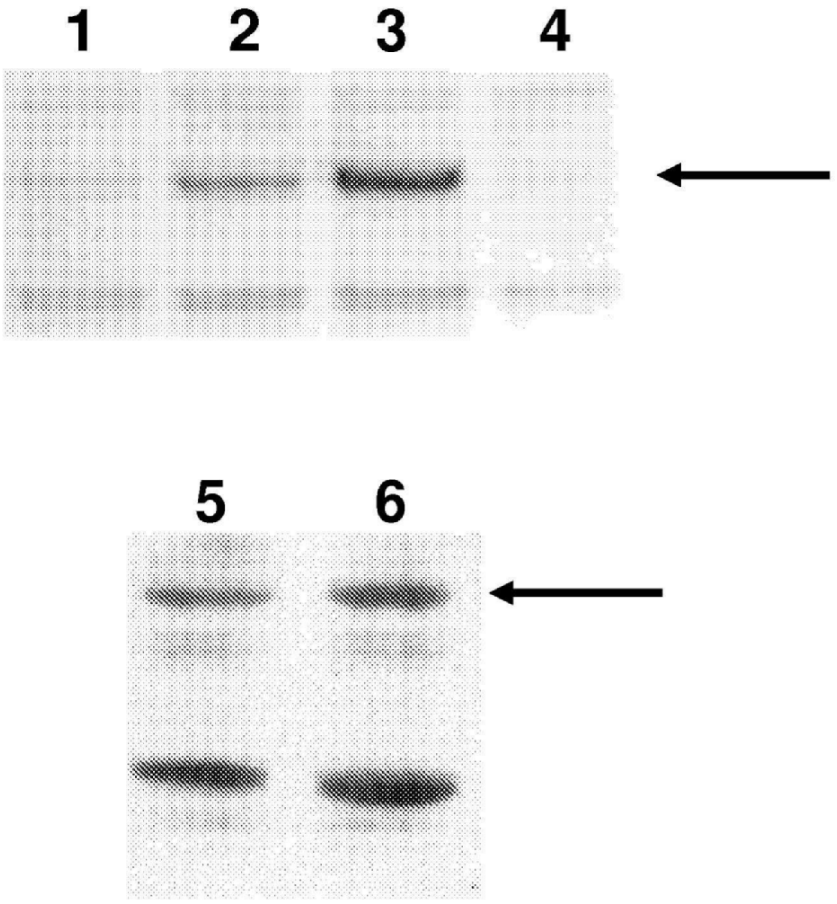


FIGURA 5

A

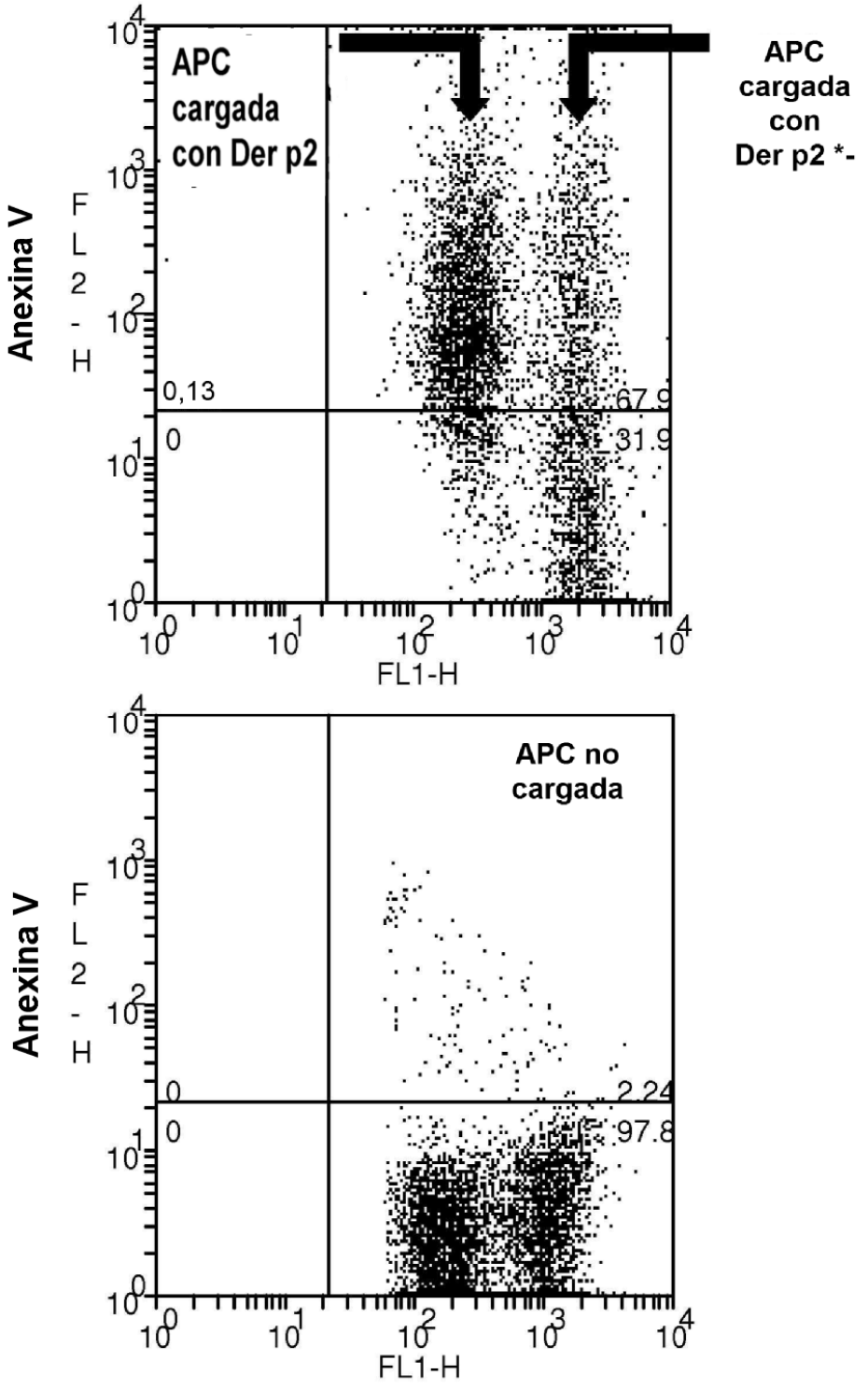
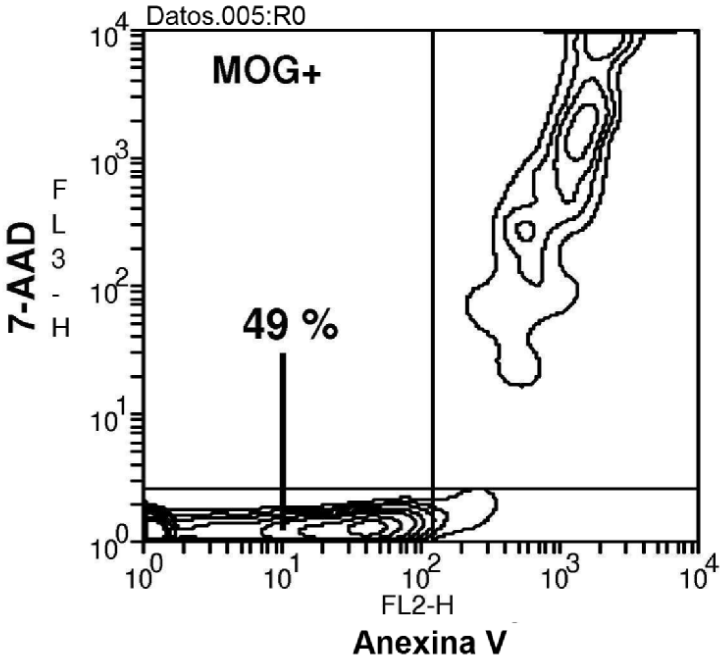

APC cargada con Der p2
APC cargada con Der p2 *-
Anexina V
FL2-H
0,13
67.9
0
31.9
FL1-H
APC no cargada
Anexina V
FL2-H
0
2.24
0
97.8
FL1-H

FIGURA 6

B



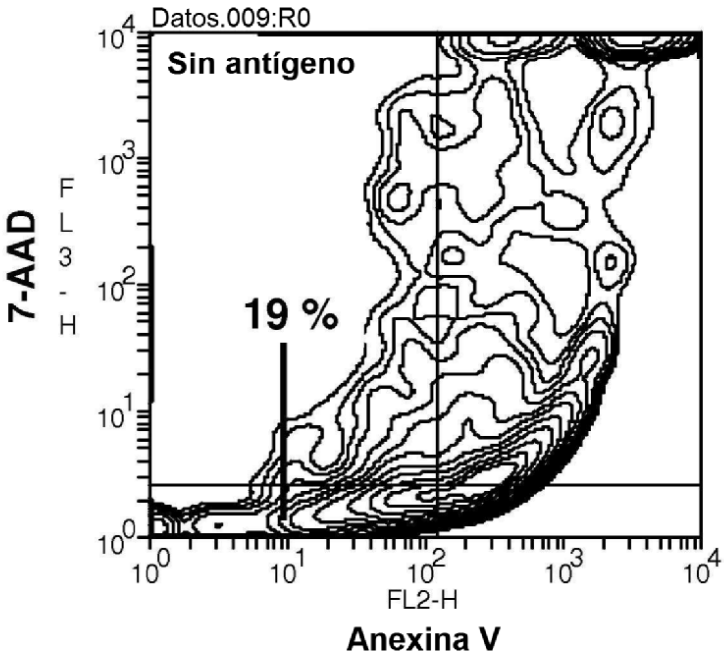


FIGURA 6 (continuación)

C

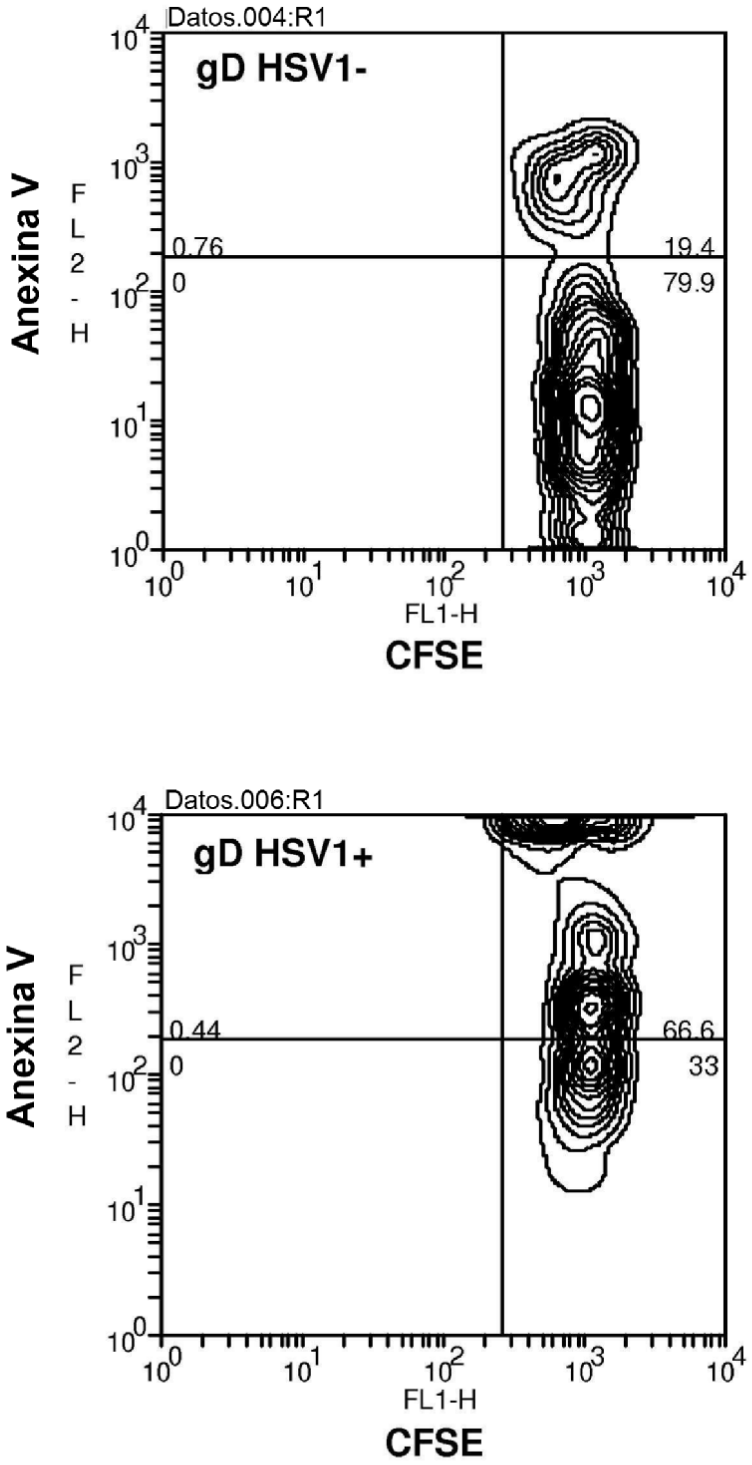


FIGURA 6 (continuación)

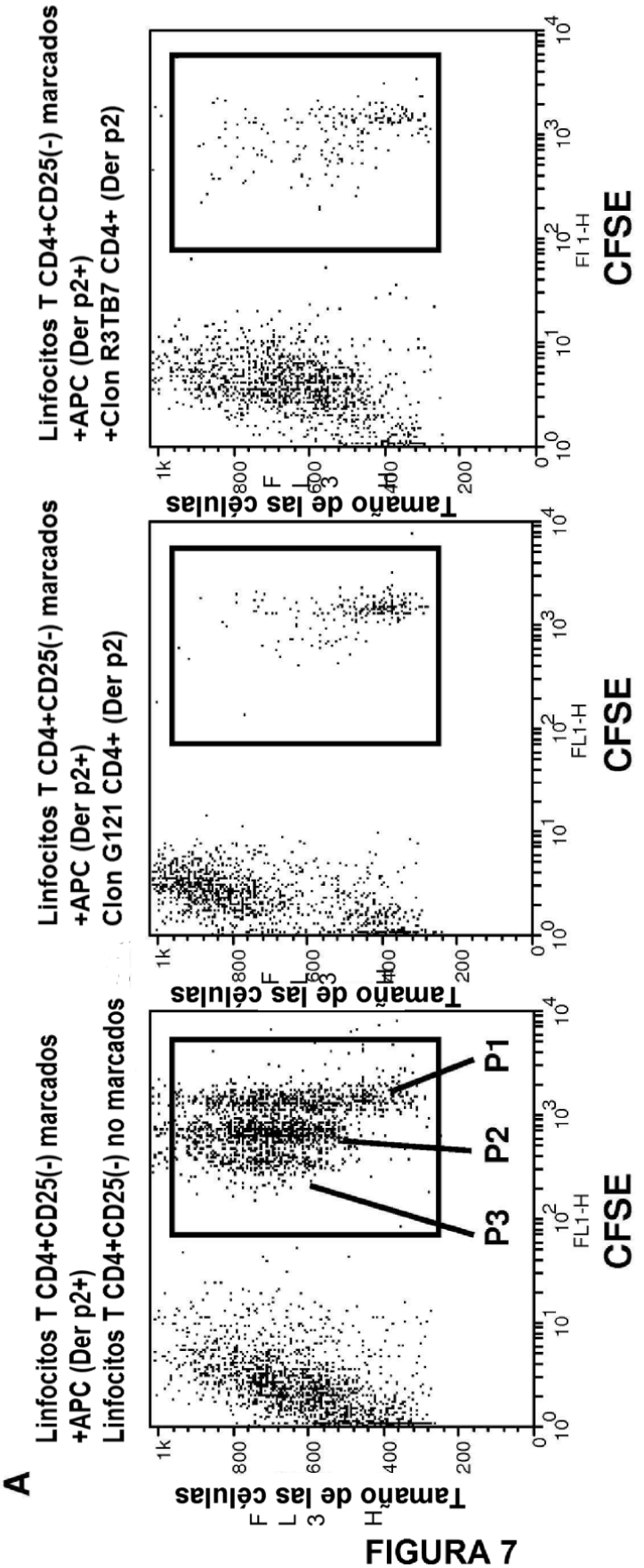

A
Linfocitos T CD4+CD25(-) marcados
+APC (Der p2+)
Linfocitos T CD4+CD25(-) no marcados
Linfocitos T CD4+CD25(-) marcados
+APC (Der p2+)
Clon G121 CD4+ (Der p2)
Linfocitos T CD4+CD25(-) marcados
+APC (Der p2+)
+Clon R3TB7 CD4+ (Der p2)
Tamaño de las células
FL3-H
CFSE
FL1-H
P1
P2
P3

FIGURA 7

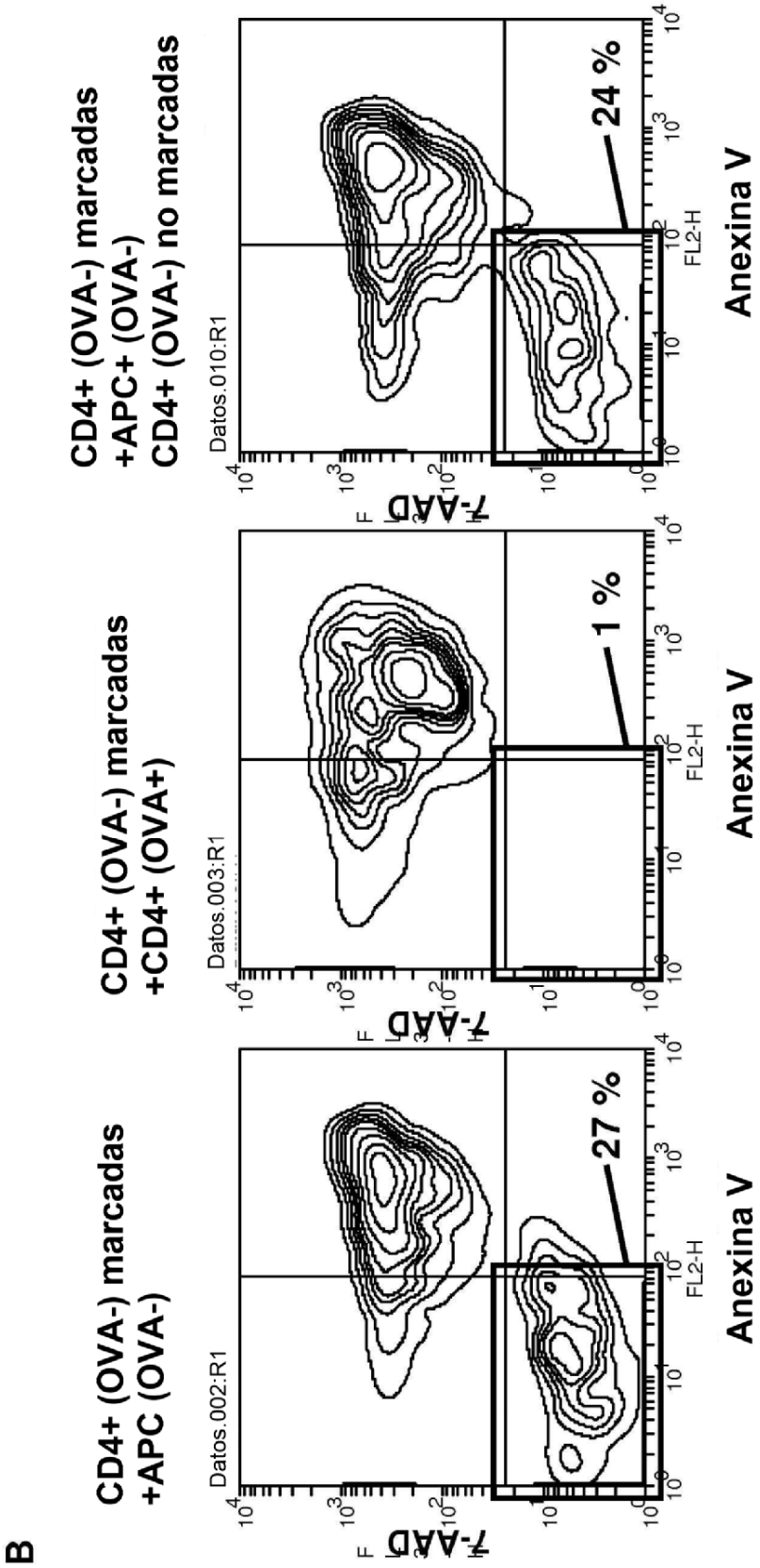


FIGURA 7 (continuación)