

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 593**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783	(2010.01)
G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
A61K 35/12	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2007 PCT/US2007/070143**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2007 WO07140472**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2007 E 07784254 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2032695**

54 Título: **Expresión de CD127 que correlaciona inversamente con FoxP3 y la función supresora de Treg CD4⁺**

30 Prioridad:

31.05.2006 US 803623 P

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

18.10.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**BLUESTONE, JEFFREY, A.;
LIU, WEIHONG y
PUTNAM, AMY**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 686 593 T3

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

DESCRIPCIÓN

Expresión de CD127 que correlaciona inversamente con FoxP3 y la función supresora de Treg CD4⁺

5 Antecedentes de la invención

10 Durante la última década, ha habido avances tremendos en nuestra comprensión del proceso básico que controla la tolerancia inmune. La identificación de células T reguladoras (Treg), particularmente las Treg CD4⁺CD25⁺, como un componente importante de la autotolerancia ha abierto un área importante de investigación en inmunología, y numerosos estudios han demostrado la potente influencia de las Treg en suprimir respuestas inmunes patológicas en enfermedades autoinmunes, trasplantes y enfermedad de injerto contra huésped (revisado en (1-6)). Las Treg tienen un perfil terapéutico único y robusto. Las células requieren activación mediada por el receptor específico de células T (TCR) para desarrollar actividad reguladora, pero su función efectora parece ser inespecífica, regulando las respuestas inflamatorias locales a través de una combinación de contacto célula-célula y producción de citoquinas supresoras (7-9).
15 Además, hay una serie de intervenciones terapéuticas que parecen promover el desarrollo y la función de Treg (10, 11). Esta, llamada población "adaptativa" de células T reguladoras, comparte muchos de los atributos de las Treg naturales dependientes del timo, pero puede diferir en biomarcadores críticos de la superficie celular y atributos funcionales (12). Por ejemplo, se han descrito células Tr1 y Th3 que producen IL-10 y TGFβ, respectivamente (13, 14). Estos resultados han conducido a enfoques novedosos a la inmunoterapia ya que la capacidad de aislar y expandir este subconjunto de células en ratones ha conducido a nuevas intervenciones terapéuticas en enfermedades inmunológicas (6, 15). Sin embargo, un obstáculo importante para el estudio y la aplicación de las Treg en el entorno humano ha sido la falta de biomarcadores específicos de la superficie celular para definir y separar las Treg de otros subconjuntos de células T reguladoras o efectoras.

25 Aunque muchos estudios indican que CD25 es un marcador de superficie celular crucial para el subconjunto regulador (16, 17), a diferencia del ratón, varios estudios han sugerido que solo el subconjunto de células T CD4⁺ que expresa los niveles más altos de CD25 (denominado CD25^{hi}) tiene actividad supresora *in vitro* (16). Además, la adición de otros marcadores tales como HLA-DR sugiere que incluso un porcentaje menor (a menudo menos del 1%) de células T CD4⁺ comprende el subconjunto de células T supresoras. Finalmente, algunos marcadores tales como CTLA-4 y GITR, que se ha informado que se expresan en Treg (18-21), también se expresan en células T efectoras potentes y, como tales, hacen que el inmunofenotipo y la determinación de su papel funcional sean problemáticos (22, 23). Esto ha llevado a una serie de informes dispares de la cuantificación Treg en entornos de enfermedades. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que el número de Treg CD4⁺CD25^{hi} es deficiente en Diabetes Tipo 1 (T1D) (24) mientras que otros sugieren que el número y la función de estas células es normal en T1D (25). Además, la capacidad de aislar solo un número limitado de estas células de la sangre periférica ha hecho que la expansión de esta población de células reguladoras sea problemática.

40 Un avance significativo en el estudio de las Treg de ratón y humano ha sido el descubrimiento del factor de transcripción, FoxP3, como marcador principal y regulador funcional del desarrollo y función de Treg (26-29). En una serie de elegantes estudios genéticos en ratones y humanos, los investigadores demostraron que las mutaciones en el gen FoxP3 estaban relacionadas con las manifestaciones autoinmunes observadas en el ratón Scurfy y en los humanos con disregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, enfermedad del síndrome ligado a X (IPEX) (28). Estudios posteriores en el ratón mostraron que los animales deficientes en FoxP3 carecen de Treg, mientras que la sobreexpresión de la proteína FoxP3 conduce a una supresión inmune profunda (30). Aunque estudios recientes han cuestionado si todas las Treg son FoxP3⁺ o si todas las células T FoxP3⁺ son reguladoras, la proteína FoxP3 sigue siendo el mejor y más específico marcador de Treg hasta la fecha (30).

50 A este respecto, los análisis citométricos de flujo e inmunohistoquímicos de FoxP3 se expresan en significativamente más células T que las previamente identificadas usando los otros marcadores de superficie celular disponibles, incluido el CD25. La proteína FoxP3 se encuentra en las células T CD4⁺ bajas y negativas de CD25 y, en ciertas condiciones, en algunas células T CD8⁺ (30, 31). Por lo tanto, es probable que muchas de las células T reguladoras naturales y adaptativas se pasen por alto en los estudios de biomarcadores actuales, cuestionando las conclusiones relacionadas con deficiencias o defectos en ciertos entornos autoinmunes. Es importante destacar que, como FoxP3 es una proteína intracelular, no se puede utilizar para separar Treg humanas para estudios funcionales o expansión *in vivo* para la terapia celular, lo que limita su uso en el entorno humano.

60 Como se indicó anteriormente, el surgimiento de Treg como una vía esencial para mantener la tolerancia inmune ha abierto la oportunidad para una mejor comprensión de la homeostasis inmune y el potencial para intervención terapéutica. Sin embargo, el fenotipado humano de las Treg ha sido complejo. Típicamente, los investigadores han observado que las Treg más supresoras coinciden con las células T CD4⁺ con la tinción más alta con CD25. Recientemente, Cozzo et al. (véase, J Immunol., 1 de diciembre de 2003; 171 (11): 5678-82) han informado que las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ expresan bajos niveles de CD 127 en un ratón transgénico. Harnaha et al. han informado en el contexto de los datos de diabetes de tipo 1 que indican que las células T CD4⁺CD25⁺ expresan niveles más altos de CD127 (IL-7R alfa) que las células CD4⁺CD25⁻. Sin embargo, estos resultados se derivaron nuevamente de ratones, específicamente ratones NOD-SCID reconstituidos con células dendríticas modificadas *ex vivo* y esplenocitos NOD (véase, Harnaha, J et al., Diabetes, enero de 2006; 55 (1): 158-70). Desafortunadamente, la

capacidad de permitir la entrada precisa a CD25 es bastante arbitraria ya que no se puede usar ningún otro marcador de superficie celular para identificar definitivamente el subconjunto. Recientemente, Baecher-Allen ha sugerido que otros marcadores como HLA-DR permiten subdividir el subconjunto CD4⁺CD25^{hi} para enriquecer aún más la actividad de Treg. Sin embargo, este marcador adicional sugiere que la cantidad de Treg es incluso menor que la sugerida anteriormente (41).

La identificación de FoxP3 como un factor de transcripción específico que marca estas células T supresoras sugiere que puede haber una población mayor de Treg en sangre periférica humana que la apreciada previamente, aunque esto ha sido controvertido debido a la expresión imprevista de FoxP3 en un número de poblaciones de células T activadas negativas para CD25 (30, 38). De hecho, puede haber células reguladoras que también sean negativas para Foxp3. Sin embargo, estos estudios se han visto comprometidos por la ausencia de marcadores de superficie celular que puedan usarse para aislar estos y otros subconjuntos de células T para examinar la actividad de las células T reguladoras ya que FoxP3 no puede usarse como un medio para purificar las células para la función.

Esta invención resuelve estas y otras necesidades usando la expresión reducida del marcador de superficie de células T CD127 como un sustituto útil para identificar células T reguladoras que son muy probablemente células T reguladoras FoxP3⁺ inmunosupresoras. El uso del biomarcador CD127 solo o junto con otros biomarcadores puede representar hasta el 7-8% de las células T CD4⁺, proporcionando rendimientos significativamente mayores que los identificados por los enfoques anteriores. Además, las células CD127^{lo/-} suprimen la respuesta proliferativa de las células T alorreactivas en una MLR y son ellas mismas anérgicas a los mismos estímulos. Esto es cierto a pesar del hecho de que en la mayoría de los individuos, solo el 20-40% de las células CD4⁺CD127^{lo/-} son Foxp3⁺.

Breve resumen de la invención

La invención se refiere al descubrimiento de que CD127 es un biomarcador particularmente útil en la identificación de células T reguladoras inmunosupresoras que incluyen particularmente, células T reguladoras FoxP3⁺, en muestras biológicas. Se divulgan métodos para identificar si una célula T reguladora es una célula T reguladora inmunosupresora determinando el nivel de expresión de CD 127 por la célula. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para determinar si una célula T reguladora en una muestra de células T enriquecida es altamente probable que sea una célula reguladora T inmunosupresora FoxP3⁺ al detectar solo un determinante común o antígeno de superficie celular de la célula T, CD127. También se divulgan métodos para identificar células T reguladoras inmunosupresoras en una muestra mediante la identificación de células T CD8⁺CD127^{lo/-} de acuerdo con su nivel de expresión de los biomarcadores CD8 y CD127. Las muestras pueden comprender células T y se obtienen a partir de sangre (por ejemplo, aislada de PBMC), linfóide, timo o cualquier muestra específica de tejidos/órganos de interés. Estos tejidos u órganos incluirían el páncreas, el ojo, el corazón, el hígado, los nervios, el intestino, la piel, los músculos y las articulaciones.

En un primer aspecto, la invención proporciona métodos para preparar una población de células T aisladas reguladoras inmunosupresoras, comprendiendo dicho método: seleccionar una muestra que comprende células T para los niveles de expresión de un conjunto de marcadores que consiste en CD4, CD127 y CD25 para detectar las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ y aislar las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ detectadas para proporcionar la población de células T aisladas reguladoras inmunosupresoras, en las que la población comprende al menos 10³ células T reguladoras inmunosupresoras. Las células que portan los marcadores se pueden aislar, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos marcados o ligados con FACS o tecnologías de partículas/perlas magnéticas como conocen los expertos en la técnica. En algunas realizaciones adicionales, las células T reguladoras inmunosupresoras identificadas se aíslan de las células CD127⁺. En algunas realizaciones, las células identificadas aisladas tomadas juntas proporcionan una población de células T reguladoras inmunosupresoras para uso de acuerdo con la invención.

En un segundo aspecto, la invención proporciona métodos para preparar poblaciones expandidas de poblaciones de células T reguladoras inmunosupresoras aisladas que son sustancialmente FoxP3⁺ expandiendo una población de células T aisladas obtenida mediante los métodos anteriores. En algunas realizaciones, la población de células T aisladas FoxP3⁺ se expande poniendo en contacto las células T aisladas de la población con antígeno, aloantígeno o anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2 más TGFβ o rapamicina. Alternativamente, en este aspecto, las células T en la muestra biológica pueden primero expandirse y luego aislarse mediante los métodos anteriores. La población expandida aislada es sustancialmente de células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ que son células FoxP3⁺.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una población expandida de células T reguladoras inmunosupresoras CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ aisladas en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno o enfermedad inmunitaria, siendo dicha población obtenible mediante el método de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden poblaciones de células T FoxP3⁺ inmunosupresoras aisladas o expandidas obtenidas de acuerdo con los métodos anteriores.

Se divulgan también métodos para producir una composición enriquecida de células T reguladoras específicas o no específica de antígeno, y las composiciones y métodos de uso resultantes. Por ejemplo, un método para modular una reacción inmune en un sujeto, comprendiendo dicho método (a) obtener una población de células compatibles con el

5 sujeto específicas o no específicas del antígeno que incluyen células CD4⁺ y CD4⁻ y células CD127⁺ y CD127⁻ y células CD25⁺ y CD25⁻; (b) producir una composición enriquecida de células T CD127^{lo/-} o células FoxP3⁺ reguladoras específicas o no específicas de antígeno de dicha población de células clasificando las células en función de sus niveles de expresión del antígeno CD 127 y el antígeno CD4 o el antígeno CD127 y el antígeno CD8, o los antígenos CD4, CD8 y CD127 y (c) introducir dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción inmune en dicho sujeto. Preferiblemente, la respuesta inmune es una respuesta autoinmune y el antígeno es un autoantígeno. Preferiblemente, las células no están clasificadas por sus niveles de expresión del determinante común CD25.

10 En otros aspectos, la selección de la célula T reguladora de acuerdo con el nivel de expresión del determinante común 127 comprende selecciones basadas en uno o más determinantes comunes adicionales (por ejemplo, CD8) en el sistema de CD (CD significa agrupación de designación) para clasificar anticuerpos monoclonales y sus antígenos específicos se estableció en el primer taller sobre antígenos de diferenciación de leucocitos (París: 1982), donde también se introdujo la norma de que se requieren al menos dos mAb que reconocen la misma molécula para asignar una nueva CD. Se recomendó además que el término CD se usara para los anticuerpos agrupados y que el término molécula CD o antígeno CD se usara para antígenos. Por consiguiente, se divulgan métodos para producir una composición enriquecida de células T reguladoras específicas de antígeno, y composiciones y métodos de uso resultantes. Por ejemplo, un método para modular una reacción inmune en un sujeto, comprendiendo dicho método (a) obtener una población de células compatibles con el sujeto que contiene células CD4⁺ y CD4⁻ y células CD127⁺ y CD127⁻ y células CD25⁺ y CD25⁻; (b) producir una composición enriquecida de células T CD4⁺CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno a partir de dicha población de células identificando y aislando las células de acuerdo con su expresión tanto de CD4, CD25 y CD127 y (c) introducir dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción inmune en dicho sujeto. La identificación y el aislamiento pueden proceder en cualquier orden o simultáneamente mediante el uso, por ejemplo, de fluoróforos múltiples y distinguibles como marcadores en los anticuerpos usados para detectar los determinantes comunes.

25 Se divulga también un método para modular una reacción inmune en un sujeto, comprendiendo dicho método (a) obtener una población de células compatibles con el sujeto que contienen células CD127⁺ y CD127⁻ y células CD25^{hi/+} y CD25⁻; (b) producir una composición enriquecida de células T CD25^{hi/+}CD127^{lo/-} o CD25^{hi/+}CD127^{lo/-} o CD25^{hi}CD127^{lo/-} a partir de dicha población de células identificando y aislando las células de acuerdo con su expresión tanto de CD25 como de CD127 y (c) introducir dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción inmune en dicho sujeto.

30 Se divulgan también kits que comprenden materiales útiles en la realización de los métodos anteriores. Un kit para aislar una población de células T inmunosupresoras, por ejemplo, puede comprender un ligando o anticuerpo que se une a CD127. El ligando o anticuerpo se marca preferentemente (por ejemplo, con un marcador fluorescente o coloreado o marcador de cuentas magnéticas) o se proporciona con el kit un marcador para detectar una célula unida por el ligando o anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescentemente o marcado magnéticamente que se une al anticuerpo CD127). El kit puede proporcionar además instrucciones para obtener una población de células T inmunosupresoras mediante el uso de los contenidos de los kits y la selección positiva de células T-reg que son expresadoras bajas y/o negativas de CD127. Las instrucciones del kit pueden presentar CD127 como un marcador de selección junto con CD4 y/o CD25 como marcadores de selección positivos. El kit puede proporcionar un único anticuerpo CD127 para usar en la selección de células T-reg que son expresadoras de CD127 bajas y/o negativas. Los anticuerpos monoclonales para cada uno de CD 127 y CD4 y también opcionalmente CD25 pueden proporcionarse en el kit. Estos anticuerpos pueden estar marcados (por ejemplo, unidos a un marcador fluorescente o marcador magnética). Además, el kit podría proporcionar además instrucciones para obtener una población de células T para su uso en la supresión de una respuesta inmune y, opcionalmente, además, instrucciones para formular la población obtenida en un medio adecuado para el contacto con células *in vivo* o *in vitro*. Si los anticuerpos en el kit no están marcados, el kit proporciona adicionalmente medios para marcar los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos marcados que se unen a un anticuerpo usado para unir CD127). Opcionalmente, existe la condición de que el kit no contiene un medio o anticuerpo para detectar CD25. Opcionalmente, la población aislada de células no se ha seleccionado directamente contra células que tienen CD25⁻ y/o CD25^{lo}. Opcionalmente, el kit proporciona instrucciones adicionales para separar las células usando un FACS (clasificador de células activado por fluorescencia) en el caso en que se use un marcador fluorescente o magnetismo en el caso en que se usen partículas magnéticas o perlas como marcador.

55 Se divulgan también métodos para identificar fármacos inmunosupresores determinando su efecto en solo un marcador de superficie de célula T, CD 127, o en una pluralidad de marcadores que incluyen CD127 y opcionalmente uno o el otro o ambos de CD4 y CD25. Preferiblemente, el ensayo se realiza usando Treg a partir de una muestra de células T enriquecida.

60 Con respecto a cualquiera de los aspectos anteriores en los que la selección basada en el nivel de expresión de CD25 no está excluida del asunto, en realizaciones preferidas de tales, la selección de la célula T reguladora selecciona positivamente células que son CD25⁺ o CD25^{lo} además de las células que son CD25^{hi}. Con respecto a cualquiera de los aspectos anteriores que tienen realizaciones en las que la selección con base en el nivel de expresión de CD25 no es un objetivo excluido, en otras realizaciones de dicha selección se excluye con base en los niveles de expresión de CD25.

65 Con respecto a cualquiera de los aspectos anteriores que tienen realizaciones en las que se proporcionan etapas, las

etapas se pueden realizar en cualquier orden, secuencial o simultaneo.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1. FoxP3 se expresa en un porcentaje significativo de células T CD4⁺ independientes de la expresión de CD25. Las PBMC humanas se tiñeron en la superficie celular usando una combinación de mAb anti-CD4 y anti-CD25. Una vez fijadas, las células se tiñeron adicionalmente con mAb anti-FoxP3. Los datos son representativos de más de 20 individuos independientes y más de 10 experimentos. Los números en el gráfico de puntos indican el porcentaje de células FoxP3⁺.
- 10 Figura 2. Expresión de FoxP3 en diferentes subconjuntos de células T humanas CD4⁺CD127^{hi/lo}. (a) Se recogieron PBMC de sangre periférica humana y se tiñeron con CD4, CD25 y CD127 y se analizaron en un Becton-Dickinson LSR II e intracelularmente con mAb específicos de FoxP3. Los datos son representativos de más de 20 individuos independientes y más de 10 experimentos. (b) Las PBMC humanas se tiñeron para la expresión en la superficie celular de CD4 y CD127. Las células teñidas se fijaron y se tiñeron intracelularmente para FoxP3. Para el análisis, las PBMC se bloquearon en linfocitos (con base en la dispersión de luz directa y lateral) y se analizaron para la expresión de CD127 y FoxP3. Los números en el gráfico de puntos indican el porcentaje de células en el cuadrante que expresan el marcador relevante. Los datos son representativos de más de 20 individuos independientes y más de 10 experimentos.
- 15 Figura 3. Expresión de FoxP3 en diferentes subconjuntos de células T de ratón CD4⁺CD127^{hi/lo}. (a) Las células del ganglio linfático y del bazo de ratón se tiñeron para la expresión en la superficie celular de CD4 y CD127. Para el análisis, las células del bazo de ratones FoxP3-GFP se bloquearon en linfocitos (con base en la dispersión de luz directa y lateral) y se analizaron para expresión de CD127 y FoxP3 (GFP). Los números en el gráfico de puntos indican el porcentaje de células en el cuadrante que expresan el marcador relevante. (b) Las células del ganglio linfático y bazo aisladas de ratones transgénicos FoxP3 se tiñeron para la expresión en la superficie celular de CD4, CD25 y CD127. Para el análisis, las células del bazo se bloquearon en linfocitos CD4⁺ (con base en la dispersión de luz directa y lateral) y se analizaron para la expresión de CD127 y FoxP3. Los números en el gráfico de puntos indican el porcentaje de células en el cuadrante que expresan el marcador relevante.
- 20 Figura 4. Expresión de FoxP3 en diferentes subconjuntos de células T CD4⁺. (a) Las PBMC humanas se tiñeron para la expresión en la superficie celular de CD4 y CD127. Las células teñidas se fijaron y se tiñeron intracelularmente para FoxP3. Para el análisis, las PBMC se bloquearon en linfocitos CD4⁺ (con base en la dispersión de luz directa y lateral y la tinción de CD4) y se analizaron para la expresión de CD127 y FoxP3. Los cuadros representan designaciones arbitrarias de células CD25⁺ frente a CD25⁻. Los números en el gráfico de puntos indican el porcentaje de células en el cuadrante que expresan el marcador relevante. (b) Las PBMC humanas se tiñeron para la expresión en la superficie celular de CD4 y CD127. Las células teñidas se fijaron y se tiñeron intracelularmente para FoxP3. Para el análisis, las PBMC se bloquearon en linfocitos (con base en la dispersión de luz directa y lateral) y se analizaron para la expresión de CD4, CD127 y FoxP3. Los cuadros representan designaciones arbitrarias de células CD127⁺ frente a CD127^{lo/-}. Los números en el gráfico de puntos indican el porcentaje de células en el cuadrante que expresan el marcador relevante. (c) Se realizaron tinciones y análisis similares en sangre completa obtenida de 10 individuos sanos. Cada símbolo representa una persona individual, la barra estrecha representa el porcentaje medio de células T FoxP3⁺ en células T CD4⁺ bloqueadas con base en la expresión de CD25 y/o CD127.
- 25 Figura 5. Análisis por ChIP-CHIP y ChIP-qPCR de ADN unido a FoxP3 de Treg humanas CD4⁺CD25^{hi}. Se utilizó Ig de conejo anti-FoxP3 o de control para precipitar complejos de proteína-ADN entrecruzados a partir de lisado de Treg humanas CD4⁺CD25^{hi} expandidas. El entrecruzamiento del material inmunoprecipitado se eliminó, se lo trató con proteasa, y el ADN se purificó y se amplificó. El material resultante se hibridó con el genoma completo usando el conjunto de matriz GeneChip® Human Tiling 1.0R para identificar las ubicaciones de los sitios de unión para FoxP3. Se generaron dos conjuntos de gráficos: IP de FoxP3 frente al control de Ig e IP de FoxP3 frente a ADN de entrada en la versión hs.NCBIv35 del genoma siguiendo esencialmente el método descrito en Cawley et al. (50). (a) Gráficos de enriquecimiento de señal del locus IL-7R (chr5: 35863179-35918811). Se predice que varias regiones en el locus IL-7R son positivas (chr5:35892564-35892809 promotor) y negativas (chr5:35890618-35890846 2K secuencia arriba; chr5: 35907667-35907852 Intrón 4; chr5:35911721-35911888 intrón 7 y exón 8). (b) qPCR de SYBR Green de las regiones cromosómicas de IL-7R. IP de FoxP3 frente a la relación de veces que se enriquece IgG se determinó a partir del ensayo ChIP duplicado evaluado por duplicado mediante PCR en tiempo real.
- 30 Figura 6. Respuesta proliferativa de subconjuntos aislados de células T. Las muestras de la capa leucocitaria se clasificaron con base en la expresión de CD4, CD127 y CD25. Se colocaron 30.000 células clasificadas en cultivo con PBMC de terceros irradiadas y libres de anti-CD3 alogénicas como estimuladores. Las células T se incubaron durante 7 días a 37°C en 5% de CO₂. Dieciséis horas antes del final de la incubación, se añadió 1 µCi de ³H-timidina a cada pozo. Las placas se recogieron y se analizaron los datos. Los datos son representativos de 9 experimentos separados.
- 35 Figura 7. Supresión de MLR alogénico por subconjuntos de células T individuales. Las muestras de la capa leucocitaria se clasificaron con base en la expresión de CD127 y CD25. Se combinaron 30.000 células clasificadas con 100.000 PBMC autólogas como respondedores, y 100.000 PBMC de terceros irradiadas y libres de anti-CD3 alogénicas como estimuladores. Las células T se incubaron durante 7 días a 37°C en 5% de CO₂. Dieciséis horas antes del final de la

5 incubación, se añadió 1 μCi de ^3H -timidina a cada pozo. Las placas se recogieron y se analizaron los datos. Los datos son representativos de 9 experimentos separados que clasifican 7 subpoblaciones diferentes de células CD4^+ indicadas (a) $\text{CD127}^+\text{CD25}^+$, $\text{CD127}^+\text{CD25}^-$, $\text{CD127}^{\text{lo}/-}\text{CD25}^+$, $\text{CD127}^{\text{lo}/-}\text{CD25}^-$ y (b) $\text{CD127}^{\text{lo}/-}$, CD25^{hi} , CD127^+ . 100.000 respondedores están presentes en cada pozo con un número decreciente de células clasificadas agregadas en una proporción de 1:1 (30.000:100.000), 1:1/2 (15.000 células clasificadas), 1:1/4 (7.500 células clasificadas), 1:1/16 (1.875 células clasificadas) en comparación con las células clasificadas solas. Los resultados se representan como recuentos por minuto (CPM).

10 Figura 8. Frecuencia de varios subconjuntos de células T en pacientes con diabetes tipo 1 versus sujetos de control sanos. Los datos se obtuvieron del total de 10 individuos de control sanos y 16 pacientes con diabetes tipo 1. El porcentaje medio de varios subconjuntos de células T y desviación estándar.

Figura 9. Una secuencia de aminoácidos de una proteína CD127 humana.

15 Figura 10. Una secuencia de aminoácidos de una proteína CD4 humana.

Figura 11. Expresión de FoxP3 el día 14 de células T $\text{CD4}^+\text{CD127}^-$ expandidas. Se cultivaron células $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}}$ separadas durante 14 días con anti-CD3/anti-CD28 más IL-2 y más o menos rapamicina (RAPA). Como puede verse, las células se expandieron mejor en ausencia de rapamicina y cuando se estimularon nuevamente con el mAb y el cóctel de IL-2 en el día 9. El grado de expansión se muestra en los recuadros de la derecha. La célula expandida con RAPA tenía los niveles más altos de FoxP3 y el porcentaje de células FoxP3 $^+$. La mayoría de las células negativas para FoxP3 eran células CD25^{lo} frente a FoxP3 $^+$ en el mismo cultivo.

20

Figura 12. Treg $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}/-}$ expandidas suprimen y mantienen FoxP3, especialmente cuando se tratan con rapamicina. A los 14 días, las células expandidas se separaron y se añadieron a un ensayo de supresión de CFSE.

25

Figura 13. Treg $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}/-}$ expandidas suprimen y mantienen FoxP3, especialmente cuando se tratan con rapamicina - Comparación de la supresión de $\text{CD4}^+\text{CD27}^{\text{lo}}$ con base en la separación de CD25^+ después de la expansión. A los 14 días, las células expandidas se separaron en los subconjuntos CD25^+ (columna central) y CD25^- (columna derecha) y se añadieron a un ensayo de supresión de CFSE. Curiosamente, después del cultivo, ambas poblaciones se suprimieron de forma equivalente, lo que sugiere que la expresión de CD25 no era esencial para conferir actividad supresora sobre las células expandidas. Sin embargo, no pudimos descartar si las células que se suprimían en estos cultivos se derivaban de células CD25^+ o tenían CD25 subregulada durante el cultivo.

30

Figura 14. La expresión de FoxP3 y CD127 y la función de Treg de las nuevas células T de ratón $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}}$ FoxP3 $^+$ y FoxP3 $^-$.

35

Descripción detallada de la invención

40 Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los significados que se dan a continuación.

45 Se observa aquí que tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

50 Por una "población de células" se entiende una pluralidad de células, preferiblemente al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} células. La población en algunas realizaciones tiene de 10^5 a 10^7 células, de 10^6 a 10^8 células, o de 10^8 a 10^{11} células, o de 10^{10} a 10^{12} células.

55 Una cantidad terapéuticamente eficaz de células T reguladoras $\text{CD127}^{\text{Lo}/-}$ aisladas o aisladas expandidas proporcionadas por la invención está generalmente entre 10^7 a 10^{11} células, y más preferiblemente 10^7 a 10^9 células.

60 Las afecciones, enfermedades, trastornos y reacciones o respuestas inmunes a tratar según los métodos y composiciones de la invención significan una enfermedad en la que el sistema inmune contribuye a la patogénesis. Estas reacciones incluyen, pero no se limitan a, condiciones autoinmunes, trastornos o enfermedades y reacciones inmunológicas persistentes y progresivas a antígenos no autoinmunes infecciosos de organismos bacterianos, virales (por ejemplo, VHC), fúngicos o parasitarios que invaden y persisten en mamíferos y humanos. Tales condiciones y trastornos incluyen alergias y/o asma. Las alergias y el asma pueden deberse a la sensibilización con antígenos extraños o no propios como polen, caspa animal y proteínas alimentarias. La fuente del antígeno extraño causante puede ser una planta, hongo, moho u otro contaminante ambiental.

65 Autoinmunidad y trastornos y enfermedades autoinmunes. La autoinmunidad se define como las reacciones inmunes persistentes y progresivas a antígenos propios no infecciosos, a diferencia de los antígenos no propios infecciosos de

organismos bacterianos, virales, fúngicos o parasitarios que invaden y persisten en mamíferos y humanos. Las condiciones autoinmunes incluyen esclerodermia, enfermedad de Graves, enfermedad de Crohn, enfermedad de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad de Hashimoto, psoriasis, miastenia grave, síndromes de poliendocrinopatía autoinmune, diabetes mellitus tipo I (T1DM), gastritis autoinmune, uveorretinitis autoinmune, polimiositis, colitis y tiroiditis, así como en las enfermedades autoinmunes generalizadas tipificadas por el lupus humano. "Autoantígeno" o "antígeno propio" como se usa en el presente documento se refiere a un antígeno o epítipo que es nativo del mamífero y que es inmunogénico en dicha enfermedad de mamífero.

Un paciente con una enfermedad autoinmune puede ser diagnosticado como conocida por los expertos en la técnica. Dichos pacientes se pueden identificar sintomáticamente y/o obteniendo una muestra de un paciente y aislando células T autorreactivas y comparando el nivel de células T autorreactivas en un paciente con un control (véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20060105336). Por ejemplo, la diabetes tipo 1 puede identificarse por la edad de inicio y la dependencia de las inyecciones de insulina para mantener la homeostasis de la glucosa.

La respuesta de un paciente con una enfermedad autoinmune al tratamiento se puede controlar determinando la gravedad de sus síntomas o determinando la frecuencia de células T autorreactivas en una muestra de un paciente con una enfermedad autoinmune. La gravedad de los síntomas de la enfermedad autoinmune puede correlacionarse con el número de células T autorreactivas (véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 20060105336). Además, un aumento en el número de células T autorreactivas en la muestra se puede utilizar como una indicación para aplicar tratamientos destinados a minimizar la gravedad de los síntomas y/o tratar la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas.

"CD", "agrupamiento de diferenciación" o "determinante común" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de la superficie celular reconocidas por anticuerpos. La expresión de algunos CD (por ejemplo, CD4, CD8, CD25, CD127) es específica para células de un linaje o vía de maduración particular, y la expresión de otros varía según el estado de activación, posición o diferenciación de las mismas células. Preferiblemente, en algunas realizaciones, los determinantes de CD son humanos cuando las células aisladas se van a administrar a una respuesta humana o inmune humana que se está estudiando.

Como se usa en el presente documento, el término "CD127" se refiere al "receptor de interleuquina 7" presente en la superficie de una célula Treg. La cadena alfa del receptor de IL-7 se divulga en la literatura. Ver, por ejemplo, Goodwin et al. (1990) Cell 60: 941 - 951; números de acceso del GenBank NP_032398 y NP_002176. IL-7R también se menciona en la literatura como CD127 (véase la Figura 9). El término ligando CD127 se refiere a un compuesto que se une al receptor de IL-7 (véase, las patentes de Estados Unidos No. 5.194.375 y 5.264.416). CD127⁺ se refiere a células que se tiñen de forma intensa o alta cuando se tratan con un anticuerpo marcado dirigido contra CD127. CD127^{Lo/-} se refiere a las células de un tipo que se tiñen levemente/de forma opaca o nada o cuando se ponen en contacto con un anticuerpo CD127 marcado. Generalmente, las células se distinguen de acuerdo con sus niveles de expresión de CD127 con base en diferencias fácilmente discernibles en la intensidad de la tinción, como es conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el corte para designar una célula como una célula CD127^{Lo/-} puede establecerse en términos de la distribución de intensidad fluorescente observada para todas las células con aquellas células que caen por debajo del 50%, 40%, 30% o 20% de la intensidad de fluorescencia que se designan como células CD127^{Lo/-}. Una célula CD127⁺ puede designarse como una que cae por debajo del décimo percentil inferior con respecto a la intensidad de fluorescencia. En algunas realizaciones, la distribución de frecuencia de la tinción de CD127 se obtiene para todas las células y la curva de población se ajusta a una población con mayor tinción y menor tinción, y las células asignadas a la población a la que más probablemente pertenezcan estadísticamente en vista de un análisis estadístico de las respectivas distribuciones de población. En algunas realizaciones, las células CD127^{Lo/-} se tiñen de dos a tres veces menos intensamente que las células CD127⁺. Los métodos particularmente preferidos también se ejemplifican en los Ejemplos.

Como se usa en el presente documento, el término "CD4" se refiere a una glicoproteína de la superficie celular que se encuentra típicamente en las células T maduras auxiliares y timocitos inmaduros, así como en monocitos y macrófagos. En células T, CD4 es el correceptor para el receptor de células T (TCR) y recluta la tirosina quinasa 1ck. Con su porción D1, CD4 puede unirse al dominio $\beta 2$ de las moléculas MHC de clase II. CD4⁺ se refiere a células que se tiñen intensamente cuando se ponen en contacto con anticuerpos anti-CD4 marcados, y CD4⁻ se refiere a células de un tipo que tiñe al menos en forma alta, opaca o nula, cuando entran en contacto con un anticuerpo CD4 marcado fluorescentemente. Generalmente, las células se distinguen de acuerdo con sus niveles de expresión de CD4 con base en diferencias fácilmente discernibles en la intensidad de la tinción ya que la tinción de CD4 es claramente bimodal. En algunas realizaciones, la distribución de frecuencia de la tinción de CD4 se obtiene para todas las células y la curva de población se ajusta a una población con mayor tinción y menor tinción, y las células asignadas a la población a la que más probablemente pertenezcan estadísticamente en vista de un análisis estadístico de las respectivas distribuciones de población. En algunas realizaciones, las células CD4⁻ se tiñen de dos a tres veces menos intensamente que las células CD4⁺. Los métodos particularmente preferidos también se ejemplifican en los Ejemplos.

Los métodos de segregación de las células T CD8 en las categorías + y - son conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la distribución de frecuencia de la tinción de CD8 se obtiene para todas las células y la curva de población se ajusta a una población con mayor tinción y menor tinción, y las células asignadas a la población a la

que más probablemente pertenecen desde el punto de vista del análisis estadístico de las respectivas distribuciones de población. En algunas realizaciones, las células CD8⁺ se tiñen de dos a tres veces más intensamente que las células CD8⁻. Los métodos particularmente preferidos también se ejemplifican en los Ejemplos.

5 Como se usa en este documento, el término "CD25" se refiere a la subunidad alfa del receptor de interleuquina 2, una glicoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de 55 kD. Después de la activación de las células T con antígeno o mitógeno en presencia de la monoquina interleuquina 1, la interleuquina 2 (IL-2) se sintetiza rápidamente y se secreta. En respuesta a esto, una subpoblación de células T expresa receptores de alta afinidad para IL-2. Estas células proliferan, expandiendo la población de células T que es capaz de mediar funciones auxiliares, supresoras y citotóxicas. El receptor de IL-2 no se encuentra de forma exclusiva en las células T. CD25^{hi} se refiere a células que se tiñen intensamente cuando se ponen en contacto con anticuerpos anti-CD25 marcados, CD25⁺ se refiere a células que se tiñen menos intensamente cuando se ponen en contacto con anticuerpos anti-CD25 marcados, y CD25^{lo/-} se refiere a células que son de un tipo que tiñe al menos, menos intensamente o nada cuando se ponen en contacto con un anticuerpo CD25 marcado. Generalmente, las células se distinguen de acuerdo con sus niveles de expresión de CD25 con base en las diferencias en la intensidad de la tinción, como es conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el punto de corte para designar una célula como una célula categoría de expresión de CD25, hi (alta), +, lo (baja) o - puede establecerse en términos de la distribución de intensidad fluorescente observada para todas las células. En general, las células en el 2, 3, 4 o 5% de intensidad de tinción superior se designan como "hi", y las que caen en la mitad superior de la población se clasifican como "+". Las células que caen por debajo del 50%, de intensidad de fluorescencia se designan como células CD25^{lo} y por debajo del 5% como células CD25⁻. Los métodos adecuados para identificar y categorizar las células T reguladoras con respecto a su expresión de CD25 se divulgan adicionalmente en Baecher-Allen (41). Los métodos particularmente preferidos también se ejemplifican en los Ejemplos.

25 Una célula CD127^{lo/-} en consecuencia es de un tipo que tiñe al menos intensamente, poco o nada cuando se pone en contacto con un anticuerpo CD127 marcado. Más preferiblemente, las células CD127^{lo/-} son células FoxP3⁺. En algunas realizaciones, las células CD127^{lo/-} son células CD127⁻, células CD4⁺CD127^{lo/-}, células CD25⁺CD4⁺CD127⁻, células CD25^{hi}CD4⁺CD127⁻, células CD25^{hi}CD4⁺CD127^{lo/-} o células CD25^{hi}CD4⁺CD127^{lo/-}. La designación de un tipo de célula con respecto a sus niveles de expresión de un biomarcador o CD mencionado pretende describir la célula a la que se hace referencia por su fenotipo de expresión de biomarcador y no es necesariamente un indicador de que los niveles de expresión se determinaron realmente para la célula referenciada. En realizaciones preferidas, el patrón de expresión de CD de la célula CD127^{lo/-} se determinó solo con respecto a CD127.

35 Las poblaciones de células T reguladoras CD127^{lo/-} para uso de acuerdo con la invención son poblaciones de células que se han seleccionado negativamente para el biomarcador CD127. En algunas realizaciones, las células se han caracterizado adicionalmente con respecto a otros determinantes de CD, particularmente los determinantes de CD4, CD8 y CD25 (por ejemplo, seleccionados positivamente con respecto a CD4, CD8 y/o CD25). En otras realizaciones, las células se han caracterizado adicionalmente según su expresión de determinantes comunes distintos de CD4 y/o CD25. En realizaciones preferidas, las poblaciones de células son sustancialmente del tipo de células seleccionadas.

40 En algunas realizaciones, la célula T inmunosupresora inhibe la producción de IL-2 o la proliferación de células T en un ensayo (por ejemplo, MLR). Estos y otros métodos de ensayo de células T para la actividad inmunosupresora son conocidos por los expertos en la técnica.

45 Como se usa en este documento, el término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a tejidos o fluidos corporales retirados de un mamífero, preferiblemente humano, y que contienen células T reguladoras, que incluyen, pero no se limitan a, células T FoxP3⁺ y/o células T reguladoras CD127^{lo/-}. En algunas realizaciones, las muestras se toman de individuos con una respuesta inmune que necesita ser suprimida. En algunas realizaciones, el individuo tiene una alergia, enfermedad de injerto contra huésped, un trasplante de órgano o un trastorno autoinmune. Las muestras preferiblemente son sangre y fracciones de sangre, que incluyen sangre periférica. La muestra biológica se extrae del cuerpo de un mamífero, tal como un ser humano, y puede ser sangre, células de médula ósea o tejidos similares o células de un órgano afectado con la respuesta inmune no deseada. Los métodos para obtener tales muestras son bien conocidos por los trabajadores en los campos de inmunología celular y cirugía. Incluyen tomar muestras de sangre de formas bien conocidas u obtener biopsias de la médula ósea u otro tejido u órgano. En realizaciones preferidas, la muestra es una muestra enriquecida de células T en la que las células de la muestra son sustancialmente células T.

55 Las muestras de células T enriquecidas se refieren a aquellas muestras o muestras biológicas que se han enriquecido en células T mediante la selección positiva de las células T que portan el marcador CD4 y/o la selección positiva del marcador CD8 determinando los niveles de expresión de los marcadores CD4 y CD8, respectivamente. Se han enriquecido otras muestras de células T enriquecidas en células T mediante selección negativa de (es decir, seleccionando contra) células no T que pueden distinguirse por sus niveles de expresión de otros determinantes comunes exclusivos de CD25. Más preferiblemente, el enriquecimiento de la muestra en células T no está específicamente de acuerdo con su nivel de expresión de CD25. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, la muestra enriquecida comprende sustancialmente una población de células T reguladoras que comprende al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 20% de células CD25⁺ o células CD25^{lo} o CD25⁻.

65 "Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de expresión o de actividad se usan para referirse a inhibir, activar o

modular células, respectivamente, y se identifican usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para expresión o actividad. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Un modulador puede ser un anticuerpo o un ligando soluble que se une a una proteína de interés. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, inhiben la expresión de un polipéptido o polinucleótido de la invención o se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación o actividad enzimática, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o subregulan la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención, por ejemplo, antagonistas. Los moduladores preferidos inhiben o suprimen las respuestas inmunes a un antígeno o aloantígeno. Los ensayos para identificar inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, la aplicación de moduladores putativos a células inmunes y luego la determinación de los efectos funcionales de la célula sobre la respuesta inmune (por ejemplo, MLR). Los inhibidores o moduladores se comparan con las muestras de control sin el inhibidor o modulador para examinar la extensión del efecto. Las muestras de control (no tratadas con moduladores) tienen asignado un valor de actividad relativo del 100%. La inhibición se logra cuando el valor de la actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención con relación a la muestra de control es aproximadamente 80%, opcionalmente 50% o 25 a 1%, o menos. La activación se logra cuando el valor de actividad de un polipéptido o polinucleótido de la invención con relación a la muestra de control es del 110%, opcionalmente del 150%, opcionalmente del 200-500%, o del 1.000-3.000%, o superior.

El término "aislado" con respecto a una población de células como se usa en el presente documento se refiere a una población de células que no tiene una contraparte natural o ha sido separada o purificada de otros componentes, incluidos otros tipos de células, que naturalmente la acompañan, por ejemplo, en tejidos normales o enfermos tales como pulmón, riñón o placenta, tejido tumoral tal como tejido de cáncer de colon o fluidos corporales tales como sangre, suero u orina. Típicamente, una población de células aislada está al menos dos, cuatro u ocho veces enriquecida para un tipo celular específico cuando se compara con la fuente natural de la que se obtuvo la población.

Una población o subpoblación de células que es "sustancialmente" de un tipo de célula específico es una que tiene un recuento del tipo de célula especificado que es al menos 50%, 75%, 80%, 90%, 95% o, lo más preferiblemente, 98% o 99% del recuento celular total de la población o subpoblación o una que está al menos dos, cuatro, ocho veces, diez veces o 20 veces enriquecida en un tipo celular especificado en comparación con una población fuente del tipo de célula especificada.

Un "anticuerpo anti-X" o "anticuerpo X" de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se puede unir específicamente a X. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD127 o el anticuerpo CD127 es capaz de unirse a CD127. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos recombinantes, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados o primatizados, y fragmentos de anticuerpos. Un gran número de anticuerpos específicos de biomarcadores de linfocitos están disponibles comercialmente. Estos incluyen anticuerpos anti-CD127, anti-CD4 y anti-CD25.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de la misma que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión a antígeno de un anticuerpo será la más crítica en especificidad y afinidad de unión.

Un ejemplo de una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Existen anticuerpos, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3d ed., 1993)). Aunque varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse nuevamente químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados de nuevo que utilizan metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados usando bibliotecas de expresión de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554 (1990)), se puede usar un ligando de alta afinidad de un objetivo en lugar del anticuerpo.

La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente)

inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, a menudo en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se pueden seleccionar para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con el antígeno seleccionado y no con otras proteínas. Esta selección se puede lograr sustrayendo los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con otras moléculas.

Preferiblemente, un "marcador" o una "porción detectable" se une covalente o no covalentemente al anticuerpo. Un marcador puede detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Los marcadores particularmente útiles son colorantes fluorescentes. Los métodos para unir marcadores a anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los marcadores particularmente preferidos son aquellos que están unidos al anticuerpo por un enlazador que puede escindirse o separarse fácilmente o someterse a hidrólisis por contacto con una enzima predeterminada en condiciones fisiológicas. El anticuerpo también puede conjugarse con una partícula magnética, tal como una microperla paramagnética (Miltenyi Biotec, Alemania). Una célula T activada unida por un anticuerpo marcado magnéticamente se puede aislar usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, clasificación magnética de células. Los anticuerpos adecuadamente marcados para CD127, CD4 y CD25, así como muchos otros CD, están comercialmente disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede marcarse antes o después del contacto con la muestra o antes o después del contacto con el CD. El anticuerpo de CD puede marcarse poniéndolo en contacto con un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo de CD.

El término "compuesto de prueba" o "molécula candidata" o "modulador" o equivalentes gramaticales como se usa en el presente documento describe cualquier molécula, ya sea natural o sintética, por ejemplo, proteína, polipéptido, oligopéptido (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 10 a 20 o 12 a 18 aminoácidos de longitud, preferiblemente 12, 15 o 18 aminoácidos de longitud), molécula orgánica pequeña, polisacárido, lípido, ácido graso, polinucleótido, ARNi, oligonucleótido, etc. El compuesto de prueba puede estar en forma de una biblioteca de compuestos de prueba, tal como una biblioteca combinatoria o aleatoria que proporciona un intervalo suficiente de diversidad. Los compuestos de prueba se unen opcionalmente a un compañero de fusión, por ejemplo, compuestos de direccionamiento, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizantes, compuestos direccionables y otras porciones funcionales. Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades inmunosupresoras útiles identificando un compuesto de prueba (denominado "compuesto principal") con alguna propiedad o actividad deseable, por ejemplo, inhibiendo la expresión de CD127, sobrerregulando la expresión de FoxP3 y creando variantes del compuesto principal y evaluando la propiedad y la actividad de esos compuestos variantes. A menudo, los métodos de cribado de alto rendimiento (HTS) se emplean para dicho análisis.

Una "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula orgánica, natural o sintética, que tiene un peso molecular de más de aproximadamente 50 Daltons y menos de aproximadamente 2.500 Daltons, preferiblemente menos de aproximadamente 2.000 Daltons, preferiblemente entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 Daltons, más preferiblemente entre aproximadamente 200 a aproximadamente 500 Daltons.

"Determinación del efecto funcional" se refiere a analizar un compuesto que aumenta o disminuye la expresión de CD127. Tales efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cambios en las propiedades espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicas (por ejemplo, la forma), cromatográficas o de solubilidad para la proteína; medición de marcadores inducibles o activación transcripcional de la proteína; medición de la actividad de unión o ensayos de unión, por ejemplo, unión a anticuerpos; medición de los cambios en la afinidad de unión del ligando; por ejemplo, mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión a anticuerpos, marcadores inducibles y ensayos de unión a ligando.

Se toman muestras o realizan ensayos para identificar agentes inmunosupresores o fármacos en presencia del inhibidor candidato de la expresión de CD127 y luego los resultados se comparan con muestras de control sin el inhibidor para examinar la actividad deseada o determinar el efecto funcional del inhibidor candidato. Se puede usar un control de referencia positivo que es un agente que tiene la actividad deseada. Las muestras de control (no tratadas con inhibidores) tienen asignado un valor relativo del 100%. La inhibición se logra cuando el valor de la actividad con relación al control es aproximadamente 80%, preferiblemente 50%, más preferiblemente 25% a 1%, o incluso menos (por ejemplo, 0,2%, 0%).

Descubrimientos y hallazgos

Se ha descubierto que CD127, incluso en ausencia de selección de CD25, es un marcador excelente de Treg en sangre periférica humana. El marcador de la superficie celular se expresa a bajos niveles en una abrumadora mayoría de Treg y distingue hasta un 20% de las células T CD4⁺ como Treg potenciales. Además, el marcador de superficie celular puede usarse, sin determinar la expresión de los niveles de CD25 en las células T reguladoras, para separar un subconjunto de células T supresoras y, por lo tanto, será una herramienta útil para la selección y expansión de células T para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Como se indicó anteriormente, las células T reguladoras (Treg) son reguladores críticos de la tolerancia inmune. La mayoría de las Treg se definen con base en la expresión de CD4, CD25 y el factor de transcripción, FoxP3. La información reciente ha identificado la importancia del gen Foxp3 que es inducido por el epitelio del timo para provocar que las células T desarrollen células T reguladoras CD25⁺ CD4⁺, en modelos animales de enfermedades autoinmunes. La deficiencia de este gen puede conducir a fenómenos y enfermedades autoinmunes de amplia diseminación. Sin embargo, estos marcadores han demostrado ser problemáticos para definir de manera única este subconjunto especializado de células T en humanos. Hemos encontrado que el receptor de IL-7 (CD127) está regulado por disminución en un subconjunto de células T reguladoras de CD4⁺ en sangre periférica. Demostramos que la mayoría de estas células son FoxP3⁺, incluidas aquellas que expresan niveles bajos o que no contienen CD25. Una combinación de CD4, CD25 y CD127 dio como resultado una población altamente purificada de Treg que representaba significativamente más células que previamente se identificaron con base en otros marcadores de superficie celular. Estas células fueron altamente supresoras en los ensayos de supresores funcionales. De hecho, las células separadas basadas únicamente en la expresión de CD4 y CD127 eran anérgicas y, aunque representaban al menos 3 veces el número de células (incluidos los subconjuntos de células T CD25⁺CD4⁺ y CD25⁺CD4⁺), fueron tan supresoras como el subconjunto "clásico" de Treg CD4⁺CD25^{hi}. Finalmente, mostramos que CD127 se puede usar para cuantificar subconjuntos de Treg en individuos con diabetes tipo 1 que apoya el uso de CD127 como un biomarcador para Treg humana.

En un esfuerzo por definir nuevos biomarcadores de Treg humanas, hemos combinado microarreglos de expresión génica, citometría de flujo y ensayos de función para identificar nuevas proteínas de superficie celular que distinguen a las Treg humanas. Observamos que IL-7R (CD127) se subregula en todas las células T humanas después de la activación. En contraste con la nueva expresión informada de CD 127 en la mayoría de las células T efectoras y de memoria (32-35), las células T FoxP3⁺ permanecen como CD127^{lo/-}. De hecho, las células T CD127^{lo/-}, FoxP3⁺ representaron un porcentaje significativo de las células T CD4⁺ en la sangre periférica. Demostramos que FoxP3 interactúa con el promotor CD 127 y dada su supuesta función represora probablemente contribuye a la expresión reducida de CD 127 en las Treg. Finalmente, mostramos que el subconjunto de células T CD4⁺ CD127^{lo/-} aisladas es anérgico y suprime las respuestas de aloantígeno *in vitro*. Juntos, estos datos sugieren una dicotomía entre las células T de memoria que son IL-2R^{lo}IL-7R^{hi} y células T reguladoras FoxP3⁺ que en la mayoría de los casos sobrerregulan IL-2R mientras permanecen como IL-7R^{lo/-} (30). Por lo tanto, el biomarcador CD127 puede usarse para enriquecer selectivamente las Treg humanas para estudios funcionales *in vitro* y en terapia *in vivo*.

Realizaciones

En un primer aspecto, la invención proporciona métodos para preparar una población de células T aisladas reguladoras inmunosupresoras, comprendiendo dicho método: seleccionar una muestra que comprende células T para los niveles de expresión de un conjunto de marcadores que consiste en CD4, CD127 y CD25 para detectar las células T CD4⁺ CD127^{lo/-}CD25⁺ y aislar las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ detectadas para proporcionar la población de células T aisladas reguladoras inmunosupresoras, en las que la población comprende al menos 10³ células T reguladoras inmunosupresoras. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de células T enriquecida. En algunas realizaciones, las poblaciones de células T así fabricadas tienen al menos 4, 8, 10 o 20% de células T reguladoras CD25⁺ y/o CD25⁻.

En un segundo aspecto, la invención proporciona métodos para preparar poblaciones expandidas de poblaciones de células T reguladoras inmunosupresoras aisladas que son sustancialmente FoxP3⁺ expandiendo una población de células T aisladas obtenida mediante los métodos anteriores. En algunas realizaciones, la población de células T FoxP3⁺ aisladas se expande poniendo en contacto las células T aisladas de la población con antígeno, aloantígeno o anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 en presencia de TGFβ o rapamicina. Alternativamente, en este aspecto, las células T en la muestra biológica pueden primero expandirse y luego aislarse mediante los métodos anteriores. En realizaciones preferidas de cualquiera de los enfoques, las poblaciones de células T inmunosupresoras aisladas expandidas comprenden al menos 2, 4, 8, 10 o 20% de células T reguladoras CD25⁻ y/o CD25⁺. En realizaciones preferidas, las células CD127^{lo/-} se identifican poniendo en contacto células T reguladoras en la muestra con anticuerpos monoclonales marcados fluorescentemente que se unen específicamente a CD127⁺ y se clasifican las células T reguladoras según su nivel de expresión de CD 127 usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS).

También se divulgan métodos para modular una respuesta inmune en un sujeto, en el que las poblaciones de células T reguladoras inmunosupresoras aisladas, aisladas o expandidas, obtenidas mediante los métodos anteriores se administran al sujeto. La muestra biológica a partir de la cual se obtienen las células T reguladoras puede ser autóloga porque la propia muestra biológica se obtuvo del sujeto a tratar. El sujeto puede ser cualquier mamífero (por ejemplo, humano, primate) en el que se desee la modulación de una reacción inmune. En algunas realizaciones, un sujeto humano o mamífero tiene un trastorno, enfermedad o afección inmune o una enfermedad autoinmune a tratar. Existen numerosos modelos animales establecidos para usar epítomos de células T de autoantígenos para inducir tolerancia, que incluyen esclerosis múltiple (EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental), miastenia grave (EMG: miastenia grave experimental) y neuritis (EAN: neuritis autoinmune experimental). El sujeto puede ser humano afectado por una enfermedad o trastorno autoinmune, tal como cualquiera de las enfermedades/trastornos enumerados en la Tabla A.

En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden poblaciones de células T

FoxP3⁺ inmunosupresoras aisladas o expandidas obtenidas de acuerdo con los métodos anteriores.

También se divulgan métodos para producir una composición enriquecida de células T reguladoras específicas de antígeno, y composiciones y métodos de uso resultantes. Un ejemplo es un método para modular una reacción inmune en un sujeto, comprendiendo dicho método (a) obtener una población de células compatibles con el sujeto que incluyen células CD4⁺ y CD4⁻ y células CD127⁺ y CD127⁻ y células CD25⁺ y CD25⁻; (b) producir una composición enriquecida de células T reguladoras CD127^{lo/-} o FoxP3⁺ específicas del antígeno de dicha población de células clasificando las células únicamente con base en el antígeno CD127, y (c) introduciendo dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción inmune en dicho sujeto. La respuesta inmune puede ser una respuesta autoinmune y el antígeno es un autoantígeno. La respuesta inmune puede ser alternativamente una respuesta inmune de injerto contra huésped y el antígeno un autoantígeno. La respuesta inmune puede ser alergia, asma, rechazo de trasplante de tejido o de órgano, o una respuesta inmune de injerto contra huésped y el antígeno es un componente purificado o no purificado del alérgeno o tejido u órgano trasplantado que provoca la respuesta inmune nociva. Preferiblemente, como la composición enriquecida no se seleccionó directamente en función de la presencia o ausencia de biomarcador CD25 en las células, la composición enriquecida comprende al menos 2%, 4%, 6%, 8%, 10% o 20% de células CD25⁻.

En aún otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la selección puede incluir determinar los niveles de expresión de biomarcadores secundarios de antígenos de superficie de células T o determinantes comunes, que incluyen los biomarcadores CD25. Para mejorar el enriquecimiento, la selección positiva puede combinarse con la selección frente a células que comprenden marcadores de superficie específicos para tipos de células T no reguladoras, tales como el agotamiento de células portadoras de CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56 como lo conoce un especialista en la materia. Por consiguiente, la selección en cualquiera de las realizaciones anteriores se practica en una muestra de células T enriquecida.

De acuerdo con estas realizaciones adicionales, se divulgan también métodos para producir una composición enriquecida de células T reguladoras específicas de antígeno, y composiciones resultantes y métodos de uso. Un ejemplo es un método para modular una reacción inmune en un sujeto, comprendiendo dicho método (a) obtener una población de células compatibles con el sujeto que contienen células CD4⁺ y CD4⁻ y células CD127⁺ y CD127⁻ y células CD25⁺ y CD25⁻; (b) producir una composición enriquecida de células T CD4⁺CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno de dicha población de células y (c) introducir dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción inmune en dicho sujeto. La respuesta inmune puede ser una respuesta autoinmune y el antígeno un autoantígeno. La respuesta inmune puede ser alternativamente una respuesta inmune de injerto contra huésped y el antígeno un autoantígeno. La respuesta inmune puede ser alergia, asma, rechazo de trasplante de tejido o de órgano, o una respuesta inmune de injerto contra huésped y el antígeno es un componente purificado o no purificado del tejido u órgano trasplantado con alérgeno que provoca la respuesta inmune. Preferiblemente, la composición enriquecida no se seleccionó directamente con base en la presencia o ausencia o expresión del biomarcador CD25 en las células. La composición enriquecida preferiblemente comprende al menos 2%, 4%, 6%, 8%, 10% o 20% de células CD25⁻ o CD25⁺. La composición enriquecida también puede enriquecerse para células CD25⁺ clasificando las células con base en la presencia o ausencia del biomarcador CD25 en las células.

También se divulgan kits que comprenden materiales específicamente útiles en la realización de los métodos anteriores.

También se divulgan métodos para identificar fármacos inmunosupresores determinando su efecto en solo un marcador de superficie de células T, CD127, o en una pluralidad de marcadores que incluyen CD127 y opcionalmente uno u otro o ambos de CD4 y CD25. Los fármacos que son inmunosupresores reducen el número de células CD127^{lo/-} en una población de células T de muestra cuando entran en contacto con una muestra de tales células en comparación con una muestra de control adecuada en contacto con un vehículo o una sustancia no inmunomoduladora.

También se divulga una población de células T aisladas reguladoras que son sustancialmente CD4⁺ y CD127^{lo/-}. Las células Treg se pueden aislar a partir de una muestra que comprende las células Treg CD4⁺ y CD127^{lo/-} y que comprende además células Treg CD4⁻ y células CD127⁺ clasificando las células en la muestra de acuerdo con su expresión del biomarcador CD4 y de acuerdo con su expresión del biomarcador CD127. La población aislada puede obtenerse poniendo en contacto una muestra que contiene células Treg con un anticuerpo marcado específico para el biomarcador CD4 y con un anticuerpo marcado específico para el biomarcador CD127 para identificar células Treg que son CD4⁺ y CD127^{lo/-}, y aislar las células identificadas. El anticuerpo CD4 y el anticuerpo CD127 pueden marcarse cada uno con un marcador diferente. El marcador del anticuerpo CD4 y el marcador del anticuerpo CD127 pueden ser cada uno un marcador fluorescente. La muestra no se puede poner en contacto con un anticuerpo específico para el biomarcador CD25 o para el biomarcador CD4, o ambos. Preferiblemente, las células CD4⁺ y CD127^{lo/-} se identifican y aíslan en un clasificador celular activado por fluorescencia. La muestra puede ser una muestra de sangre periférica. Preferiblemente, al menos 2, 4, 8, 10 o 20% de las células T CD4⁺ CD127^{lo/-}, de la población también son CD25^{lo/-} o CD25⁻, la población aislada de células T reguladoras puede ser sustancialmente CD4⁺ y CD127⁻.

También se divulga una población de células T aisladas reguladoras que son sustancialmente CD8⁺ y CD127^{lo/-}. Las células Treg se pueden aislar a partir de una muestra que comprende las células Treg CD8⁺ y CD127^{lo/-} y que comprende además células CD8⁻ y células Treg CD127⁺ clasificando las células en la muestra de acuerdo con su expresión del biomarcador CD8 y de acuerdo con su expresión del biomarcador CD127. La población aislada puede

- 5 obtenerse poniendo en contacto una muestra que contiene células Treg con un anticuerpo específico marcado para el biomarcador CD8 y con un anticuerpo marcado específico para el biomarcador CD127 para identificar células Treg que son CD8⁺ y CD127^{lo/-}, y aislar las células identificadas. El anticuerpo CD8 y el anticuerpo CD 127 pueden marcarse cada uno con un marcador diferente. El marcador del anticuerpo CD8 y el marcador del anticuerpo CD127 pueden ser cada uno un marcador fluorescente. La muestra no se puede contactar con un anticuerpo específico para el biomarcador CD25 o para el biomarcador CD8, o ambos. Preferiblemente, las células CD8⁺ y CD127^{lo/-} se identifican y aíslan en un clasificador celular activado por fluorescencia. La muestra puede ser una muestra de sangre periférica. Preferiblemente, al menos 2, 4, 8, 10 o 20% de las células T CD8⁺CD127^{lo/-}, de la población también son CD25⁺ o CD25⁻. La población aislada de células Treg puede ser sustancialmente CD8⁺ y CD127⁻.
- 10 También se divulga una población aislada, expandida de células Treg que son sustancialmente CD4⁺ y CD127^{lo/-} o CD8⁺ y CD127^{lo/-} en el que dicha población expandida se obtiene poniendo en contacto la población aislada como se describió anteriormente con aloantígeno o anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL2 más TGFβ o rapamicina.
- 15 La invención proporciona una composición farmacológica que comprende poblaciones celulares aisladas de acuerdo con la invención. En realizaciones relacionadas, la invención proporciona el uso de una población de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la fabricación de un medicamento para suprimir la respuesta inmune en un sujeto que lo necesite. El sujeto puede tener una enfermedad o trastorno inmune, una enfermedad autoinmune, una reacción de injerto contra huésped, un trasplante de órgano, asma o alergia. En realizaciones particulares, el sujeto tiene diabetes tipo I.
- 20 También se divulga un método para obtener una población de células Treg anérgicas, comprendiendo dicho método obtener una muestra que contiene células Treg y clasificar las células de acuerdo con la ausencia o presencia del biomarcador CD127, el biomarcador CD4 y/o el biomarcador CD8, y opcionalmente el biomarcador CD25. En métodos adicionales de este tipo, las Treg anérgicas son sustancialmente células FoxP3⁺.
- 25 También se divulga un método para obtener una población expandida de células T anérgicas, comprendiendo dicho método la etapa de obtener una muestra que contiene células Treg, expandiendo una población de células Treg CD4⁺CD127^{lo/-} o Treg CD4^{lo}CD127^{lo/-} en el mismo y clasificación de las células según la ausencia o presencia o nivel de expresión de los biomarcadores CD127 y CD4 o CD8 donde el subconjunto de células T supresoras consiste sustancialmente en la población expandida de células Treg CD8⁺CD127^{lo/-} o células T CD4⁺CD127^{lo/-}. Las células de la población expandida no pueden clasificarse adicionalmente con respecto a la presencia de ausencia del biomarcador CD25 y el subconjunto de células T supresoras consiste sustancialmente en células T CD4⁺CD127^{lo/-}, siendo al menos 2% de las células T CD4⁺ CD127^{lo/-}, CD25⁻. Alternativamente, si se clasifica según su nivel de expresión de CD25, las células CD25⁺ además de las células Cd25^{hi} se seleccionan positivamente.
- 30 También se divulga un método para obtener una población expandida de células T anérgicas, comprendiendo dicho método la etapa de obtener una muestra de células T enriquecida y aislar y expandir o expandir y aislar allí una población de células Treg CD127^{Lo/-}. Las células de la población expandida no pueden clasificarse más con respecto a la presencia de ausencia del biomarcador CD25 y el subconjunto de células T supresoras consiste sustancialmente en células T CD4⁺CD127^{lo/-}, con al menos 2 % de las células T CD4⁺CD127^{lo/-}, siendo CD25⁻. Alternativamente, si se clasifica según su nivel de expresión de CD25, las células CD25⁺ además de las células Cd25^{hi} se seleccionan positivamente para.
- 40 También se divulga un método para obtener una población expandida de células T anérgicas, comprendiendo dicho método la etapa de obtener una muestra que contiene células Treg, clasificando las células según la ausencia o presencia de los biomarcadores CD127 y CD4 o CD8 para obtener una población aislada de células Treg CD4⁺CD127^{lo/-} y expandir la población aislada de células Treg CD4⁺CD127^{lo/-} para obtener la población expandida de células T anérgicas. Las células de la población expandida no pueden clasificarse más con respecto a la presencia de ausencia del biomarcador CD25 y el subconjunto de células T supresoras consiste sustancialmente en células T CD4⁺CD127^{lo/-}, con al menos 2 % de las células T CD4⁺CD127^{lo/-}, siendo CD25⁻.
- 45 Métodos de modulación de una reacción inmune usando poblaciones expandidas de Treg CD127^{lo/-}.
- 50 También se divulgan métodos para producir una composición enriquecida de células T reguladoras específicas de antígeno, y composiciones y métodos de uso resultantes. Un ejemplo es un método para modular una reacción inmune en un sujeto, comprendiendo dicho método (a) obtener una población de células compatibles con el sujeto que contiene células CD4⁺ y CD4⁻ y células CD127⁺ y CD127⁻ y células CD25⁺ y CD25⁻; (b) producir una composición enriquecida de células T CD127^{lo/-} y/o FoxP3⁺ reguladoras específicas de antígeno de dicha población de células mediante el uso de los métodos descritos anteriormente y (c) introducir dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción inmune en dicho sujeto. La respuesta inmune puede ser una respuesta autoinmune y el antígeno un autoantígeno. La respuesta inmune puede ser alternativamente una respuesta inmune de injerto contra huésped y el antígeno es un autoantígeno. La respuesta inmune puede ser alergia, asma, rechazo de trasplante de tejido u órgano, o una respuesta inmune de injerto contra huésped y el antígeno un componente purificado o no purificado del tejido u órgano trasplantado con alérgeno que provoca la respuesta inmune. La composición enriquecida puede no seleccionarse directamente con base en la presencia o ausencia de biomarcador CD25 en las células. Por consiguiente, la
- 55
- 60
- 65

composición enriquecida puede comprender al menos 2%, 4%, 6%, 8% de células CD25⁻. La composición enriquecida también puede enriquecerse para células CD25⁺ clasificando las células con base en la presencia o ausencia del biomarcador CD25 en las células.

5 La población de células puede obtenerse a partir de dicho sujeto, obtenida de un donante distinto de dicho sujeto, y/o recolectada a partir de sangre periférica. La población de células obtenida comprende antígeno o células T reguladoras (Treg) específicas de autoantígeno, y puede derivarse de cualquier fuente en la que existan antígenos o células Treg específicas de autoantígeno, tales como sangre periférica, timo, ganglios linfáticos, bazo y médula ósea. La fuente de las células Treg puede ser de tejido cadavérico.

10 La etapa de producción puede comprender expandir dichas células T reguladoras específicas de antígeno, y/o enriquecer las células T reguladoras específicas de antígeno de dicha población de células obtenidas.

15 La expansión se puede lograr poniendo en contacto dicha población de células con una composición estimulante de células T reguladoras específicas de antígeno.

20 Las células T CD127^{lo/-}, CD4⁺CD127^{lo/-} y/o FoxP3⁺ aisladas pueden aislarse de dicha población de células antes de dicha etapa de expansión, o después de dicha etapa de expansión. Por consiguiente, las células aisladas pueden comprender al menos 2%, 4%, 6%, 8% de células CD25⁻.

25 La composición estimuladora puede comprender un complejo MHC de clase II/péptido autoantigénico, un agente coestimulador o un segundo agente estimulador de células T reguladoras. Las células CD127^{lo/-}, CD4⁺ CD127^{lo/-} aisladas con o sin la inclusión de CD25 como un marcador de selección positiva adicional pueden aislarse de dicha población de células antes de dicha etapa de expansión, o después de dicha etapa de expansión.

30 El agente coestimulador puede ser un anticuerpo agonista (por ejemplo, un anticuerpo agonista que se une a CD28). El segundo agente estimulante puede ser una citoquina (por ejemplo, una interleuquina, (por ejemplo, interleuquina 2)). El agente coestimulador puede ser un anticuerpo agonista (por ejemplo, un anticuerpo agonista que se une a CD28 en presencia o ausencia de un segundo agente estimulante que puede ser una citoquina (por ejemplo, una interleuquina, interleuquina 2)).

La composición estimuladora se puede inmovilizar sobre un sustrato, tal como una célula o una perla.

35 También se divulgan composiciones que comprenden una población de células en las que las células son sustancialmente células T CD127^{lo/-}, CD4⁺ CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno y/o células T FoxP3⁺ que comprenden al menos 2, 4, 6, 8 o 10% de células T CD25⁻.

40 También se divulgan composiciones que comprenden una población de células en las que las células son sustancialmente células T CD127^{lo/-}, CD8⁺ CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno y/o células T FoxP3⁺ que comprenden al menos 2, 4, 6, 8 o 10% de CD25⁻.

45 Las células T reguladoras específicas de autoantígeno pueden ser específicas para péptidos presentados en moléculas de MHC de clase II que incluyen aquellas mostradas en la Tabla A. Las células T reguladoras específicas de autoantígenos pueden ser eficaces para modular una reacción autoinmune cuando se administran a un sujeto.

Tabla A:

Enfermedad autoinmune	Autoantígeno	Molécula de MHC clase II/péptido(s) unidos
Lupus eritematoso	giantina	
	golgina-245/p230	
	golgina-160/GCP170	
	golgina-95/GM130	
	golgina-97	
	golgina-67	
	transferrina	119-VVKKGTDFQLNQLGKK
		119-VVKKGTDFQLNQLGKK [véase Freed et al., J. Immunol. (2000) 164: 4697-4705
	A _β ^k (37-51 mayor; (37-52 menor)	YVRFSDVGEYRAVTE
	Lisozima c (48-63)	GDQSTDYGFQINSRY
nucleoporina NUP155 (120-)	RQVRFYSGVIEL	
Saposina D (37-)	LPDPYQKQCDDFVAE	
26S proteasoma p112 (224-)	IFLDDPQAVSDVL	

ES 2 686 593 T3

	14-3-3 protein β , $\tilde{\alpha}$, ζ , θ , σ , τ (95-)	KTAFDEAIAELD
	A β ^k (146-) (110-)	STQLIRNGDWTQVLVLMEM HHNTLVCSVTDFYPAKIKVR
	Ig γ cadena 1 (141-)	SMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
Púrpura trombocitopénica	GP1Ib/IIIa	HLA-DR (Kuwana et al., J Clin Invest. 1998 Oct 1;102(7); 1393-402)
	Integrina plaquetaria	
Síndrome de Goodpasture	Membrana basal glomerular humana	
Enfermedad de Graves	tiroglobulina	
	tiroperoxidasa	
	simporter de sodio-yodo	
	receptor de TSH	
diabetes mellitus Tipo I	Insulina, proinsulina	DQ0601/insulina B ss5-15 aa1-15: FVNQHLCGSHLVEAL (véase Ettinger y Kwok, J. Immunol. Marzo 1 de 1998; 160(5):2365-73) HLA- DR3
	Ácido glutámico descarboxilasa (GAD65)	HLA-DR4 (DRB1*0401)/271-285 (PRLIAFTSEHSHFSL) 116-130 (NILLQYVVKSFDRST) HLA-DR4 (DRA1*0101)/356-370 (KYKIWMHVDAAWGGG), 376-390 (KHKWKLNQVERANSV) 481-495 (LYNIIKNREGYEMVF) 511-525 (PSLRVLEDNEERMSR) 546-560 (SYQPLGDKVNFFRMV), 556-570 (FFRMVISNPAATHQD), y 566-580 (ATHQDIDFLIEEIER); HLA- DQ8/206-220 (TYEIAFPVFLLEYVT) (véase Peng, Y. Chin Med J 2001; 114(10): 229-242)
	tirosina fosfatasa IA-2	
	tirosina fosfatasa 2b	
	IGRP	
	Proteína humana: proteína Q9UN79 - SOX-13 (autoantígeno ICA12 de diabetes tipo I) (antígeno 12 de células de islote).	
	ICA69	
Misastenia grave	Gravina	
	receptor nicotínico de acetilcolina muscular (AChR)	121-126 (PAIFKSYCEIIVTHFP) 129-145 (EIVTHFPFDEQNCSMK) [véase J Immunol 159(3): 1570-7] páginas 195-212 (DTPYLDITYHFVMQRLPL) [véase Scand J Immun. 44(5): 512-21]
Pénfigo vulgar	desmogleina 1, desmogleina 3, desmocolina 1 humana (Dsc1)	
Penfigoide bulloso	BP 180	
Hepatitis autoinmune	Formiminotransferasa ciclodesaminasa	
Gastritis de cuerpo atrófico autoinmune	Adenosina trifosfatasa H, K de células parietales (ATPasa)	
Enfermedad de Addison	CYP21	
	CYP17	
	CYP11A1	
Artritis reumatoide	Proteína de unión a inmunoglobulina chaperona molecular de retículo endoplasmático (BiP)	
	Glicoproteína 39 de cartílago humano (YKL40)	HLA-DR4 (DRB1*0401)/aa259-271 (PTFGRSFTLASSE) (véase Vos et al., Rheumatology (2000) 39: 1326-1331)
	colágeno tipo II	
	glucosa-6-fosfato isomerasa	
Esclerosis múltiple	alpha β -Cristalina	DRB1*1501

	glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG)	HLA-DR4(DRB1*0401)/97-108 (TCFFRDHSYQEE) (véase Forsthuber et al., J Immunol. Diciembre 15 de 2001; 167(12): 7119-25)
	proteína base de la mielina (MBP)	111-119 (SLSRFSWGA) y 87-95 (VVHFFKNIV) presentada en HLA- A2 y HLA-A24) [véase JI, 172(8): 5120-7]
	X2MBP	
Psoriasis	Citoqueratina 17	
	Antígeno linfocitario cutáneo (CLA)	
Anemia hemolítica autoinmune	Banda 3 de la proteína del canal de aniones	861-874 (CLA VLWVVKSTPAS) [véase Blood 15; 102(10): 3800-6]
Uveítis	Antígeno S	341-354 (FLGELTSSEVATEV) [véase Int. Immun., 15(8): 927-935]
	Proteína de unión al interfotorreceptor retinoide (IRBP)	
	HLA-B(B27PD)	125-138 ALNEDLSSQTAADT [véase Int. Immun., 15(8): 927-935]

Se divulgan también kits para producir una composición de células T reguladoras no específicas de antígeno y específicas de antígeno. El kit puede incluir (a) anticuerpo CD127, (b) un agente estimulador del receptor de células T específicas o no específicas de antígeno; y (c) un agente coestimulador. El agente estimulador puede ser un complejo de MHC clase II/péptido autoantigénico. El agente coestimulador puede ser un anticuerpo agonista, tal como un anticuerpo que se une a CD28. El kit puede comprender además un segundo agente estimulante de células T reguladoras, tal como una citoquina, tal como una interleuquina, tal como interleuquina 2 o interleuquina 15. El agente estimulador y dicho agente coestimulador se pueden inmovilizar sobre un sustrato, tal como una célula o perla en algunas realizaciones. El kit también puede contener un anticuerpo CD4 y/o un anticuerpo CD25. Los anticuerpos preferiblemente están marcados fluorescentemente o magnéticamente y son monoclonales. El kit preferiblemente también contendrá instrucciones sobre cómo aislar células CD127^{lo/-} y cómo almacenarlas o formularlas para uso *in vitro* o *in vivo*. Dichos kits también pueden proporcionar instrucciones sobre cómo seleccionar las células CD127^{lo/-} usando un anticuerpo CD127. Opcionalmente, existe la condición de que el kit no tenga medios para detectar el marcador CD25.

También se divulgan métodos y composiciones para expansión *ex vivo* de células T reguladoras terapéuticas, y composiciones resultantes y métodos de uso. Los métodos de expansión generalmente comprenden las etapas de: aislar de una población mixta de células T una subpoblación enriquecida en células T CD127^{lo/-} (células Treg) mediante la clasificación de las células de acuerdo con la presencia o ausencia o expresión de biomarcadores como se expuso anteriormente; expandir las células Treg de la subpoblación poniendo en contacto la subpoblación con cantidades efectivas de (i) un activador de TCR/CD3 (ii) un activador coestimulador de TCR y (iii) IL-2, para obtener células Treg expandidas *ex vivo*, en donde las células Treg expandidas demuestran inmunosupresión, en donde la etapa de aislamiento típicamente viene precedida por la extracción de la población de una persona o paciente, que típicamente sufre o está en remisión de una enfermedad autoinmune u otra inmune (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped, asma, alergia, rechazo de trasplante) susceptible de terapia como se describe en este documento. El aislamiento de una población mixta de células T de una subpoblación enriquecida en células T CD4⁺ CD127^{lo/-} (células Treg) mediante la clasificación de las células de acuerdo con la presencia o ausencia o el nivel de expresión de los biomarcadores CD127 puede realizarse sin tener en cuenta la presencia o ausencia de CD25 o CD4 en las células. Las células Treg también pueden enriquecerse para células CD25⁺ por selección de acuerdo con la ausencia o presencia del biomarcador CD25.

La subpoblación puede comprender más de 90, 95, 98 o 99% de células Treg CD127^{lo/-}; la etapa de aislamiento puede comprender inmunoselección negativa y positiva y clasificación de células; preferiblemente, la etapa de expansión produce al menos una expansión de 100 veces la subpoblación; el activador TCR/CD3 es un anticuerpo o ligando multivalente para TCR/CD3; el activador coestimulador del TCR es un anticuerpo o ligando multivalente para CD28, GITR, B7-1/2, CD5, ICOS, OX40 o CD40; la cantidad efectiva de IL-2 es de 200 a 2.500 UI de IL-2/mL; y/o las células Treg suprimen la proliferación de células T CD25⁻ estimuladas con anti-CD3 o aloantígeno *in vitro*, o inmunidad alérgica o autoinmunidad, que incluyen la enfermedad de injerto contra huésped *in vivo*.

Por ejemplo:

una cantidad efectiva de las células Treg expandidas *ex vivo* se introduce en el paciente diagnosticado con diabetes mellitus y presenta una indicación de alteración de la homeostasis de glucosa seleccionada de glucosa plasmática en ayunas (FPG), glucosa posprandial (PPG) y tolerancia a la glucosa (GTT) y la introducción proporciona una mejora resultante en la homeostasis alterada de glucosa, en donde la mejora se selecciona preferiblemente de una FPG de 110 mg/dL o menos, una PPG de 2 horas de 140 mg/dL o menos y una GTT de 140 mg/dL o menos 2 horas después de una carga de glucosa de 75 g;

el activador TCR/CD3 es un anticuerpo anti-CD3, y el activador coestimulador TCR es un anticuerpo anti-CD28, en el que los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 están inmovilizados en perlas paramagnéticas proporcionadas en una relación de células Treg: perla de entre 1:1 y 1:2;

5 el activador de TCR/CD3 y las células Treg expandidas son específicas de antígeno, preferiblemente en las que el activador de TCR/CD3 es un multímero de péptido del MHC, en donde el péptido es un péptido autoantígeno asociado a diabetes y el autoantígeno asociado a diabetes se selecciona de ácido glutámico descarboxilasa (GAD), un autoantígeno de las células de islotes (ICA) e insulina, y el activador coestimulador del TCR es un anticuerpo anti-CD28.

10 También se divulgan métodos y composiciones para inmunoterapia celular adoptiva que comprenden la etapa de introducir en un paciente que necesita de los mismos una cantidad eficaz de las células Treg CD4⁺ CD127^{lo/-} o CD4⁺ FoxP3⁺ o células Treg CD127^{lo/-} o FoxP3⁺ expandidas *ex vivo* objetivo. Estos métodos generalmente comprenden las etapas de: extraer una población mixta de células T de una persona; aislar de la población una subpoblación enriquecida en células T reguladoras CD127^{lo/-}; expandir las células T reguladoras de la subpoblación al poner en
15 contacto la subpoblación con cantidades efectivas de (i) un activador de TCR/CD3, (ii) un activador coestimulador de TCR, y (iii) IL-2, para obtener células T reguladoras expandidas *ex vivo*; introducir en un paciente una cantidad eficaz de las células T reguladoras expandidas *ex vivo*; y detectar una supresión resultante de autoinmunidad.

Por ejemplo, la persona y el paciente es un paciente diagnosticado con diabetes mellitus y que presenta una indicación de homeostasis alterada de glucosa seleccionada de glucosa en plasma en ayunas (FPG), glucosa posprandial (PPG) y tolerancia a la glucosa (GTT); la subpoblación comprende > 98% de células Treg; la subpoblación comprende > 98% de células Treg CD4⁺ CD127^{lo/-}; la etapa de aislamiento comprende inmunoselección negativa y positiva y clasificación de células; la etapa de expansión produce al menos una expansión de 100 veces de la subpoblación; el activador de TCR/CD3 se selecciona de un anticuerpo o ligando multivalente para TCR/CD3; el activador coestimulador de TCR es un anticuerpo o ligando multivalente para CD28, GITR, CD5, ICOS, OX40 o CD40L; la cantidad efectiva de IL-2 es de
20 200 a 2.500 UI de IL-2/mL; las células Treg suprimen la proliferación de células T CD25^{sup.} estimuladas con anti-CD3 o aloantígeno, y/o la supresión resultante de autoinmunidad se detecta como una mejora resultante en la homeostasis alterada de glucosa.

30 Por ejemplo:

la mejora se selecciona de una FPG de 110 mg/dL o menos, una PPG de 2 horas de 140 mg/dL o menos y una GTT de 140 mg/dL o menos 2 horas después de una carga de glucosa de 75 g;

35 el activador de TCR/CD3 es un anticuerpo anti-CD3, y el activador coestimulador de TCR es un anticuerpo anti-CD28, en el que los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 están inmovilizados en perlas paramagnéticas proporcionadas en una relación de célula Treg: perla de entre 1:1 y 1:2; y/o el activador de TCR/CD3 es un multímero del péptido de MHC, en el que el péptido es un péptido autoantígeno asociado a diabetes y el autoantígeno asociado a diabetes se selecciona de ácido glutámico descarboxilasa (GAD), un autoantígeno de célula de islote (ICA) e insulina, y el activador coestimulador de TCR es un anticuerpo anti-CD28.

La población de células se puede obtener del sujeto en el que posteriormente se introduce la composición enriquecida con Treg aislada o aislada y expandida. El sujeto puede ser cualquier mamífero en el que se desee la modulación de una reacción autoinmune. Los mamíferos de interés incluyen, pero no están limitados a: roedores, por ejemplo, ratones, ratas; ganado, por ejemplo, cerdos, caballos, vacas, etc., mascotas, por ejemplo, perros, gatos; y primates, por ejemplo, humanos. Por ejemplo, el sujeto es un modelo animal de una enfermedad autoinmune. Existen numerosos modelos animales establecidos para usar epítomos de células T de autoantígenos para inducir tolerancia, que incluyen esclerosis múltiple (EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental), miastenia grave (EMG: miastenia grave experimental) y neuritis (EAN: neuritis autoinmune experimental). El sujeto puede ser un ser humano aquejado de una enfermedad o trastorno autoinmune, tal como cualquiera de las enfermedades/trastornos enumerados en la Tabla A.
45
50

La población de células puede obtenerse de un donante distinto del sujeto. El donante es preferiblemente singénico, pero también puede ser alogénico o incluso xenogénico, siempre que las células obtenidas sean compatibles con el sujeto en el sentido de que pueden introducirse en el sujeto, opcionalmente junto con una terapia inmunosupresora, sin resultar en enfermedad crónica extensa de injerto contra huésped (GvHD). Las células alogénicas del donante son preferiblemente compatibles con el antígeno leucocitario humano (HLA), y se administran típicamente junto con la terapia inmunosupresora. Para volverse compatibles con el sujeto, las células xenogénicas pueden estar sujetas a irradiación gamma o tratamiento con PEN10 (Fast, LD et al., Transfusion, febrero de 2004; 44 (2): 282-5).
55

La etapa de producción puede proporcionar una composición enriquecida de células T reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno predeterminada de dicha población de células, preferiblemente específica para un antígeno o autoantígeno predeterminado asociado con la reacción alérgica o autoinmune dirigida, preferiblemente predeterminada para asociarse con la reacción alérgica o autoinmune dirigida. La etapa de producción puede comprender expandir dichas células T reguladoras específicas de antígeno y/o enriquecer dichas células T reguladoras específicas de autoantígeno de dicha población de células obtenidas.
60
65

Una composición enriquecida en células T reguladoras (Treg) específicas de antígeno o autoantígeno es aquella en la que el porcentaje de células Treg CD127^{lo/-} específicas de antígeno o autoantígeno es mayor que el porcentaje de células Treg CD127^{lo/-} específicas de antígeno o autoantígeno en la población de células originalmente obtenida. Al menos el 75%, 85%, 90%, 95% o 98% de dichas células de la composición pueden ser células T reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno. La etapa de producción puede comprender expandir las células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno, y/o enriquecer dichas células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de autoantígeno de dicha población de células obtenidas. La composición puede enriquecerse adicionalmente mediante selección positiva para biomarcadores CD4 y/o CD25.

Las células T CD127^{lo/-} reguladoras pueden enriquecerse a partir de dicha población de células antes de dicha etapa de expansión, o después de dicha etapa de expansión. Las células Treg CD127^{lo/-} se pueden enriquecer seleccionando marcadores de superficie celular específicos para Treg CD127^{lo/-} inmunosupresoras y separando mediante clasificación automatizada de células tal como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), perlas magnéticas de fase sólida, etc., como es conocido por los expertos en la técnica (véase, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0186207) que se asigna al mismo cesionario de la presente invención. Para mejorar el enriquecimiento, la selección positiva para células T-reg puede combinarse con selección contra células que comprenden los marcadores de superficie específicos para tipos de células no Treg, tal como el agotamiento de células portadoras de CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56 como lo conoce un experto en la técnica.

La expansión se puede lograr poniendo en contacto la población de células con una composición estimulante de células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno. Las células T CD127 reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno se expanden preferiblemente al menos 50 veces, y preferiblemente al menos 100, 200, 300, 500 y 800 veces. Las composiciones estimulantes de células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno promueven la supervivencia, crecimiento y/o expansión de las células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas del antígeno o autoantígeno que expresan un receptor o receptores de células T que reconocen el antígeno o autoantígeno deseado.

Las composiciones estimuladoras preferidas estimulan las células T CD127^{lo/-} mediante la unión específica al antígeno y la activación del complejo receptor de células T. Se puede usar una variedad de reactivos de unión a TCR específicos de antígeno, que incluyen moléculas de MHC unidas a péptido entrecruzado, anticuerpos y miméticos. Las composiciones pueden comprender un complejo de MHC clase I/péptido autoantigénico, particularmente un agregado de tales complejos MHC/péptido. Estos complejos comprenden al menos el dominio de unión al péptido extracelular de una molécula MHC clase II en la que está unido funcionalmente un péptido autoantigénico. Los complejos pueden estar en solución o suspensión o inmovilizados en un sustrato, tal como se presentan en la superficie de una célula, particularmente una APC. Se conocen numerosos métodos aplicables en la técnica para generar complejos MHC clase I/péptido funcionales, tales como los que se pueden encontrar en la literatura. El péptido autoantigénico puede ser un péptido del autoantígeno natural que es capaz de formar un complejo con una molécula MHC clase II. Los ejemplos de complejos de moléculas MHC clase II/péptido se enumeran en la Tabla A. El péptido autoantigénico puede ser un péptido mimótopo capaz de formar un complejo con una molécula de MHC clase II.

El péptido autoantigénico puede ser un péptido mimótopo que es capaz de formar un complejo con una molécula de MHC clase II. Los péptidos mimótopos se describen en la literatura, más adelante, y en el Ejemplo 1. Los protocolos para el uso de los péptidos autoantígenos para expandir células Treg de otras células T convencionales incluyen el uso de tetrámeros del péptido MHC específico de autoantígeno, DC pulsadas con péptidos (Yamazaki, et al., 2003, J Exp Med 198: 235-47) o APC artificiales (Maus et al., Nat. Biotechnol., 20: 143-8, 2002) para expandir Treg de pacientes independientes del fenotipo de la superficie celular. Además, una combinación de enfoques *in vitro* e *in vivo* puede mejorar los efectos de la terapia. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que la administración de autoantígenos, ligandos peptídicos alterados e incluso estímulos no específicos tales como mAb anti CD3 que no se unen a FcR pueden promover la actividad de Treg específica de antígeno (Apostolou et al., J. Exp. Med. 199: 1401-8, 2003; Belghith et al., Nat. Med. 9: 1202-8, 2003). Por lo tanto, puede ser ventajoso combinar la inmunización *in vivo* para inducir las Treg con expansión *ex vivo* o viceversa.

La composición estimulante puede incluir adicionalmente uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un agente coestimulador, un segundo agente estimulador de células T reguladoras, o agentes que generalmente promueven la supervivencia y/o el crecimiento de células T.

El agente coestimulador es un anticuerpo o ligando específico para un coestimulador de TCR, tal como CD28 o GITR, como se describe a continuación. El agente coestimulador puede ser un anticuerpo agonista, tal como un anticuerpo agonista que se une a CD28.

La composición estimuladora alternativamente comprende un segundo agente estimulador de células T reguladoras. Los ejemplos de agentes estimuladores incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos, interleuquinas tales como IL-2, IL-6, IL-7, IL-13 e IL-15, y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El segundo agente estimulante puede ser una citoquina, tal como una interleuquina, tal como interleuquina 2.

Uno o más componentes de la composición estimuladora se pueden inmovilizar sobre un sustrato, tal como una célula o

perla. Las células adecuadas para uso como sustratos incluyen células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) (Kim, JV et al., Nat Biotechnol, abril de 2004; 22 (4): 403-10, y Thomas, AK et al., Clin Immunol, diciembre de 2002; 105 (3): 259-72). Las perlas pueden ser de plástico, vidrio o cualquier otro material adecuado, generalmente en el rango de 1-20 micras. Se prefieren perlas paramagnéticas.

5

Las concentraciones óptimas de cada componente de las composiciones estimuladoras, las condiciones de cultivo y la duración se pueden determinar empíricamente usando experimentación rutinaria.

10

Las células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno expandidas y/o enriquecidas se introducen en el sujeto para modular una reacción inmune o autoinmune. Por ejemplo, el sujeto puede estar afectado por una enfermedad o trastorno caracterizado por tener una reacción autoinmune continua o recurrente, tal como las enfermedades/trastornos enumerados en la Tabla A. Dicha modulación puede comprender inhibición. Las Treg CD127^{lo/-} pueden servir como un "caballo de Troya" para administrar factores supresores u otros factores biológicos a los sitios de inflamación, tales como IL-4 (Yamamoto et al., J. Immunol., 166: 4973-80, 2001), factores de crecimiento de células madre, reguladores de angiogénesis, deficiencias genéticas, etc. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de foxp3 transforma células T patógenas en Treg (Jaeckel et al., Diabetes, 10 de diciembre de 2004; [Epub]) y Treg policlonalmente expandidas pueden transducirse con genes que codifican una TCR específica de antígeno más FoxP3 para generar Treg potentes específicas de antígeno en números y eficacia muy altos (Mekala, et al., Blood, 4 de noviembre de 2004; [Epub]). Por lo tanto, estos enfoques específicos de antígeno disminuyen el requisito de altos números de células mientras maximizan la especificidad y función de Treg.

15

20

25

Las Treg CD127^{lo/-} específicas de antígeno están particularmente indicadas en enfermedades infecciosas en las que la patogenicidad de las infecciones no es resultado de los efectos citopáticos del agente patógeno, sino más bien del daño tisular causado por la respuesta inmunoinflamatoria a los agentes infecciosos. En enfermedades, tales como hepatitis C o inflamación corneal inducida por HSV, la terapia con Treg CD4⁺ CD127^{lo/-} proporciona una oportunidad única para controlar la enfermedad inmunoinflamatoria inducida por virus (Suvas et al., J. Immunol., 172: 4123-4132, 2004). Se sabe que los virus, tales como el Coxsackie, causan pancreatitis y se han asociado con el desarrollo de diabetes tipo 1. Por lo tanto, las Treg CD127^{lo/-} que dirigen los antígenos virales expresados pueden usarse para suprimir el daño tisular local causado por la infección y reducir la inflamación que incita el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

30

35

También se divulgan composiciones que comprenden una población de células en la que al menos el 50% de dichas células de dicha composición son células naturales (no transformadas), preferiblemente células Treg CD127^{lo/-} específicas de antígeno o autoantígeno, en las que la especificidad del antígeno o autoantígeno está preferiblemente predeterminada, preferiblemente predeterminada para un antígeno de reacción inmune o autoinmune dirigida. Las composiciones se preparan mediante los métodos descritos en este documento. El porcentaje de las células Treg de CD127^{lo/-} reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno en la composición se pueden determinar usando la metodología descrita en los Ejemplos. Preferiblemente, al menos el 75%, 85%, 90%, 95% o 98% de dichas células de la composición son células T reguladoras específicas de antígeno o autoantígeno.

40

Además, las células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de autoantígeno pueden ser específicas para un complejo de molécula de MHC clase II/péptido enumerado en la Tabla A.

45

Las células T CD127^{lo/-} reguladoras específicas de autoantígeno pueden ser eficaces para modular una reacción autoinmune cuando se administran a un sujeto. Las dosificaciones efectivas y optimizadas y los regímenes de tratamiento que usan las células reguladoras específicas de autoantígeno expandidas y/o enriquecidas se informan a partir de una vasta experiencia clínica con terapias de infusión de células T existentes, y se pueden determinar adicionalmente de forma empírica.

50

55

60

Los métodos encuentran uso en el tratamiento de una variedad de afecciones diferentes en las que se desea la modulación de una respuesta inmune aberrante en el huésped. Por respuesta inmune aberrante en un huésped se entiende cualquier reacción inmune en un sujeto caracterizado como una respuesta inmune o autoinmune no deseada (por ejemplo, una enfermedad autoinmune). En general, las respuestas autoinmunes ocurren cuando el sistema inmune de un sujeto reconoce autoantígenos como extraños, lo que conduce a la producción de células inmunes efectoras autorreactivas. Las células inmunes efectoras autorreactivas incluyen células de una variedad de linajes, que incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas, células T adyuvante y células B. Si bien los mecanismos precisos difieren, la presencia de células inmunes efectoras autorreactivas en un huésped que padece una enfermedad autoinmune conduce a la destrucción de los tejidos y las células del huésped, dando como resultado síntomas patológicos. Numerosos ensayos para determinar la presencia de tales células en un huésped, y por lo tanto la presencia de una enfermedad autoinmune, tal como una enfermedad autoinmune específica de antígeno en un huésped, son conocidas por los expertos en la técnica y se emplean fácilmente en los métodos objetivo. Los ensayos de interés incluyen, pero no se limitan a, los descritos en: Autoimmunity. Septiembre-noviembre de 2003; 36 (6-7): 361-6; J Pediatr Hematol Oncol. Diciembre de 2003; Suppl 25 1: S57-61; Proteomics. Noviembre de 2003; 3 (11): 2077-84; Autoimmun Rev. Enero de 2003; 2 (1): 43-9.

65

Por tratamiento se entiende que se logra al menos una mejora de los síntomas asociados con la respuesta inmune aberrante en el huésped, donde la mejora se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la

magnitud de un parámetro, por ejemplo, síntoma, asociado con la condición que se está tratando. Como tal, el tratamiento también incluye situaciones en las que el estado patológico, o al menos los síntomas asociados con el mismo, están completamente inhibidos, por ejemplo, evitar que se presenten o detenerlos, por ejemplo, terminarlos, de tal manera que el huésped ya no sufre de la condición, o al menos los síntomas que caracterizan la condición.

5 Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición o población de células es una cantidad que es suficiente para tratar o mejorar la condición del sujeto.

10 Una variedad de huéspedes son tratables de acuerdo con los métodos objetivo. En ciertas realizaciones, dichos huéspedes son "mamíferos", donde este término se usa ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase mamífera, incluidos los órdenes carnívoro (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, conejillos de indias y ratas) y primates (por ejemplo, humanos, chimpancés y monos). En realizaciones preferidas, los huéspedes serán humanos.

15 Los métodos pueden incluir una etapa de diagnóstico de la presencia de una enfermedad autoinmune a tratar. Por diagnóstico se entiende que la respuesta autoinmune de un sujeto generalmente se clasifica, por ejemplo, diabetes mellitus, SLE, MS, etc. Además, se puede identificar al menos un autoantígeno al que se dirige la respuesta inmune aberrante.

20 También se divulgan reactivos y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos y kits de los mismos pueden variar mucho. Los kits pueden incluir al menos un anticuerpo CD127 y una composición estimulante de células T reguladoras específicas de antígeno. El kit puede incluir otro agente estimulante de células T reguladoras, tal como una citoquina, tal como una interleuquina, tal como interleuquina 2 o interleuquina 15. Los kits pueden incluir además reactivos para realizar la etapa de expansión de células T reguladoras específicas del antígeno, incluyendo placas o matraces de cultivo, medio de cultivo o cualquier regulador, factor necesario, etc. Los kits pueden incluir los medios para recolectar la muestra que contiene las células T reguladoras y los reactivos necesarios para realizar el enriquecimiento/purificación de las células T reguladoras. El anticuerpo puede estar marcado o el kit puede proporcionar reactivos para marcar el anticuerpo. Los kits pueden comprender además un anticuerpo CD4 y/o CD25 y, opcionalmente, seleccionar células que son CD127^{lo/-}, CD4⁺.

30 Además de los componentes anteriores, los kits incluirán además instrucciones para practicar los métodos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel en los que se imprime la información, en el empaque del kit, en un prospecto del empaque, etc. Otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., sobre el cual se ha grabado la información. Otro medio que puede estar presente es la dirección de un sitio web que puede usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

40 El agente estimulador puede ser un complejo MHC clase I/péptido autoantigénico. Los ejemplos de complejos de molécula MHC clase II/péptido se enumeran en la Tabla A. El agente estimulador puede ser un antígeno que provoca una respuesta inmune no deseada en el sujeto o paciente.

45 El agente coestimulador puede ser un anticuerpo o ligando específico para un coestimulador de TCR, tal como CD28 o GITR, como se divulga a continuación. El agente coestimulador puede ser un anticuerpo agonista, tal como un anticuerpo que se une a CD28. El agente estimulador y dicho agente coestimulador se pueden inmovilizar sobre un sustrato, tal como una célula o perla.

50 También se divulgan métodos y composiciones para la expansión *ex vivo* de células T CD127^{lo/-} reguladoras terapéuticas y/o el uso de tales células Treg expandidas para inmunoterapia celular adoptiva para suprimir la autoinmunidad.

55 Los métodos de expansión generalmente comprenden primero extraer una población mixta de células T de una persona o paciente, y aislar de la población una subpoblación enriquecida en células Treg CD127^{lo/-}. Para maximizar la eficacia, la subpoblación se enriquece hasta al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, y más preferiblemente al menos 98% de células Treg CD127^{lo/-}. Por lo general, las células se enriquecen seleccionando marcadores de superficie celular específicos para Treg CD127^{lo/-} inmunosupresoras y separándolos mediante clasificación celular automatizada tal como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), perlas magnéticas en fase sólida, etc. Para mejorar el enriquecimiento, la selección positiva se puede combinar con selección negativa contra células que comprenden marcadores de superficie específicos para tipos de células no Treg, tal como mediante el agotamiento de células portadoras de CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56, y como se ejemplifica a continuación.

60 La subpoblación enriquecida con Treg CD127^{lo/-} se expande luego *ex vivo* cultivando las células en presencia de cantidades efectivas de un activador de TCR/CD3, un activador coestimulador de TCR e IL-2. El activador de TCR/CD3 se selecciona de un anticuerpo o ligando multivalente para TCR/CD3, que incluye activadores no específicos de antígeno, como un anticuerpo anti-CD3, y activadores específicos de antígeno, tales como un multímero de péptido de

MHC (véase, por ejemplo, Yee, et al., Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. Proc Natl Acad Sci USA, diciembre 10, 2002; 99(25): 16168-16173; Butterfield, et al., T-Cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from a-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer, Clin. Cancer Res., diciembre 1, de 2003; 9(16): 5902-5908; y Yee, et al., Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers, J Immunol, 1999, 162: 2227-223), en el que el péptido típicamente es un péptido asociado a una enfermedad autoinmune, tal como un péptido autoantígeno asociado a la diabetes en donde los autoantígenos adecuados asociados a diabetes incluyen ácido glutámico descarboxilasa (GAD), un autoantígeno de célula de islote (ICA) e insulina, en donde también se pueden usar combinaciones de tales péptidos.

El activador coestimulador puede ser un anticuerpo o ligando multivalente específico para un coestimulador de TCR, preferiblemente CD28 o GITR (Shimizu et al., Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance, Nat Immunol. Febrero de 2002; 3(2): 135-42. Epub, enero 22 de 2002; Tone et al., Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells, Proc Natl Acad Sci USA. Diciembre 9 de 2003; 100(25): 15059-64. Epub, noviembre 07 de 2003), aunque los coestimuladores de TCR alternativos tales como CD5, ICOS, OX40 y CD40L también pueden ser dirigidos cuando se obtiene una expansión adecuada, como puede determinarse empíricamente. Para promover la activación y expansión, los activadores coestimuladores de TCR/CD3 y TCR se pueden inmovilizar típicamente en una superficie sólida tridimensional, tal como una célula huésped (por ejemplo, Thomas et al., diciembre de 2002, Clin Immunol 105, 259-72) o perla. Los activadores se pueden inmovilizar sobre perlas paramagnéticas proporcionadas en una relación de células Treg: perla de entre 2:1 y 1:5, preferiblemente entre 1:1 y 1:3. El tamaño óptimo de la perla se puede determinar empíricamente, aunque típicamente el tamaño cae en el intervalo de 1 a 20 micras de diámetro.

La IL-2 se presenta típicamente en forma recombinante, en la que las cantidades efectivas de IL-2 pueden ser típicamente de 200 a 2.500 UI de IL-2/mL. Las expansiones máximas se determinan empíricamente y variarán según el tipo de célula, las condiciones de incubación, etc. Las expansiones máximas pueden ser de aproximadamente 300, 500 y 800 veces.

La función supresora de las células Treg CD127^{lo/-} expandidas puede ser detectada *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, *in vitro*, las células Treg CD127^{lo/-} expandidas pueden mostrar que suprimen la proliferación de células T CD25⁻ estimuladas con anti-CD3 en presencia de células portadoras de receptores Fc, o Células T CD25⁻ estimuladas con esplenocitos alogénicos irradiados. Un ejemplo adecuado de modelo animal *in vivo* y protocolos de inmunosupresión clínica humana se describen en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0186207.

El activador TCR/CD3 y las células Treg CD127^{lo/-} expandidas pueden ser específicas de autoantígeno. Por ejemplo, se introdujo una cantidad eficaz de las células Treg CD127^{lo/-} expandidas *ex vivo* en el paciente diagnosticado con diabetes mellitus (véase, por ejemplo, Mayfield et al., Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria, Am Fam Physician. Octubre 15 de 1998; 58 (6): 1355-62, 1369-70) y que presenta una indicación de homeostasis alterada de glucosa, tal como glucosa en plasma en ayunas (FPG), glucosa posprandial (PPG) y tolerancia a la glucosa (GTT) proporcionando una mejora resultante en la homeostasis alterada de glucosa, particularmente cuando la mejora se selecciona de una FPG de 110 mg/dL o menos, una PPG de 2 horas de 140 mg/dL o menos y una GTT de 140 mg/dL o menos, 2 horas después de una carga de glucosa de 75 g.

Por consiguiente, se divulgan métodos y composiciones para inmunoterapia celular adoptiva que comprenden introducir en un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de células Treg CD127^{lo/-} expandidas *ex vivo* objetivo. Estas aplicaciones generalmente implican la reintroducción de células Treg CD127^{lo/-} expandidas extraídas del mismo paciente, aunque los métodos también son aplicables a la inmunoterapia celular adoptiva para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped asociada con el trasplante, particularmente el trasplante de médula ósea usando células Treg CD127^{lo/-} derivadas del tejido del donante.

La transferencia adoptiva de células Treg CD127^{lo/-} expandidas como se divulga aquí puede ser efectiva para suprimir una amplia variedad de respuestas autoinmunes patógenas, incluyendo diabetes, GVHD, lupus, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad cardíaca degenerativa (por ejemplo, Ziad Mallat, et al., Induction of a Regulatory T Cell Type 1 Response Reduces the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein EBKnockout Mice, Circulation. Septiembre 9 de 2003; 108 (10): 1232-7), enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn), etc.

En los protocolos de transferencia de células adoptivas, una población mixta de células T se extrae inicialmente de un donante objetivo. Dependiendo de la aplicación, las células T pueden extraerse durante un período de remisión o durante una enfermedad activa. Por lo general, esto se hace retirando sangre entera y recolectando granulocitos mediante leucaféresis (leucoféresis). Por ejemplo, se ha demostrado que la leucoféresis de gran volumen (LVL) maximiza el rendimiento de leucocitos en sangre. Las recolecciones alcanzan 20x.10⁶ células/L usando un dispositivo de aféresis de flujo continuo (Spectra, COBE BCT). Los síntomas de la hipocalcemia se evitan mediante una infusión continua de calcio administrado a través de la leucoféresis. Típicamente, 15-45 litros de fluido correspondientes a aproximadamente 4 volúmenes de sangre totales se recogen durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 100 a 300 minutos.

Los linfocitos recogidos se separan por citometría de flujo u otras técnicas de separación celular basadas en marcadores celulares específicos de Treg tales como CD127 y se expanden como se describió en este documento, y luego se transfunden a un paciente, típicamente el donante de células (excepto en GVHD donde el donante y el receptor son diferentes), por inmunosupresión adoptiva. Alternativamente, las células pueden congelarse para su almacenamiento y/o transporte antes y/o después de la expansión. En algunas realizaciones para expansiones no específicas de antígeno, se transfunden aproximadamente 10^9 a 10^{11} Treg; para expansiones específicas de antígeno, las transfusiones terapéuticamente efectivas típicamente pueden usar de aproximadamente 10^7 a 10^9 células Treg.

Método de clasificación de células

Los biomarcadores usados para la selección positiva o negativa de las células T reguladoras de la presente invención se pueden identificar mediante técnicas de inmunoselección conocidas por los expertos en la técnica que utilizan anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), clasificación magnética de células, peneo y cromatografía. La inmunoselección de dos o más marcadores en células T activadas puede realizarse en una o más etapas, en las que cada etapa selecciona positiva o negativamente uno o más marcadores. Cuando se realiza la inmunoselección de dos o más marcadores en una etapa usando FACS, los dos o más anticuerpos diferentes pueden marcarse con diferentes fluoróforos.

Los métodos de clasificación de células son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los clasificadores de células generalmente son capaces de separar una mezcla compleja de células en fracciones de un solo tipo de célula. Típicamente, las células a clasificar se introducen como un chorro delgado de líquido portador que emana de un orificio de boquilla pequeño. Poco después de abandonar la boquilla, el fluido pasa a través de la parte central de uno o más haces de láser bien enfocados. La luz dispersa y de fluorescencia de estas interacciones se puede recoger y analizar para determinar si hay eventos (por ejemplo, la presencia de una señal de fluorescencia que indique que un anticuerpo monoclonal marcado con fluoróforo está unido a la superficie de una célula) que promueve la clasificación de la célula por varios medios. Se puede controlar más de un marcador a la vez. FACS (clasificadores de células activadas por fluorescencia) puede analizar fácilmente las células a velocidades superiores a 200.000 eventos por segundo. En general, la física del fluido portador, sin embargo, y las estadísticas de distribución de las células entre las gotitas limitan las tasas de clasificación a aproximadamente 50.000 células por segundo. Esta combinación de velocidad y separación confiable permite aislar células individuales para otros usos.

La clasificación magnética de células se puede realizar usando microperlas superparamagnéticas compuestas de óxido de hierro y un revestimiento de polisacárido. Preferiblemente, las microperlas pueden tener aproximadamente 50 nanómetros de diámetro, y tienen un volumen aproximadamente una millonésima del de una célula típica de mamífero. Las microperlas son preferiblemente lo suficientemente pequeñas para permanecer en suspensión coloidal, lo que permite una unión rápida y eficiente a los antígenos de la superficie celular. Las microperlas preferiblemente no interfieren con la citometría de flujo, son biodegradables y tienen efectos insignificantes sobre las funciones celulares. El acoplamiento del anticuerpo a las microperlas puede ser directo o indirecto, a través de un segundo anticuerpo a un ligando tal como fluoresceína.

Métodos de administración de las poblaciones de células aisladas y expandidas y aisladas.

Las células se pueden administrar de varias formas. A modo de ejemplo no limitante, las células pueden administrarse por vía intravenosa, o en una cavidad corporal adyacente a la ubicación de una respuesta inmune a suprimir, tal como la cavidad intraperitoneal, o pueden inyectarse directamente dentro o adyacentes al sitio de la reacción inmune. La administración intravenosa, por ejemplo, es ventajosa en el tratamiento de muchas de tales afecciones.

Los medicamentos y las composiciones farmacéuticas se pueden formular usando vehículos parenterales farmacéuticamente aceptables convencionales para la administración por inyección. Estos vehículos pueden ser no tóxicos y terapéuticos, y varias formulaciones se exponen en Remington's Pharmaceutical Sciences. Ejemplos no limitantes de excipientes son solución salina, solución de Ringer, solución salina y dextrosa y solución salina equilibrada de Hank. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener cantidades menores de aditivos tales como sustancias que mantienen la isotonicidad, el pH fisiológico y la estabilidad.

Los medicamentos y composiciones pueden estar en formato de dosis unitaria. Generalmente, la dosis unitaria contendrá una cantidad terapéuticamente efectiva de células T reguladoras CD127^{lo/-}. La cantidad generalmente dependerá de la edad, tamaño, sexo del paciente, la condición que se va a tratar y su gravedad, la condición de las células y sus características originales, tal como se obtuvieron del donante de la muestra. Los expertos en la técnica conocen métodos para valorar las dosis para identificar aquellas que son terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células puede ser de 10^7 a 10^{11} .

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar la invención y los métodos usados en la práctica de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Anticuerpos

Anticuerpos humanos: anti-CD127 conjugado con PE, anti-CD25 conjugado con APC, anti-CD4 conjugado con PerCP usados para tinción y en la clasificación fueron proporcionado por Becton-Dickenson (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se adquirió anti-FoxP3 conjugado con Alexa488 a través de BioLegend (San Diego, CA) y se realizó la tinción intracelular de acuerdo con las instrucciones del fabricante modificado de la siguiente manera: se tiñeron 5×10^5 células con marcadores de superficie celular durante 30 min a 4°C y se fijaron durante 30 min usando regulador 1x Fix/Perm. Después de 3 lavados, las células se permeabilizaron en regulador Perm con DNasa I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 minutos, seguido de 3 lavados. A continuación, las células se bloquearon con IgG humana y se tiñeron con FoxP3-Alexa488 antihumano conjugado (BioLegend, San Diego, CA. clon 206D). Los siguientes anticuerpos anti-ratón se adquirieron de las fuentes indicadas: anti-CD4, anti-CD25 e IgG₁ de ratón (control de isotipo) (BD Pharmingen, San Diego, CA); y anti-IL-7R (eBioscience, San Diego, CA).

Ejemplo 2. Sujetos

Se estudiaron un total de 16 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 de larga evolución. Los pacientes (intervalo de edad 16-56 años, edad media 34, con una duración de la enfermedad de más de 5 años) fueron reclutados del Centro Bárbara Davis para la Diabetes Infantil, Denver, CO, Estados Unidos. El diagnóstico de diabetes tipo 1 se realizó principalmente por la presencia de autoanticuerpos bioquímicos o la presentación de hiperglucemia con cetosis en la infancia. Ninguno de los sujetos diabéticos tenía nefropatía grave o neuropatía. Como controles, 10 sujetos (ranintervalogo de edad 20-50 años, edad media 29) sin antecedentes familiares de diabetes mellitus también fueron evaluados. Se obtuvieron muestras de sangre con consentimiento informado bajo los protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Colorado o UCSF, según sea necesario.

Ejemplo 3. Clasificación de subconjuntos de células T CD4⁺ por citometría de flujo y estudios funcionales.

Se aislaron células T humanas de leucopax (Blood Centers of the Pacific). En algunos casos, se realizó una selección negativa usando un cóctel de agotamiento de CD3 humano RosetteSep (Stemcell Technologies, Seattle, WA). Se lavaron $100-120 \times 10^6$ células PBMC una vez, se contaron y se resuspendieron en regulador de clasificación (PBS + BSA al 0,1% + EDTA 1 mM) a 100×10^6 por mL en un tubo cónico de 15 mL. Después de la adición de un volumen de $1 \mu\text{L}/1$ millón de células conjugadas con anti-CD4 conjugado con PerCP, $1 \mu\text{L}/1$ millón de células anti-CD127 conjugadas con PE y $0,7 \mu\text{L}/1$ millón de células con anticuerpos antiCD25 conjugadas con APC, la suspensión celular se mezcló suavemente y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Se añadió regulador frío de clasificación FACS hasta un volumen de 15 mL, se sedimentaron las células T y se resuspendieron a razón de 20×10^6 por mL. Las células T marcadas se clasificaron usando un clasificador de células de alta velocidad Aria. Las puertas de clasificación para los diversos subconjuntos de células T se establecieron para incluir solo aquellos eventos que exhiben fluorescencia específica de CD4 que también estaban dentro de la región de densidad más baja de una gráfica de dispersión. Esto representó entre 11,4% y 33,9% (promedio 20,87%) ($n = 22$) del número total de eventos para las células T CD4⁺. Con base en el cuadrante de CD4, las células se bloquearon adicionalmente con base en la expresión de CD127 y/o CD25 (CD4⁺ CD127^{+/+} CD25^{+/+} y CD4⁺ CD127^{+/+} solas independientemente de CD25 así como Treg convencionales CD25^{hi}). Las células se recogieron en suero AB humano al 100% (Cambrex, Walkersville, MD) y se lavaron una vez con medio (RPMI/suero humano al 5%) hasta que estuvieron listas para ser sembradas en placa en un ensayo de supresión. Las Treg clasificados fueron 95-98% de CD4⁺ CD25^{hi} con un rendimiento típico de $5-12 \times 10^5$ células T por clase, mientras que las células CD4⁺ CD127⁺ CD25⁺ tuvieron un rendimiento típico de $0,9-1,2 \times 10^6$ y 98% de pureza.

Ejemplo 4 Aislamiento de células CD4⁺ CD25^{hi} y CD4⁺ CD25^{neg} para matrices GeneChip.

Se aislaron células T CD4⁺ humanas mediante selección negativa de Leukopacks (Stanford University Blood Center) usando cóctel de células T CD4⁺ humanas RosetteSep (Stemcell Technologies, Seattle, WA). Se lavaron una vez $7,5-1,25 \times 10^8$ células T CD4⁺ (> 90% de pureza por FACS), se contaron y se resuspendieron en regulador de tinción FACS (PBS + BSA al 0,1%) a razón de 10×10^6 por mL en un tubo cónico de 50 mL. Después de la adición de $1/90$ de volumen de anticuerpos anti-CD4 conjugados con Cy-5 (BD Pharmingen) y $1/100$ de anticuerpos anti-CD25 conjugado con FITC (DakoCytomation, Chicago, IL), la suspensión celular se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 45 min. Se añadió regulador de tinción FACS frío a un volumen de 50 mL, se sedimentaron las células T y se resuspendieron a razón de 20×10^6 por mL. Las células T marcadas se incubaron en hielo durante 45 minutos y luego se sometieron a una clasificación de flujo en un clasificador de células de alta velocidad DakoCytomation MoFlo. Las cuadrantes de clasificación se configuraron para incluir solo aquellos eventos que exhiben los niveles más altos de fluorescencia específica de CD25 (células CD4⁺ CD25^{hi}) o los niveles más bajos (células CD4⁺ CD25^{neg}) que también estaban dentro de la más baja región de densidad de un gráfico de dispersión. Esto ascendió hasta entre 0,8% y 1,4% del número total de eventos para las células T CD4⁺ para cada subconjunto.

Ejemplo 5. Aislamiento de ARN

Se aisló ARN total de Treg usando el protocolo de aislamiento de ARN total del kit Miniprep RT-PCR de ARN (Stratagene, La Jolla, CA) con las siguientes modificaciones: se lisaron 100.000 células en $150 \mu\text{L}$ de regulador de lisis. Para digerir el ADN, se añadieron dos unidades de DNasa/ μg de ácido nucleico, y se usó Fenol/ CHCl_3 (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO) para purificar el ARN total seguido de precipitación con etanol. La cantidad de ARN total se midió usando Nanodrop ND 100 (Nanodrop Technologies, Rockland, DE). Se usaron 100 ng de cada muestra de ARN para el marcado del objetivo mediante un protocolo de amplificación de dos rondas. Este protocolo se modificó a partir de la preparación de muestras pequeñas eucarióticas Affymetrix utilizando 6 pMol de cebador T7 y 3 µg/µL del cebador aleatorio.

Ejemplo 6. Matrices GeneChip y análisis de datos.

Se usaron un total de 16 matrices GeneChip HG-U133A humanas en este estudio (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se procesaron 10 µg de ARNc fragmentado por hibridación de GeneChip en la estación 450 de Affymetrix Fluidic (Affymetrix, Santa Clara, CA) y el escáner de GeneChip GCS2500 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA). El perfil de expresión génica se analizó con MAS5.0 (Microarray Suite versión 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA)) y se utilizó para la adquisición de datos y la normalización. Los genes presentes se definieron seleccionando los genes que estaban presentes en 3 de 4 arreglos. Las intensidades de señal de todos los genes presente para los grupos activados y de control se combinaron y analizaron mediante prueba T. Se seleccionaron genes significativos con $p < 0,05$. La llamada "relación logarítmica de señal" (SLR) y "Aumento" o "Disminución" se generaron mediante el análisis de comparación MAS5.0 y luego se usó para calcular los cambios entre los grupos. Se seleccionaron 9 de 16 comparaciones por pares para genes particulares que mostraron un aumento o disminución en las veces que cambia > 2.0 . En la segunda etapa, se analizaron las intensidades de señal de los genes presentes con análisis de significancia de microarreglos (SAM) para analizar y determinar la lista de genes basada en el número de genes significativos que se identificaron mediante prueba T y veces que cambia. Los genes significativos finales se combinaron a partir de las dos etapas anteriores. Las agrupaciones jerárquicas bidimensionales se generan utilizando el software GeneSpring 6.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA).

Ejemplo 7. Análisis de PCR en tiempo real.

El ARN se aisló usando mini kits RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc, se transcribieron 500 ng de ARN total con reactivos de transcripción de ADNc usando transcriptasa inversa SuperScriptIII y oligo (dT) 12-18 (Invitrogen, Inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión génica se midió en tiempo real con el sistema de detección de secuencia GeneAmp 7900 (Applied Biosystems) utilizando cebadores y el kit de PCR QuantiTect SYBR Green adquirido a través de Qiagen. El nivel de expresión de un gen en una muestra dada se representó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{(experimental)}] - [\Delta Ct_{(medio)}]$ y $\Delta Ct = [Ct_{(experimental)}] - [Ct_{(mantenimiento)}]$. Los datos se presentan normalizados para la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADP).

Ejemplo 8. Ensayos de supresión.

Se realizaron ensayos de supresión en placas de microtitulación de 96 pozos de fondo redondo. Se añadieron 100.000 PBMC respondedoras de la misma fuente celular que las poblaciones clasificadas, 30.000 células clasificadas (uno de 7 subtipos clasificados diferentes basados en la expresión de CD25 y/o CD127), 100.000 PBMC alogénicas irradiadas sin CD3 como se indicó. La relación de respondedores indicada se refiere a las Treg con respecto al respondedor donde 1:1 de clasificadas: respondedoras es de 30.000 células clasificadas: 100.000 células respondedores PBMC. La APC consistió en PBMC alogénicas sin células T usando el agotamiento de células T CD3+ humanas StemSep de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (StemCell Technologies, Seattle, WA) e irradiadas con 40 Gy. Las células se sembraron en pacas en el siguiente orden en 50 µL por pozo: células clasificadas, respondedores, APC. No se añadió ningún estímulo adicional a los pozos, sin embargo, se añadieron medios adicionales a cada pozo, hasta un volumen final de 200 µL por pozo. Los pozos que rodean a los pozos de cultivo se llenaron con PBS para evitar la evaporación. Las células T se incubaron durante 7 días a 37°C en 5% de CO₂. Dieciséis horas antes del final de la incubación, se añadió 1 uCi de ³H-timidina a cada pozo. Las placas se cosecharon usando una cosechadora de células Tomtec y se determinó la incorporación de ³H-timidina usando un contador de centelleo líquido, Wallac 1450 MicroBeta Trilux.

Ejemplo 9. Tinción de anticuerpos y análisis FACS.

Se lavaron 5×10^4 células T por muestra una vez con regulador de tinción FACS (PBS + BSA al 0,1%) y se resuspendieron en 100 µL de regulador. Se añadió 1 µL de anticuerpos específicos conjugados con fluorescencia (1 µg/millón de células T), las células T se sometieron a agitación tipo vórtice ligeramente y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Se añadieron 500 µL de regulador de tinción a cada muestra, se sedimentaron las células T y se resuspendieron en 200 µL de regulador y se analizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, FACScalibur). Se realizó tinción intracelular usando el procedimiento recomendado de BD Pharmingen o eBioscience donde se indique.

Ejemplo 10. Inmunoprecipitación de cromatina - microarreglo de ADN (ChIP-chip).

Se expandieron las células Treg CD4⁺CD25^h humanas *in vitro* tal como se describió previamente (37). La fijación de cromatina y la inmunoprecipitación se realizaron usando el kit de ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (Upstate Biotechnology, Inc.) según lo recomendado por el fabricante. Las Treg humanas expandidas se fijaron en formaldehído al 1,1%. Se resuspendieron los sedimentos celulares de proteína-ADN entrecruzados en regulador de lisis SDS (1 mL

por 1×10^8 células) y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Los lisados se sometieron a ultrasonido para cortar el ADN hasta longitudes de entre 200 y 1.000 pares de bases y se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C para eliminar los residuos. El sobrenadante celular sonificado se diluyó 10 veces en regulador de dilución ChIP con inhibidores de proteasa (Upstate Biotechnology, Inc.) para reducir el fondo no específico, el sobrenadante celular diluido se eliminó previamente con 40 μ L de una suspensión al 50% de Proteína A-Agarosa por 1 mL de lisado durante 30 minutos a 4°C con agitación. Los complejos de proteína/ADN entrecruzados se inmunoprecipitaron usando Ig de conejo de control o FoxP3 antihumano policlonal de conejo purificado por afinidad (un obsequio generoso de Roli Khattri y Fred Ramsdell, Celltech, Lt. Seattle, WA). El entrecruzamiento del material se invirtió y se trató con proteinasa K para remover la proteína del ADN. El ADN restante se purificó con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, 28106) y se amplificó mediante LMPCR (PCR mediada por ligación) como se describió previamente (49). La hibridación y el análisis del arreglo se realizaron con Affymetrix como se describió previamente (50). Se llevó a cabo qPCR con SYBR Green para verificar los sitios de unión predichos por las arreglos. Los cebadores para las reacciones de PCR incluyeron: promotor IL-7R: 5'-cebador, CAGGGAATATCCAGGAGGAA; 3'-cebador, TGTGTGAGCCAGTGTGTATGAA; IL-7R 2K secuencia arriba: 5'-cebador, TTTGGGATTTCTCCTTGAACA; 3'-cebador TCTCTGGGCATTTCAAAC; IL-7R intrón 4: 5'-cebador, GAGGTGGCAGAAGAGTGGAG; 3'-cebador, TGCATCACACTGCAAACAAA; IL7-R intrón 7 y exón 8: 5'-cebador, ACATGCTGGCAATTCTGTGA; 3'-cebador, TCTGGCAGTCCAGGAAACTT.

Ejemplo 11. Falta de correlación entre FoxP3 y CD25 en células T CD4⁺ humanas.

Estudios previos en ratones usando ratones desactivados FoxP3-GFP han demostrado que FoxP3 no siempre se correlaciona con la expresión de CD25 (36). Dado que los esfuerzos actuales en humanos se han centrado en el uso de CD25 para aislar y cuantificar Treg, analizamos la expresión de FoxP3 en los diversos subconjuntos de células T CD4⁺. Las células de sangre periférica de sujetos normales se purificaron en gradientes de Ficoll y la superficie celular se tiñó con mAb anti-CD4 y anti-CD25. Esta tinción fue seguida por la permeabilización de la membrana celular y la tinción intracelular con un mAb anti-FoxP3 monoclonal.

Como se observa en la Figura 1, aunque la mayoría de las células CD4⁺CD25^{hi} (2% arriba del cuadrante) eran FoxP3⁺ (oscilando entre 84,5-96,8% en 3 individuos) hubo un número considerable de células FoxP3⁺ que eran reducidas en CD25 o incluso negativas. De hecho, con base únicamente en la selección de poblaciones de CD4 y CD25 entre el 27-52,7% de las células, FoxP3⁺ representaba hasta el 7,5% de las células TCD4⁺. No se observó tinción significativa usando un control de isotipo IgG-Alexa488 mientras que un segundo mAb anti-FoxP3 de BioLegend produjo resultados similares (datos no mostrados).

Un análisis de la expresión de FoxP3 en el subconjunto de células T CD4⁺CD25⁻ mostró que <5% de las células T CD25⁻CD4⁺ expresaron FoxP3, aunque ese porcentaje probablemente fue una sobreestimación debido a alguna tinción de fondo utilizando el isotipo control Ig. Sin embargo, dado el gran número de células en esta cuadrante, es probable que haya al menos algunas células T CD4⁺CD25⁻ que sean FoxP3⁺. Por lo tanto, en lugar de <2% de las células T CD4⁺ que caen en un subconjunto putativo de Treg, hasta un 8-10% de las células T CD4⁺ pueden ser de naturaleza reguladora.

Ejemplo 12. Análisis de moléculas novedosas de superficie celular específicas de Treg.

Para identificar marcadores de superficie celular adicionales asociados con la función y el fenotipo de Treg, se realizó un análisis de microarreglos comparando ARNm expresado por células T CD4⁺CD25^{hi} con células T CD4⁺CD25^{neg} aisladas de PBMC de donantes sanos. El ARNm se preparó a partir de 3 donantes de sangre, el ARNc se preparó y se probó en GeneChips Affymetrix U133A. Los parámetros de clasificación se basaron en estudios publicados en los que el 1-2% superior de las células T CD4⁺CD25⁺ se seleccionaron como el subconjunto prototípico de Treg (16, 37).

Entre los genes que diferían entre los dos subconjuntos, se observó que la expresión de IL-7R (CD127) se expresaba a niveles 2,4 veces menores en las células T CD4⁺CD25^{hi} en comparación con células T CD4⁺CD25^{neg}. Para confirmar los hallazgos, se examinaron los ARNm aislados de 3 preparaciones de células T CD4⁺CD25^{hi} y CD4⁺CD25^{neg} independientes mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La expresión del ARNm de CD127 se correlacionó inversamente con la expresión de CD25. De hecho, el nivel de expresión fue 3,14 menor en las células T CD4⁺CD25^{hi} en comparación con las células T CD4⁺D25⁻ (intervalo 2,26 a 4,21 veces).

Como se predijo mediante los estudios de expresión génica, la mayoría de las células CD4⁺CD25⁺, especialmente las células T CD4⁺CD25^{hi} tenían una baja expresión de CD127 (Figura 2a). Sin embargo, no todas las células T CD4⁺CD127^{lo/-} eran CD25⁺. De hecho, un porcentaje significativo de células T CD4⁺CD127^{lo/-} (15,8% en este individuo) fueron CD25 negativas. Dicho esto, la mayoría de las células T CD4⁺CD25⁻ eran altas en CD127 (73,8%), lo que representa la expresión diferencial observada en los análisis del arreglo de genes. Más importante aún, el análisis citométrico de flujo de la expresión de FoxP3 en subconjuntos de células T CD127 positivas y negativas mostró que la mayoría de las células T FoxP3⁺ estaban en el subconjunto de células T CD127^{lo/-} (Figura 2b). Curiosamente, la expresión relativa de CD127 se correlacionó inversamente con FoxP3 con las células T CD4⁺ que expresan FoxP3 más alto que expresan los niveles más bajos de CD127. Estos resultados se observaron uniformemente en > 20 individuos diferentes examinados. De hecho, se observaron resultados similares en ratones. Las células T CD4⁺ aisladas para ratones desactivados FoxP3-GFP se tiñeron para CD127 (36, 38). La gran mayoría de las células T CD4⁺ FoxP3⁺ de ratón fueron CD127^{lo/-}

(Figura 3a). Análisis adicionales de estos ratones mostraron que las Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ eran $CD127^{lo/-}$; sin embargo, como en humanos, CD127 era un marcador mejor que CD25 ya que todas las células T $CD4^+$ fueron $CD127^{lo/-}$ independiente de la expresión de CD25 (Figura 3b).

5 Se llevaron a cabo estudios adicionales para determinar la relación de CD4, CD127, FoxP3 y CD25 usando citometría de flujo multiparámetro (Figura 4). La abrumadora mayoría de las células T $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ expresan FoxP3 (94% de este individuo) (Figura 4a). Sin embargo, un porcentaje significativo de células $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ también son FoxP3⁺ (35% en este individuo) aunque la fluorescencia media es a menudo menor que las células $CD4^+CD25^{hi}$. En marcado contraste, hubo pocas células T FoxP3⁺ en el subconjunto $CD4^+CD127^+$, excepto un pequeño porcentaje entre las que expresaron CD25. Por lo tanto, a pesar del hecho de que las células T $CD127^+$ representaron aproximadamente el 90% de las células T $CD4^+$ en este individuo (Figura 4b). Curiosamente, volviendo a la selección de poblaciones del subconjunto $CD4^+CD127^+FoxP3^+$ mostró que la expresión de CD25 en estas células T era intermedia y distinta del subconjunto $CD25^{hi}$ descrito como Tregs "clásicas" (datos no mostrado) lo que sugiere que pueden ser una célula de transición. Se observaron resultados similares en las PBMC obtenidas de 10 donantes sanos teñidos para la expresión en la superficie celular de CD4, CD127, CD25 seguido de tinción intracelular con mAb específico de FoxP3 (Figura 4c). El examen de múltiples individuos confirmó que la mayoría de las células T $CD4^+FoxP3^+$ estaban dentro del subconjunto $CD25^+CD127^{lo/-}$; sin embargo, en algunos individuos un porcentaje significativo de células T $CD25^+CD127^{lo/-}$ y/o $CD25^+CD127^+$ fueron FoxP3⁺. Por lo tanto, CD127 es un marcador de superficie celular mejor que CD25 para la identificación de células T $CD4^+FoxP3^+$, sin embargo, la mejor combinación de marcadores de superficie celular es $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ que representa aproximadamente el 80% de las FoxP3⁺ de acuerdo con el individuo. Por lo tanto, una estrategia más amplia de selección de poblaciones de $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ da como resultado una población de células T FoxP3⁺ altamente purificada en comparación con los otros subconjuntos (Figura 4d).

Ejemplo 13. Análisis ChIP-Chip de la interacción de FoxP3 con CD127.

25 Los datos mostraron claramente una relación "general" entre la expresión de FoxP3 y la subregulación de CD127. Sin embargo, nos llamó la atención la aparente correlación inversa entre FoxP3 y la proteína CD127 (Figura 2b). Estos resultados sugieren que puede haber una relación estructural directa entre el factor de transcripción, FoxP3 y la transcripción de CD127. Esto fue especialmente atractivo dados estudios previos que sugieren que FoxP3 reprime la expresión génica (39). La inmunoprecipitación (IP) de cromatina (CH) del ADN genómico unido al factor de transcripción seguido de la hibridación del microarreglo (chip) de ADN enriquecido con IP es una nueva tecnología que permite el análisis genómico de la unión del factor de transcripción. Los datos de ChIP-chip son diferentes a los datos de expresión génica de microarreglos clásicos obtenidos midiendo los niveles de ARNm, ya que examina el control directo de la transcripción génica no solo la regulación secuencia abajo potencialmente indirecta.

35 Se llevaron a cabo experimentos ChIP-chip en Treg humanas $CD4^+CD25^{hi}$ expandidas anti-CD3/anti-CD28 (37). Anti-FoxP3 o Ig de conejo de control se usó para precipitar complejos de proteína-ADN entrecruzados a partir de lisados nucleares. El entrecruzamiento del material inmunoprecipitado se eliminó, se trató con proteasa, y el ADN se purificó y se amplificó. El material resultante se hibridó con el genoma completo usando GeneChip® Human Tiling 1.0R Array Set (Affymetrix 900774) para identificar las ubicaciones de los sitios de unión para FoxP3. El análisis estadístico se realizó para determinar los sitios que se asociaron selectivamente con la proteína FoxP3 y no con Ig de conejo.

45 La región promotora IL-7R puntuó entre los diversos sitios unidos por los inmunoprecipitados de proteína FoxP3 (datos no mostrados). La unión del promotor CD127 fue confirmada por qPCR. Se usaron cebadores de oligonucleótidos que abarcaban la región promotora de CD127 en el ADN inmunoprecipitado anti-FoxP3 a partir de las Treg humanas $CD4^+CD25^{hi}$ (Figura 5). Hubo un fuerte enriquecimiento del ADN de CD127 amplificado a partir de los inmunoprecipitados anti-FoxP3 en comparación con los inmunoprecipitados de Ig de conejo específicamente en la región promotora de IL-7R pero no de otras secuencias de ADN que rodean esta área en el genoma. Estos datos apoyan la regulación directa de CD127 por FoxP3.

50 Ejemplo 14. Supresión de la respuesta de linfocitos mixtos alogénicos (MLR) usando diferentes subconjuntos de células T $CD4^+$.

55 Aunque la baja expresión de CD127 se correlaciona con la expresión de FoxP3, una serie de estudios han cuestionado si FoxP3 es siempre un marcador de Treg en humanos. Por lo tanto, se examinó la capacidad de las células T $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ y otros subconjuntos para suprimir una MLR alogénica. Las PBMC se clasificaron en 4 subconjuntos basados en la expresión de CD127, CD25 y CD4. Primero, se examinó la capacidad de los subconjuntos individuales para responder a las APC alogénicas. Como se puede ver en la Figura 6, como se informó anteriormente, el subconjunto de células T $CD4^+CD25^{hi}$ fue anérgico cuando se estimuló con aloantígeno compatible con el hecho de que estas células eran FoxP3⁺ y comprenden el subconjunto Treg "clásico". De manera similar, ninguno de los subconjuntos $CD127^{lo/-}$, las células T $CD25^+$ o $CD25^+CD4^+$ o las células T $CD4^+CD127^{lo/-}$ a granel respondieron en la MLR alogénica sugiriendo que al igual que las células T $CD4^+CD25^{hi}$, estas células eran anérgicas (37). Por el contrario, el subconjunto de células T $CD4^+CD127^+$ respondió normalmente al aloantígeno consistente con publicaciones que sugieren que estas células representaban compartimentos de células T de memoria y sin modificar (32, 34, 40). Se observaron resultados similares cuando las células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 (datos no mostrados) sugiriendo que, al igual que los subconjuntos Treg "clásicos", las células que expresaban FoxP3 eran anérgicas. A continuación, las diversas

subpoblaciones se añadieron a un MLR alógeno y se compararon por su capacidad para suprimir la proliferación de células T. El subconjunto de células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ suprimió la MLR tan bien o mejor que las células T CD4⁺CD25^{hi} (Figura 7). Esto es significativo ya que este subconjunto representa al menos 3 veces más células T CD4⁺ que incluyen subconjuntos intermedios y negativos de CD25. Por lo tanto, CD127 es más que solo otro marcador de Treg CD4⁺CD25^{hi} pero permite la identificación y el aislamiento de un subconjunto de células T supresoras significativamente más inclusivo. De hecho, la actividad supresora fue independiente de CD25 ya que tanto los subconjuntos de células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ y CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁻ suprimieron la MLR, aunque en múltiples estudios, las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ suprimieron las respuestas más efectivamente que el subconjunto de células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁻ especialmente con relaciones de Treg: Tresp más bajas. Estos resultados son consistentes con el menor porcentaje y nivel de expresión de las células FoxP3⁺ en este subconjunto de células T. Ninguna de las células CD127⁺ suprimió la reproducibilidad de MLR (n = 9). Como puede verse, el marcador CD127 es el más discriminante en mostrar actividad de células supresoras. Estos resultados indicaron que CD127 es un marcador suficiente para definir el subconjunto de células T reguladoras CD4⁺. Para demostrar esto directamente, las PBMC se clasificaron con base únicamente en la expresión de CD4 y CD127 y se examinaron en una MLR alógena. El subconjunto de células T CD4⁺CD127^{lo/-} era anérgico (datos no mostrados) y suprimió la MLR casi tan eficazmente como la células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ o CD4⁺CD25^{hi}.

Además, los solicitantes compararon perfiles de expresión génica para una matriz de genes en la que se analizaron ARNm de diversos subconjuntos de células T en un chip de genoma entero Affy y se evaluaron para el nivel de expresión. Las células CD4⁺CD127^{lo}CD25⁺ tienen casi la misma huella digital global que las células clásicas altas en CD4⁺CD25 que difieren de las células CD25⁻ (datos no mostrados), que incluyen, particularmente con respecto a la expresión del gen TNF-R75, CTLA4, IL2RB, CD58 y CCR6 del marcador de Treg (no se muestra).

Ejemplo 15. Frecuencia de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} de pacientes con T1D.

Estudios previos han sugerido que los números de Treg podrían ser deficientes en pacientes con diabetes tipo 1 (24). Para investigar las diferencias cuantitativas en las poblaciones de Treg en pacientes con T1D frente a sujetos de control, las células T de sangre periférica se tiñeron con CD4, CD25, CD127 y FoxP3. La frecuencia de Treg CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} no fue significativamente diferente entre T1D (media 66,1%, estándar 11,3%, intervalo 53,7-82,8%) y los sujetos de control (media 65,5%, estándar 8,66%, intervalo 45.4-76.2%) (Figura 8). Aunque los porcentajes de células T FoxP3⁺ entre las células T CD4⁺ en los dos grupos fueron mayores que los informados para el subconjunto de Treg CD4⁺CD25^{hi}, los patrones coincidieron con los observados previamente. Estos resultados contrastan con algunos informes que encontraron diferencias en el porcentaje de células T CD4⁺CD25^{hi} en sujetos T1D cuando se analizaron como un porcentaje de células T CD4⁺.

Ejemplo 16. Las Treg CD4⁺CD127^{lo/-} son supresivas y tienen fenotipo de Treg.

Los análisis de citometría de flujo mostraron que solo el 30-40% de las células CD4⁺CD127^{lo} aisladas expresaban Foxp3 al comienzo del cultivo, con incluso menos expresión de Foxp3 (ambas basadas en el porcentaje y MFI (intensidad media de fluorescencia)) después de la expansión. Estos resultados plantearon la cuestión de la actividad funcional de las células T negativas de Foxp3 en el cultivo. Como primer enfoque para determinar el potencial funcional de las diferentes células cultivadas en el cultivo, se separaron las células CD4⁺CD127^{lo} y se cultivaron durante 14 días con anti-CD3/anti-CD28⁺ IL-2 más/menos rapamicina. Las células se expandieron mejor en ausencia de rapamicina y cuando se estimularon nuevamente con el cóctel de mAAb y de IL-2 el día 9. La célula expandida con RAPA tenía los niveles más altos de Foxp3 y el porcentaje de células Foxp3⁺. La mayoría de las células Foxp3⁻ eran células CD25^{lo} frente a Foxp3⁺ en el mismo cultivo.

A continuación se comparó la supresión de CD4⁺CD127^{lo} para células expandidas en presencia de IL-2 o IL-2 rapamicina. A los 14 días, las células expandidas se separaron y se añadieron a un ensayo de supresión CFSE (succinimidil éster de carboxifluoresceína). Curiosamente, después del cultivo, ambas poblaciones se suprimieron, pero las que se cultivaron con rapamicina se suprimieron mejor (véase la Figura 12). Esto se correlacionó con el aumento de la expresión de FoxP3, lo que sugiere que la expresión de FoxP3 estaba relacionada con la actividad supresora pero no esencial para la actividad celular supresora por las células expandidas. A este respecto, debe observarse en la Figura 7 que las células T CD4⁺CD127^{lo}CD25⁻ recientes fueron supresoras apoyando la posibilidad de que CD127, no Foxp3, sea un marcador mejor para la actividad de células supresoras en este ensayo.

A continuación se comparó la supresión de CD4⁺CD127^{lo} con base en la separación de CD25 después de la expansión (véase la Figura 13). A los 14 días, las células expandidas se separaron en subconjuntos CD25⁺ (columna central) y CD25⁻ (columna derecha) y se añadieron a un ensayo de supresión de CFSE. Curiosamente, después del cultivo, ambas poblaciones se suprimieron de forma equivalente, lo que sugiere que la expresión de CD25 no era esencial para conferir actividad supresora sobre las células expandidas. Sin embargo, no pudimos descartar si las células que se suprimían en estos cultivos se derivaban de células CD25⁺ o tenían CD25 subregulado durante el cultivo.

También se examinó la expresión de FoxP3 y CD127 y la función Treg de las nuevas células T de ratón CD4⁺CD127^{lo} FoxP3⁺ y FoxP3⁻. Estos estudios en Treg de ratón han confirmado estas observaciones y demostraron que solo las células FoxP3⁺CD127⁺ suprimen antes de la expansión, mientras que después del cultivo tanto las poblaciones FoxP3⁺

como FoxP3⁻ suprimen eficazmente. Estos resultados indican que CD127 es el mejor marcador y que las células CD127^{lo} FoxP3⁺ pueden "educar" a las células FoxP3⁻ para que se vuelvan supresoras *in vitro*.

Discusión de los ejemplos

5

Los hallazgos anteriores plantean varios problemas críticos. En primer lugar, dado que la mayoría de las células T CD4⁺ FoxP3⁺ pueden caer fuera del cuadrante típico para Treg humanas, los estudios utilizados para los análisis funcionales e inmunofenotípicos pueden perder un gran número de Treg putativas. Esto tiene implicaciones importantes para determinar las diferencias cuantitativas en pacientes con una variedad de enfermedades. En segundo lugar, el hecho de que las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁻ supriman una llamada MLR alogénica pone en duda los estudios que sugieren que FoxP3 no es un marcador "bueno" para la actividad de Treg. Puede ser que FoxP3 sea un marcador excelente y que las pequeñas poblaciones que surgen durante la activación normal de las células T sean de hecho células T reguladoras adaptativas que se expanden como consecuencia de una señalización de TCR por debajo del óptimo o por encima del óptimo. Sin embargo, se debe enfatizar que no todas las células T FoxP3⁺ son necesariamente Treg y su actividad puede depender del nivel de expresión de FoxP3 y las isoformas de la proteína expresada. Sin embargo, estas CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}, una vez aisladas, pueden ser tratadas *in vivo* con TGFβ u otros factores para mejorar la función de Treg en estas células. En tercer lugar, los esfuerzos para seleccionar Treg para la expansión *in vitro* pueden verse obstaculizados por la subestimación de Treg en cualquier estrategia de separación basada en la expresión de CD25. La capacidad de identificar y seleccionar un número significativamente mayor de Treg que circulan en la sangre periférica de humanos, especialmente aquellos con enfermedades autoinmunes, es probable que facilite la expansión de un número suficiente de células para la inmunoterapia. Finalmente, la identificación de CD127 como un marcador que distingue las células T efectoras/memoria de las reguladoras indica que la terapia anti-CD127 podría ser apropiada para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como diabetes Tipo 1, lupus eritematoso sistémico o esclerosis múltiple.

25

La identificación de CD127 como marcador útil puede relacionarse con observaciones genéticas. Primero, el análisis de microarreglos de ARNm de subconjuntos de células T individuales mostró que CD127 se expresó a niveles significativamente más bajos en células T CD4⁺CD25^{hi} frente a CD4⁺CD25⁻. A diferencia de la mayoría de las células T activadas, que expresan rápidamente CD127 y las células T de memoria que expresan altos niveles de CD127, la población de Treg permanece CD127^{lo/-}. Puede haber dos razones para esto. En primer lugar, las Treg pueden estar constantemente sometidas a estimulación antigénica que es dependiente de CD28, dando como resultado una señalización continua que interrumpe la transcripción de ARNm de CD127. A este respecto, es interesante observar que la activación de las células T sin modificar por anti-CD3 más anti-CD28 pero no anti-CD3 solo condujo a una subregulación rápida de CD127 (J. Esensten, A. Weiss y JA Bluestone, datos no publicados) lo que sugiere que las señales CD28 están solamente involucradas en la regulación de la subregulación de CD127. Alternativamente, y no mutuamente excluyentes, está la posibilidad de que la expresión de FoxP3 en este subconjunto de células T controle la expresión de CD127. Hay una serie de razones para pensar que este puede ser el caso ilustrado en los perfiles de tinción de citometría de flujo, cuanto más expresión de FoxP3, menos CD127 (Figura 2b). Además, la sobreexpresión de FoxP3 en ratones transgénicos da como resultado una población de células uniforme CD127^{lo/-} con actividad supresiva. Finalmente, los datos generados usando el análisis ChIP (primero por ChIP-Chip seguido de ChIP-qPCR) sugirieron que el promotor CD127 es un objetivo para la unión de FoxP3. Si la baja expresión de CD127 es una consecuencia de la exposición constante al antígeno *in vivo* o la sobreexpresión de FoxP3 que da como resultado la represión del gen de CD127 no son mutuamente excluyentes.

45

Las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁻ suprimen de manera bastante efectiva aunque el porcentaje de células T FoxP3⁺ en este subconjunto puede ser bastante variable. Estos resultados sugieren que el marcador CD127 puede ser útil para identificar diferentes subtipos de células T reguladoras que incluyen células Tr1 y TH3. En este sentido, actualmente hay una serie de entornos, incluido el tratamiento de humanos con T1D con anti-CD3 que induce células T con un fenotipo regulador (11, 31, 42, 43). Estos estudios, que imitan resultados similares en ratones deficientes en Treg tratados con anti-CD3 no mitogénico (10), indican que puede ser posible identificar una respuesta "adaptativa" de Treg usando CD127 como biomarcador además de una expresión de CD25 menor previamente observada en estas células.

50

Uno de los aspectos más intrigantes de los resultados es la aparente dicotomía en la expresión del receptor de citoquinas en las células T de memoria frente a las Treg. Mientras que un alto porcentaje de Treg ahora parece ser IL-7R bajo e IL-2R positivo, las células T de memoria tienen el fenotipo opuesto, expresando altos niveles de IL-7R y bajos niveles de IL-2R. La base funcional para esta expresión diferencial no está clara, pero puede reflejar la evolución de distintas vías para la supervivencia celular y la expansión de estos subconjuntos de células T. Por ejemplo, es posible que las células T reguladoras puedan jugar un papel crítico en la homeostasis normal. Por lo tanto, las células intentan regular la perturbación inmunitaria más temprana que puede ocurrir en ausencia de una respuesta patógena. Dado que IL-2 es una "citoquina temprana" producida rápidamente por las células T activadas en los ganglios linfáticos drenantes, IL-2 puede ser una señal crítica para despertar la respuesta de Treg que puede suprimir eficazmente la expansión de las células T en estos tejidos linfoides (44). Por el contrario, la IL-7 se produce comúnmente localmente en sitios de inflamación que conduce a una mayor supervivencia y expansión de células efectoras. Si esta expresión localizada de IL-7 promueve la expansión de Treg, podría ser contraproducente. Además, evitar la competencia por el uso de la cadena más común por estos receptores mejoraría la funcionalidad de la función de citoquinas. Finalmente, debe notarse que la situación puede ser bastante distinta en el timo cuando todas las células pre-T e inmaduras son CD127⁺

65

y CD25⁺. En esta etapa del desarrollo, otros factores podrían entrar en juego para determinar las vías de diferenciación que determinan si una célula T se convierte en Treg o en una célula T convencional sin modificar.

Varios estudios han examinado el número y la función de las células Treg en humanos con enfermedades autoinmunes. En algunos entornos, como la esclerosis múltiple, la diabetes tipo 1 y el síndrome poliglandular II autoinmune, los datos, basados en el número y función de las Treg CD4⁺CD25^{hi}, sugieren que hay menos Treg o menos Treg funcionales en individuos enfermos (24, 45-47). Sin embargo, en la diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunes, ha habido resultados contradictorios (25, 48). En el presente estudio, se evaluaron nuevamente Treg en pacientes con T1D en comparación con individuos normales. Usando los nuevos marcadores, FoxP3 y CD127, analizamos la frecuencia de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{lo/-} y la función de CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} para estimulación aloantigénica. En este estudio, está claro que las Treg humanas definidas por expresión de CD4, CD25, CD127 y FoxP3 están presentes dentro del mismo intervalo de porcentajes que los individuos de control sin autoinmunidad. Además, la funcionalidad de las Treg aisladas de los pacientes con T1D no se puede distinguir de los sujetos de control sanos. No podemos explicar la base para las diferencias entre nuestros estudios y los de otros en el campo de T1D. Se ha sugerido que la discrepancia podría deberse a diferencias sutiles en las técnicas basadas en citometría de flujo para la separación de células o diferentes mAb utilizados. Sin embargo, nuestro uso de marcadores distintivos que identifiquen el abrumador volumen de Treg en la sangre periférica humana es probable que sea una evaluación más definitiva de las cantidades de Treg y el potencial funcional en esta población de pacientes. Por último, es interesante observar que varios de los pacientes con T1D tenían cantidad de Treg elevados en comparación con el grueso de los sujetos de control y T1D. Esto es consistente con algunos estudios en otras enfermedades autoinmunes donde se informó que la frecuencia de células T CD4⁺CD25^{hi} aumentó en comparación con los controles. Además, estos resultados se ajustan a estudios en ratones que demuestran un aumento en el número de Treg en el momento del inicio de la enfermedad T1D así como en otros entornos de enfermedad inmune (J. Adams, Q. Tang y J. A. Bluestone, datos no publicados). Nuestra hipótesis es que, en lugar de que la deficiencia de Treg sea la causa de la precipitación de la enfermedad, en realidad hay una mayor actividad de Treg en un intento de frenar la batalla perdida contra las células efectoras cada vez más agresivas que pueden volverse más resistentes a las Treg.

Referencias

1. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, y T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182: 18-32.
2. Chatenoud, L., B. Salomon, y J.A. Bluestone. 2001. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 182: 149-163.
3. Wood, K.J., y S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3: 199-210.
4. Singh, B., S. Read, C. Asseman, V. Malmstrom, C. Mottet, L.A. Stephens, R. Stepankova, H. Tlaskalova, y F. Powrie. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 182: 190-200.
5. Curotto de Lafaille, M.A., y J.J. Lafaille. 2002. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* 14: 771-778.
6. Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, y J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199: 1455-1465.
7. von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
8. Shevach, E.M. 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2: 389-400.
9. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, y E.M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 34: 366-376.
10. Belghith, M., J.A. Bluestone, S. Barriot, J. Megret, J.F. Bach, y L. Chatenoud. 2003. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med* 9: 1202-1208.
11. Apostolou, I., y H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199: 1401-1408.
12. Bluestone, J.A., y A.K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 253-257.
13. Levings, M.K., y M.G. Roncarolo. 2005. Phenotypic and functional differences between human CD4⁺CD25⁺ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 293: 303-326.
14. Weiner, H.L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3: 947-954.
15. Tarbell, K.V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, and R.M. Steinman. 2004. CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199: 1467-1477.
16. Baecher-Allan, C., J.A. Brown, G.J. Freeman, y D.A. Hafler. 2001. CD4⁺CD25^{hi} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167: 1245-1253.
17. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, y S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10: 1969-1980.
18. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, y S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3: 135-142.
19. Salomon, B., y J.A. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and

- transplantation. *Annu Rev Immunol* 19: 225-252.
20. McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, y M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid - induced TNF receptor. *Immunity* 16: 311-323.
- 5 21. Kataoka, H., S. Takahashi, K. Takase, S. Yamasaki, T. Yokosuka, T. Koike, y T. Saito. 2005. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17: 421-427.
22. Tang, Q., E.K. Boden, K.J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, y J.A. Bluestone. 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2996-3005.
- 10 23. Ronchetti, S., O. Zollo, S. Bruscoli, M. Agostini, R. Bianchini, G. Nocentini, E. Ayroldi, y C. Riccardi. 2004. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 34: 613-622.
24. Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli, y N. Maclaren. 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109: 131-140.
- 15 25. Putnam, A.L., F. Vendrame, F. Dotta, and P.A. Gottlieb. 2005. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 24: 55-62.
26. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, y A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
27. Khattri, R., T. Cox, S.A. Yasayko, y F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
- 20 28. Gambineri, E., T.R. Torgerson, y H.D. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15: 430-435.
29. Hori, S., T. Nomura, y S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
- 25 30. Ziegler, S.F. 2006. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol* 24: 209-226.
31. Bisikirska, B., J. Colgan, J. Luban, J.A. Bluestone, y K.C. Herold. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Treg. *J Clin Invest* 115: 2904-2913.
32. Fuller, M.J., D.A. Hildeman, S. Sabbaj, D.E. Gaddis, A.E. Tebo, L. Shang, P.A. Goepfert, y A.J. Zajac. 2005. Cutting edge: emergence of CD127^{high} functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol* 174: 5926-5930.
- 30 33. Boettler, T., E. Panther, B. Bengsch, N. Nazarova, H.C. Spangenberg, H.E. Blum, y R. Thimme. 2006. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 80: 3532-3540.
34. Huster, K.M., V. Busch, M. Schiemann, K. Linkemann, K.M. Kerksiek, H. Wagner, y D.H. Busch. 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5610-5615.
- 35 35. Li, J., G. Huston, y S.L. Swain. 2003. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 198: 1807-1815.
36. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, y A.Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22: 329-341.
- 40 37. Earle, K.E., Q. Tang, X. Zhou, W. Liu, S. Zhu, M.L. Bonyhadi, y J.A. Bluestone. 2005. In vitro expanded human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 115: 3-9.
38. Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr, y A.Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202: 901-906.
- 45 39. Schubert, L.A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell, y S.F. Ziegler. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 276: 37672-37679.
40. Okada, E., M. Yamazaki, M. Tanabe, T. Takeuchi, M. Nanno, S. Oshima, R. Okamoto, K. Tsuchiya, T. Nakamura, T. Kanai, T. Hibi, y M. Watanabe. 2005. IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7R^{high} CD4⁺ mucosal T cells in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G745-754.
- 50 41. Baecher-Allan, C., E. Wolf, y D.A. Hafler. 2005. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Clin Immunol* 115: 10-18.
42. Herold, K.C., W. Hagopian, J.A. Auger, E. Poumian-Ruiz, L. Taylor, D. Donaldson, S.E. Gitelman, D.M. Harlan, D. Xu, R.A. Zivin, y J.A. Bluestone. 2002. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1692-1698.
- 55 43. Chen, W., K.C. Herold, y J.A. Bluestone. 2005. Achieving antigen-specific tolerance in diabetes: regulating specifically. *Int Rev Immunol* 24: 287-305.
44. Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, y J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7: 83-92.
- 60 45. Cox, A.L., S.A. Thompson, J.L. Jones, V.H. Robertson, G. Hale, H. Waldmann, D.A. Compston, y A.J. Coles. 2005. Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35: 3332-3342.
46. Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, y D.A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-979.
47. Kriegel, M.A., T. Lohmann, C. Gabler, N. Blank, J.R. Kalden, y H.M. Lorenz. 2004. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 199: 1285-1291.
- 65 48. de Kleer, I.M., L.R. Wedderburn, L.S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, W. de Jager, G. Pugayung, F. Giannoni,

- G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis, y B. Prakken. 2004. CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 172: 6435-6443.
49. Oberley, M.J., J. Tsao, P. Yau, y P.J. Farnham. 2004. High-throughput screening of chromatin immunoprecipitates using CpG-island microarrays. *Methods Enzymol* 376: 315-334.
- 5 50. Cawley, S., S. Bekiranov, H.H. Ng, P. Kapranov, E.A. Sekinger, D. Kampa, A. Piccolboni, V. Sementchenko, J. Cheng, A.J. Williams, R. Wheeler, B. Wong, J. Drenkow, M. Yamanaka, S. Patel, S. Brubaker, H. Tammanna, G. Helt, K. Struhl, y T.R. Gingeras. 2004. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116: 499-509.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una población de células T aisladas reguladoras inmunosupresoras, comprendiendo dicho método:
- 5 seleccionar una muestra que comprende células T por los niveles de expresión de un conjunto de marcadores que consiste en CD4, CD127 y CD25 para detectar células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺; y aislar las células T CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ detectadas para proporcionar la población de células T aisladas reguladoras inmunosupresoras,
- 10 en el que la población comprende al menos 10³ células T reguladoras inmunosupresoras.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células T son células T humanas.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la muestra se pone en contacto con un anticuerpo CD4 monoclonal marcado fluorescentemente, un anticuerpo CD127 monoclonal marcado fluorescentemente y un anticuerpo CD25 monoclonal marcado fluorescentemente, y las células se clasifican según la cantidad de los anticuerpos CD4, CD127 y CD25 marcados fluorescentemente unidos a ellos, en donde las células que tienen niveles altos de los anticuerpos CD4 y CD25 unidos y que tienen niveles reducidos o nulos del anticuerpo CD127 unido se
- 20 identifican como células CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ y se aíslan de células que tienen mayores cantidades del anticuerpo CD127 y menores cantidades de los anticuerpos CD4 y CD25 unidos a ellas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además la etapa de expandir dicha población de células T aisladas.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que la población de células T aisladas se expande poniendo en contacto las células T aisladas de la población con antígenos, aloantígenos o anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 más IL-2.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la población de células T aisladas se expande adicionalmente en presencia de TGFβ o rapamicina.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra es una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o muestra de tejido linfóide.
- 35 8. Una composición farmacéutica que comprende una población de células T reguladoras inmunosupresoras CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ aisladas, pudiendo obtener dicha población mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de un trastorno inmune o trastorno autoinmune en un sujeto.
- 40 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que la población de células T inmunosupresoras es autóloga para un sujeto.
- 45 11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el trastorno inmune se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de injerto contra huésped, un rechazo de trasplante de órgano y alergia.
- 50 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el trastorno autoinmune es diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple o miastenia grave.
13. Uso de una población expandida de células T reguladoras inmunosupresoras CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ aisladas en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno o enfermedad inmunitaria, pudiendo obtener dicha población mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 55 14. Una población de células T reguladoras inmunosupresoras CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ aisladas para uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad inmune en un sujeto humano, pudiendo obtener dicha población mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

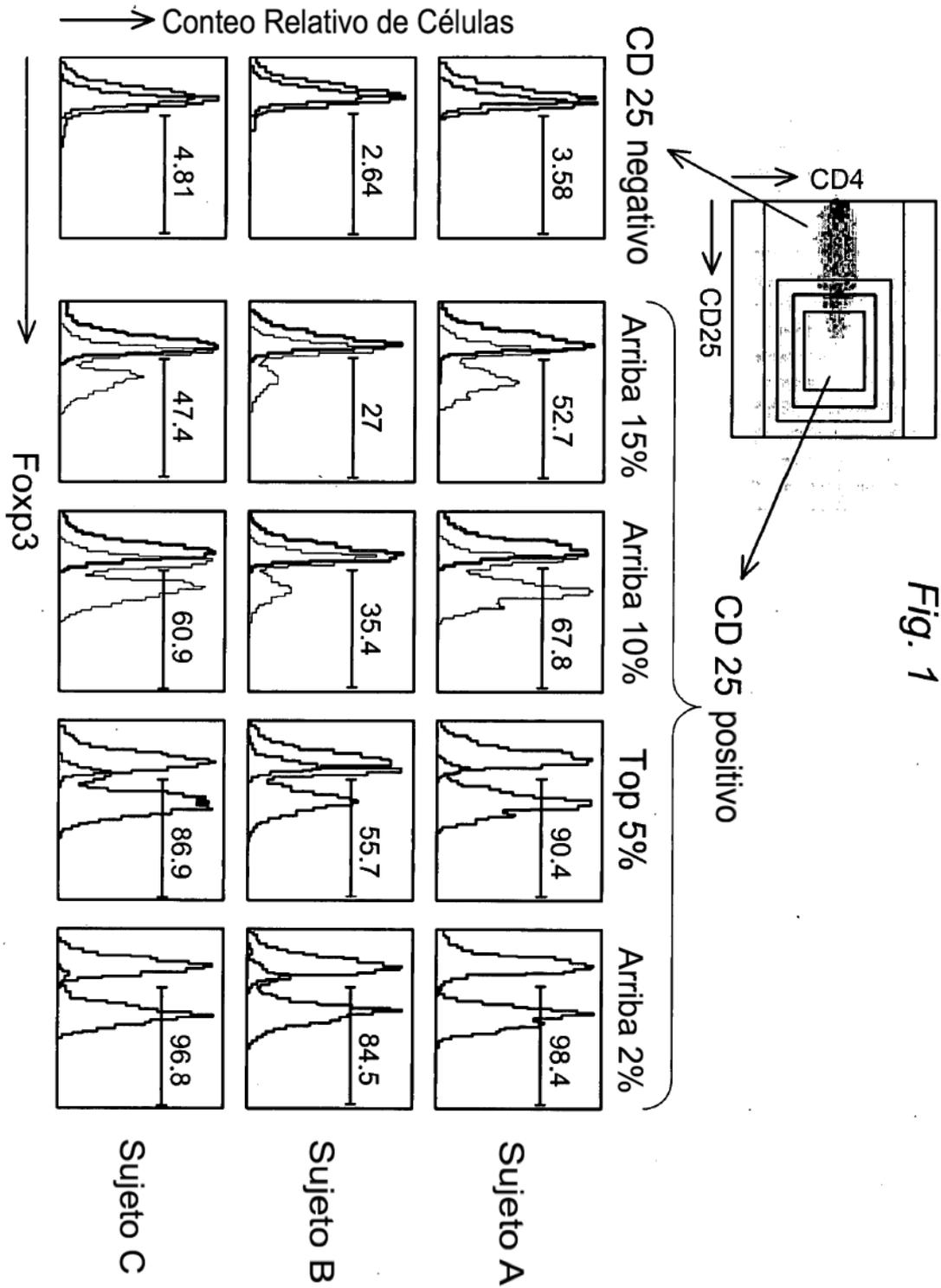


Fig. 1

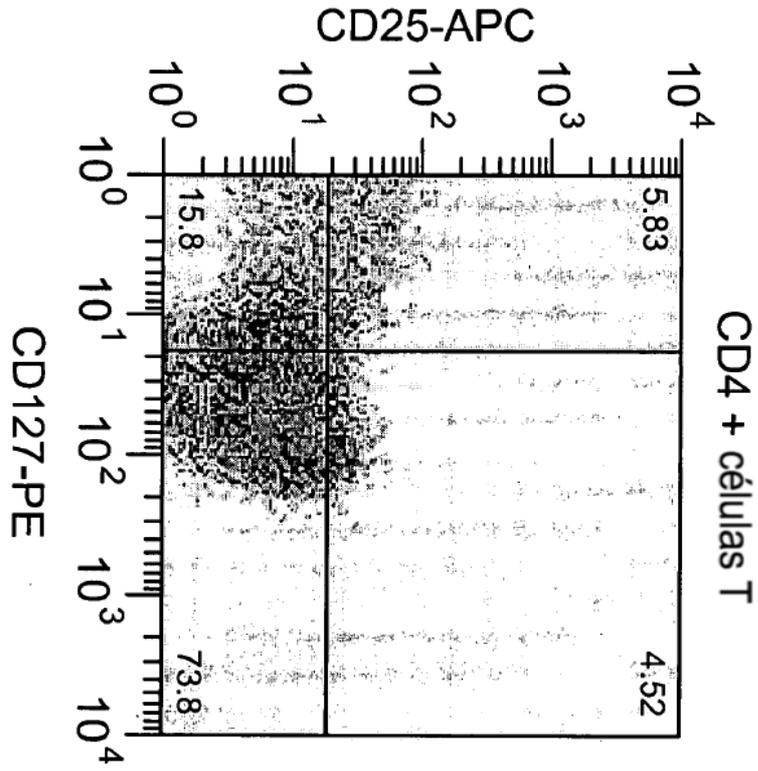


Fig. 2a

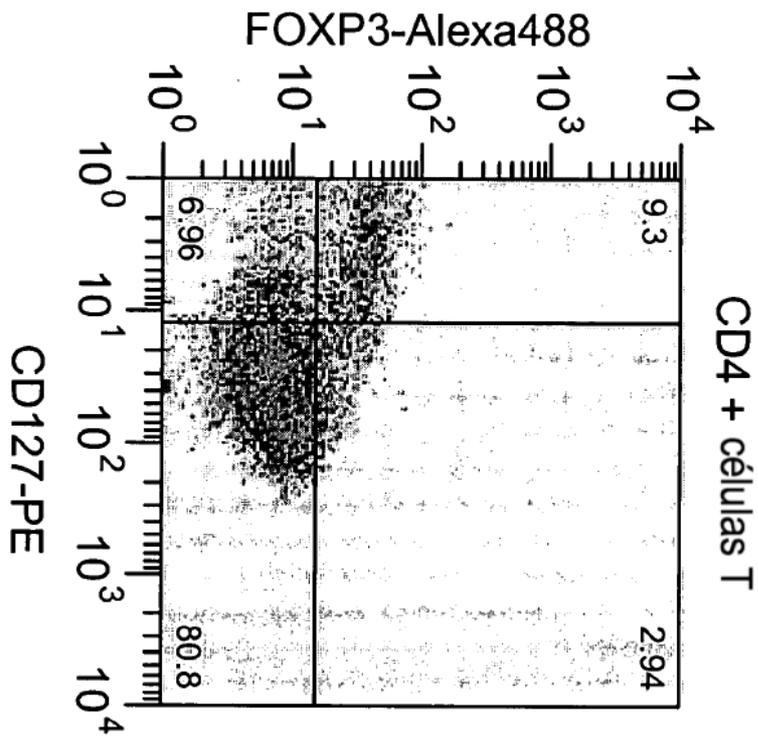


Fig. 2b

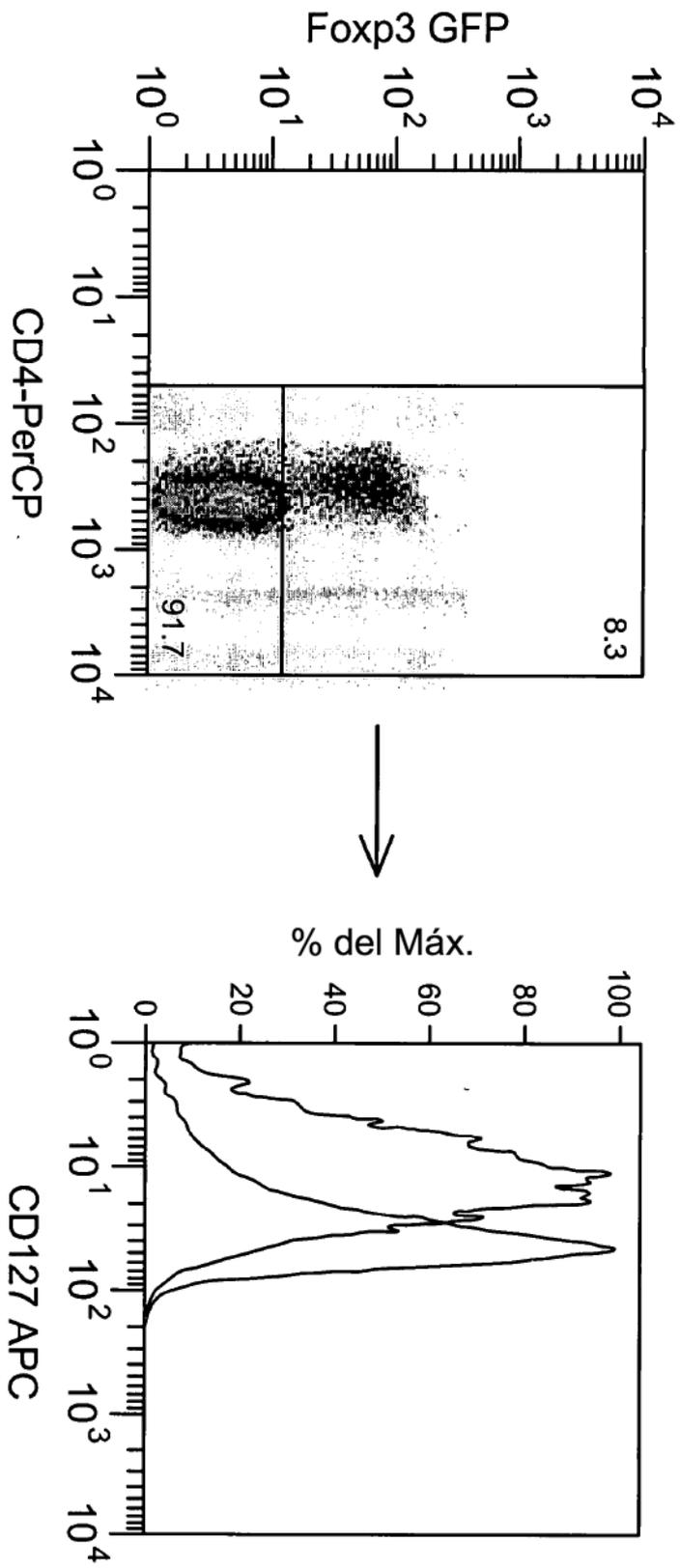


Fig. 3a

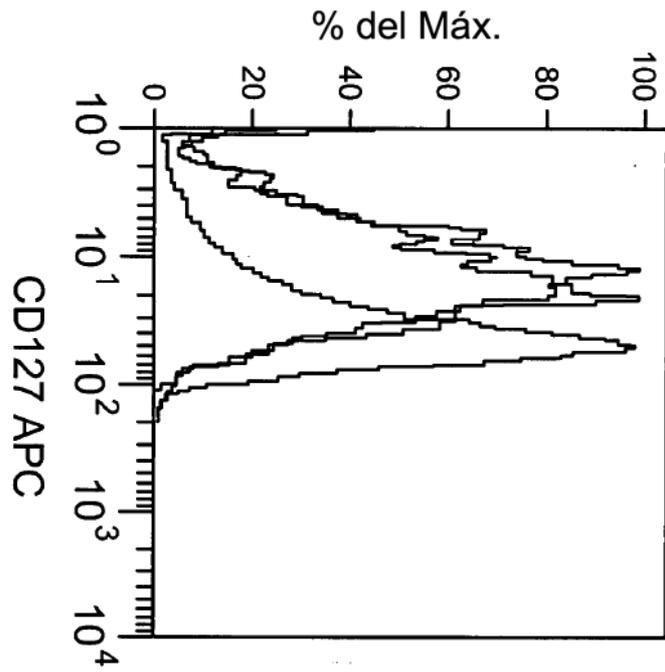
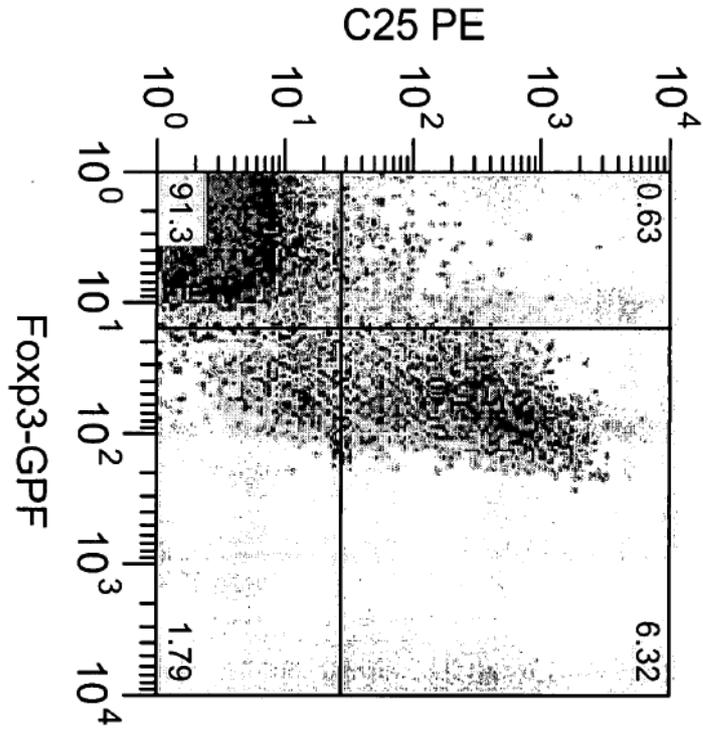


Fig. 3b

Fig. 4a

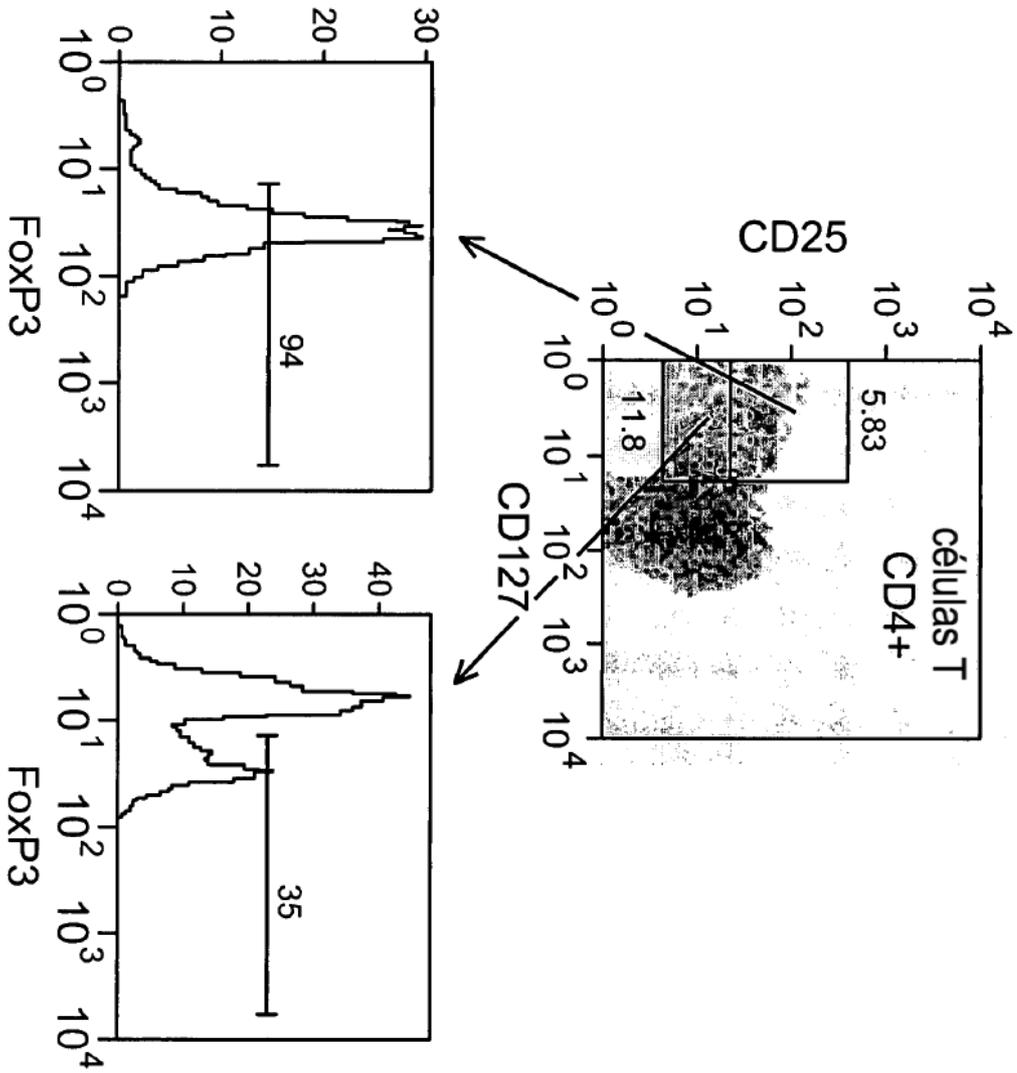
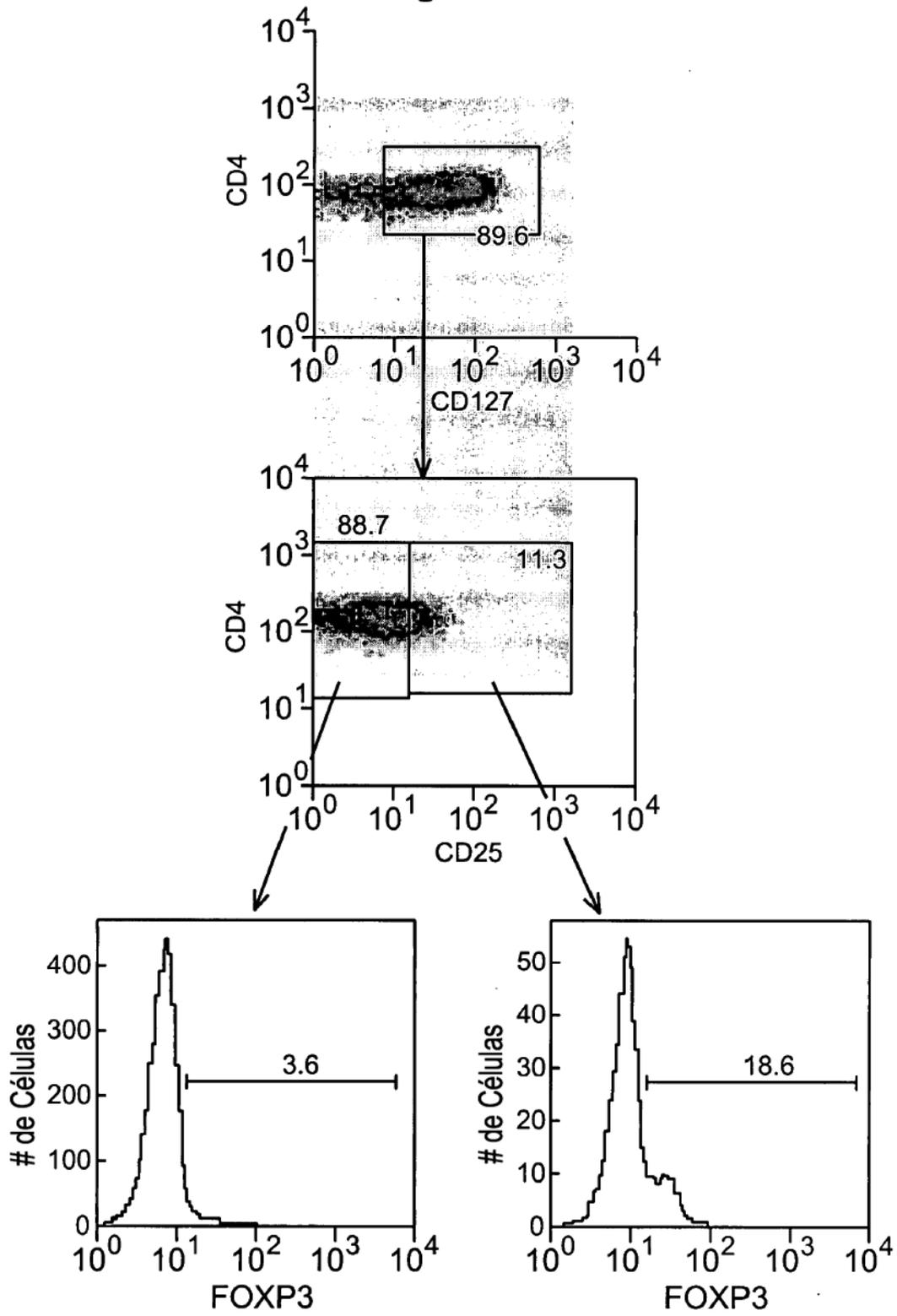


Fig. 4b



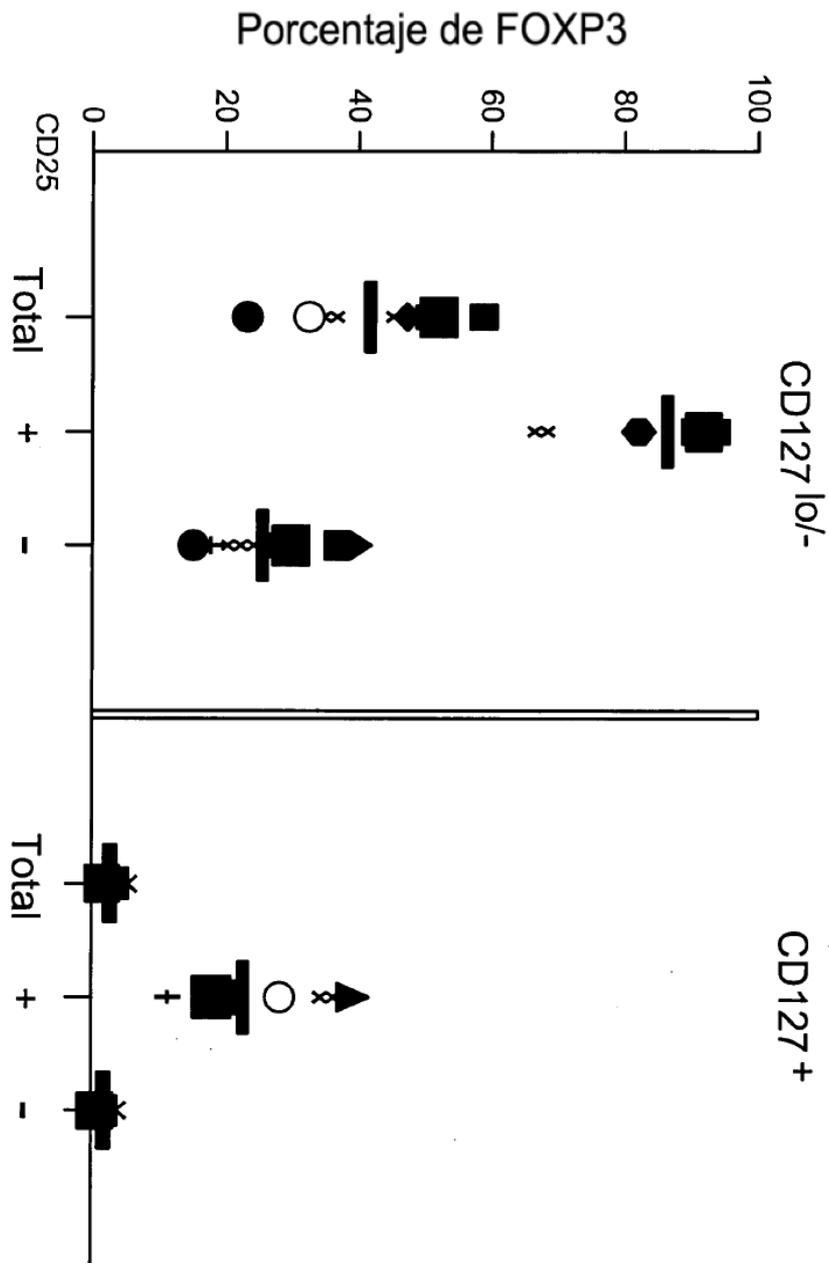
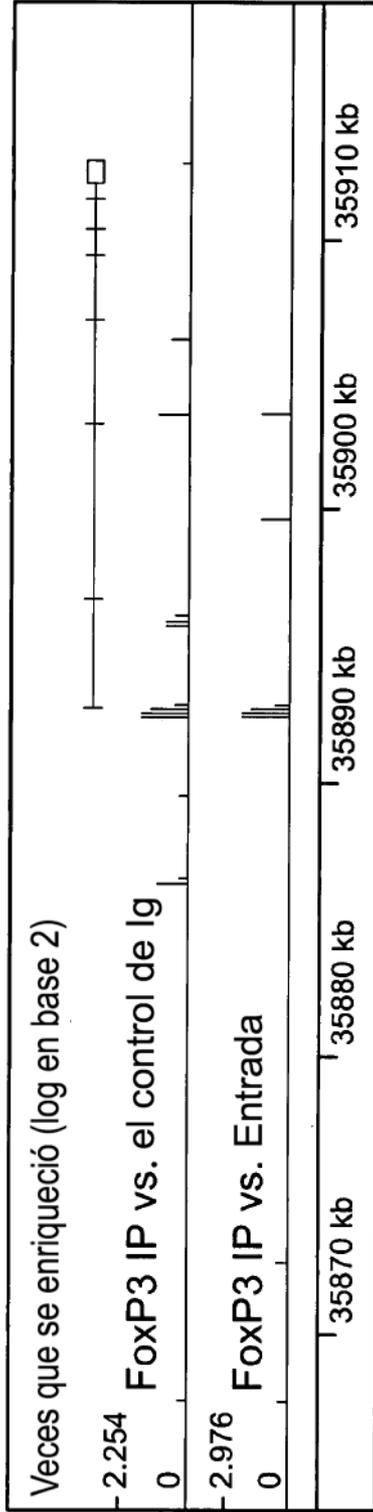


Fig. 4c

Fig. 5a



H_sapiens_Mayo_2004.chr5:35863179-35918811

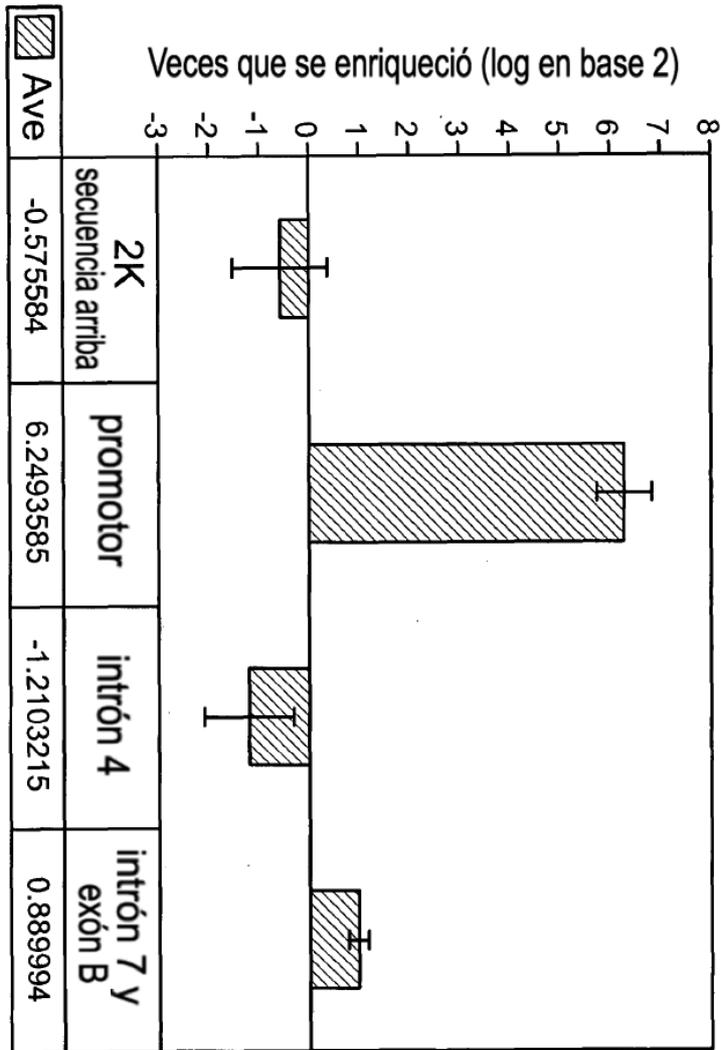


Fig. 5b

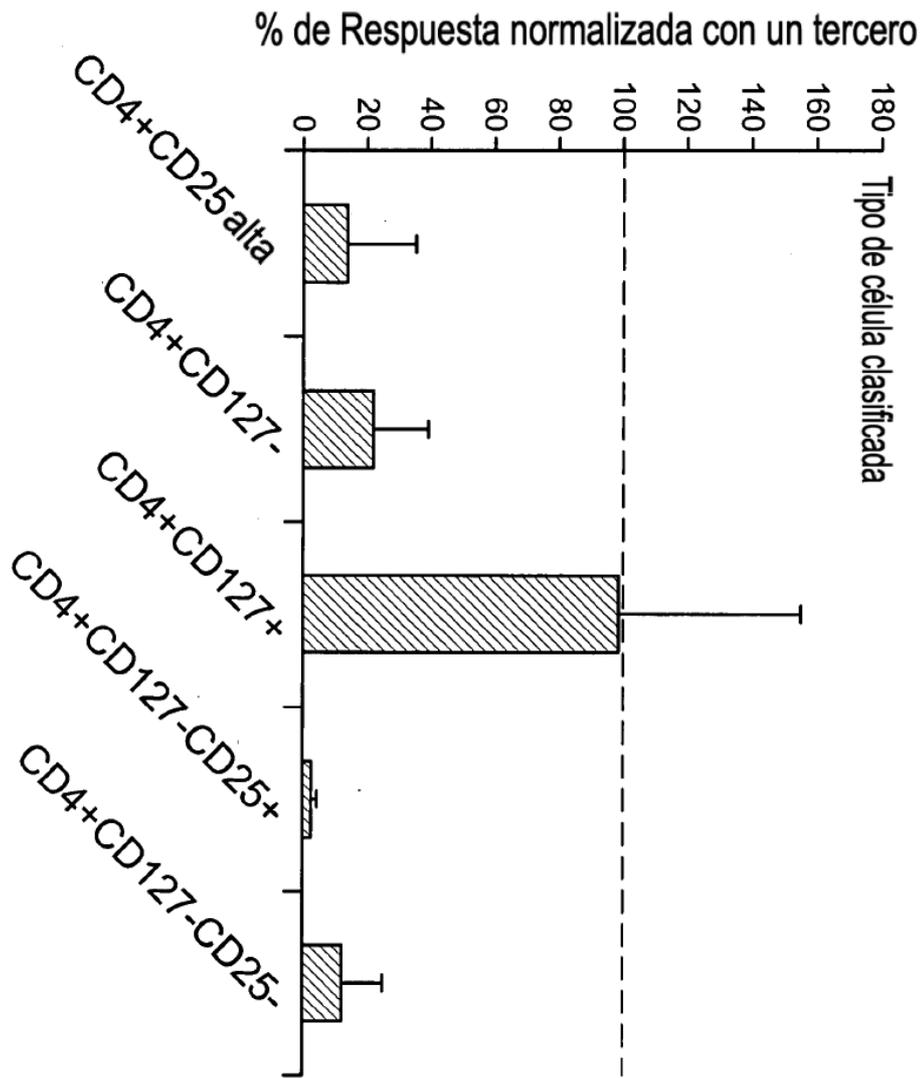


Fig. 6

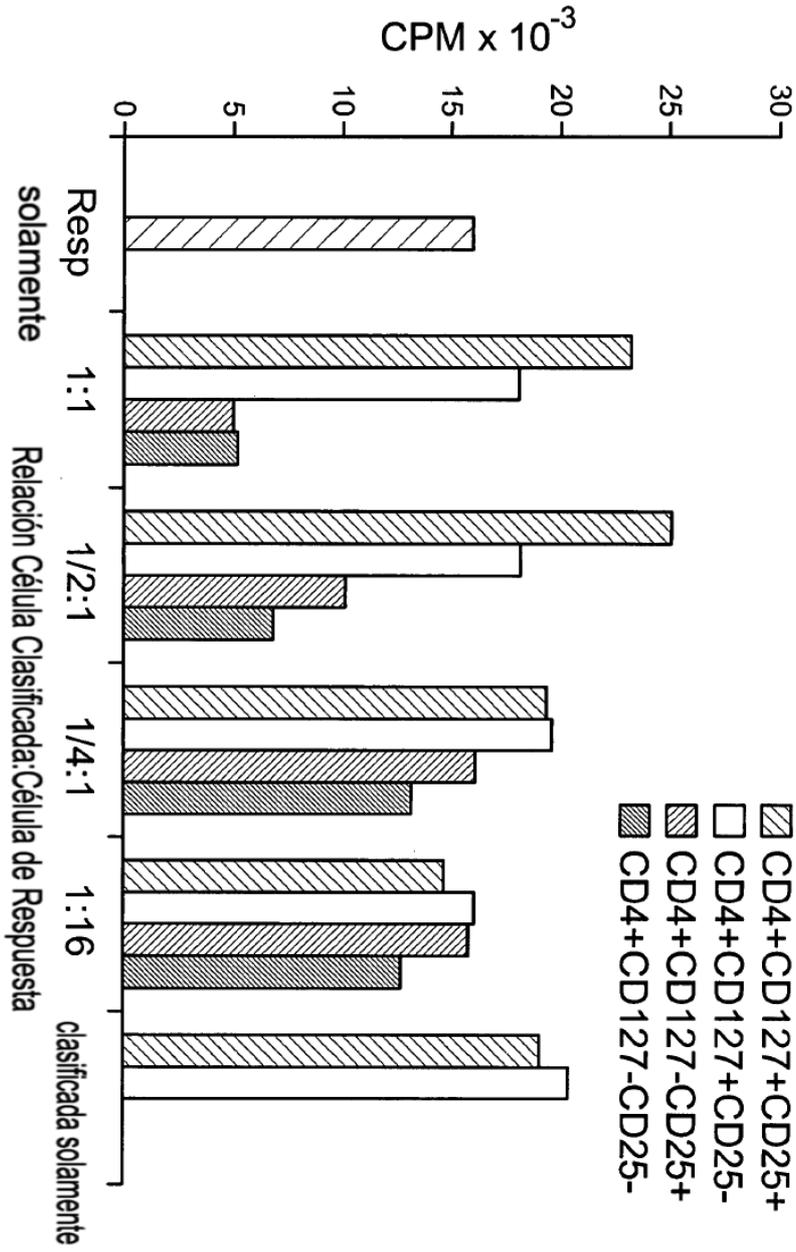


Fig. 7a

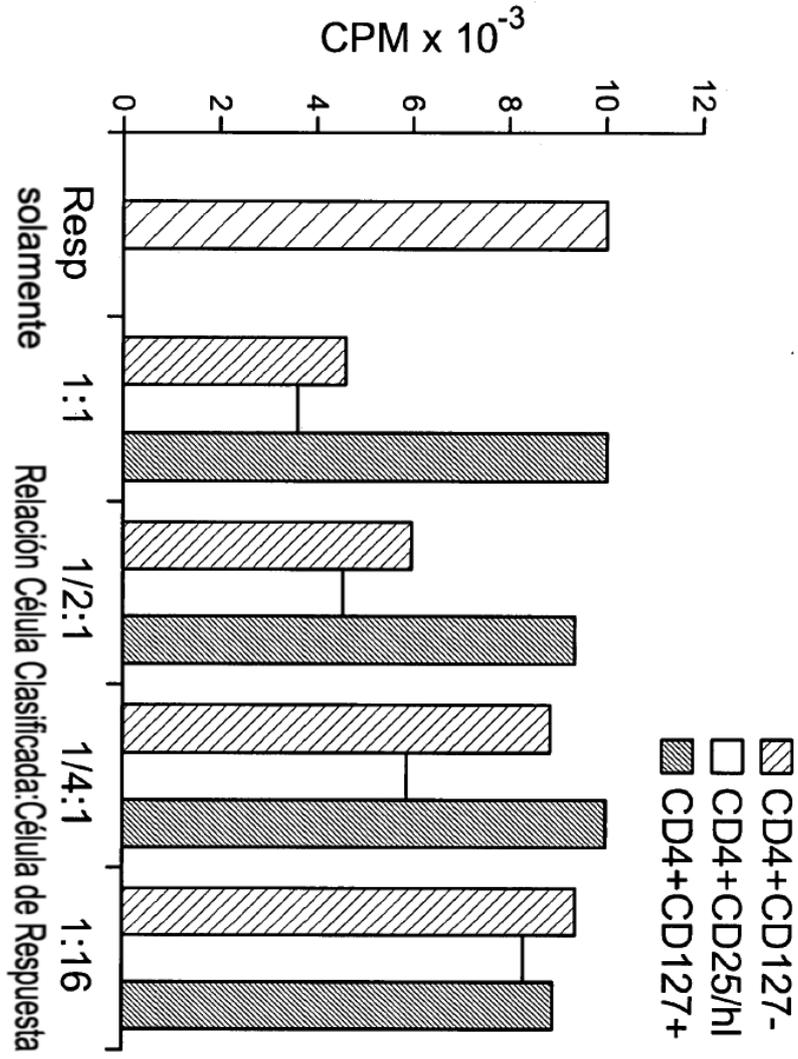


Fig. 7b

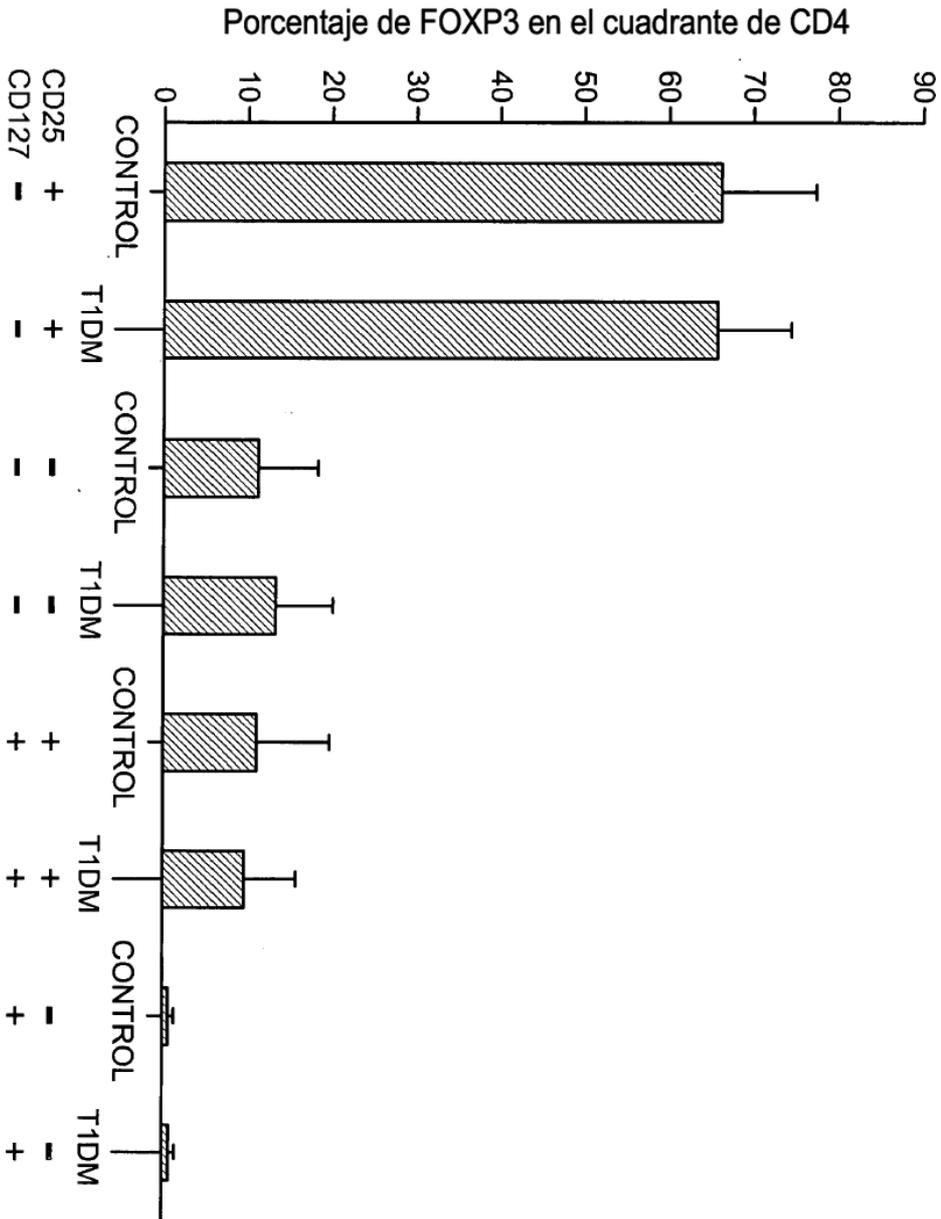


Fig. 8

Fig. 9
CD127 o precursor del receptor de interleuquina 7 [Homo sapiens]
 Secuencia de Aminoácidos

ACCESO NP_002176 XP_942460 VERSIÓN NP_002176.2 GI:28610151

NM_002185.2 S:CCDS3911.1"

1 MTILGTTFGM VFSLQVVSG ESGYAQNGDL EDAELDDYSF
 41 SCYSQLEVNG SQHSLTCAFE DPDVNITNLE FEICGALVEV
 81 KCLNFRKLQE IYFIETKKFL LIGKSNICVK VGEKSLTCKK
 121 IDLTTIVKPE APFDLSVVYR EGANDFVTF NTSHLQKKYV
 161 KVLMHVDVAYR QEKDENKWTW VNLSTKLT LQRKLQPAAM
 201 YEIKVRSIPD HYFKGFWESEW SPSYYFRTPE INNSSGEMDP
 241 ILLTISILSF FSVALLVILA CVLWKKRIKP IVWPSLPDHK
 281 KTLHLCKKP RKNLNVSFNP ESFLDCQIHR VDDIQARDEV
 321 EGFLQDTFPQ QLEESEKQRL GGDVQSPNCP SEDVVITPES
 361 FGRDSSLTCL AGNVSACDAP ILSRRSLDC RESGKNGPHV
 401 YQDLLLSLGT TNSTLPPPPFS LQSGILTLPN VAQQQPILTS
 441 LGSNQEEAYV TMSFFYQNO

Fig. 10

CD4 [Homo sapiens]. Secuencia de aminoácidos

1 MNRGV^PFRHL LLVLQLALLP AATQGKKVVL

31 GKKGDTVELT CTASQKKS^IQ FHWKNSNQIK

61 ILGNQGSFLT K

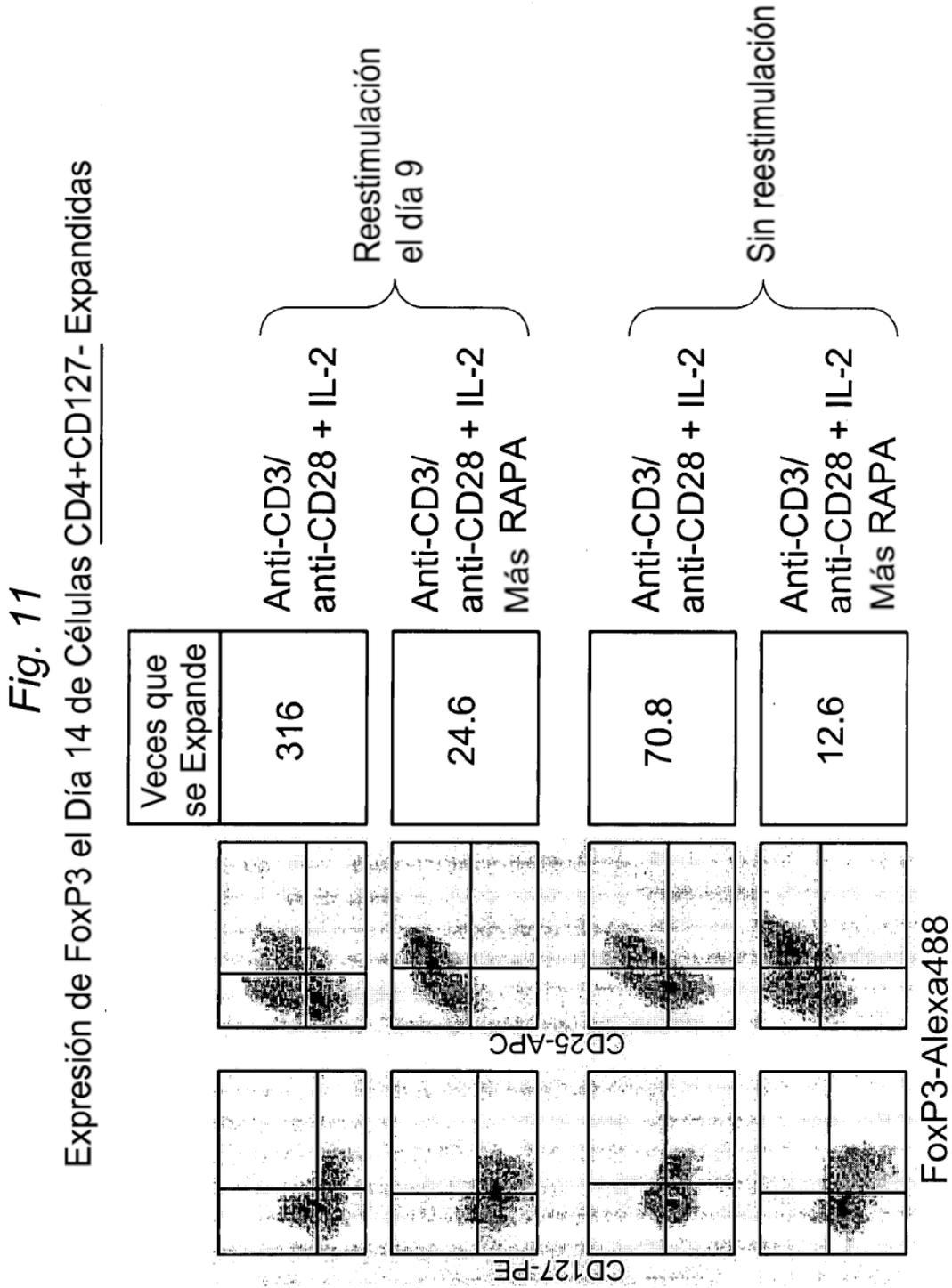
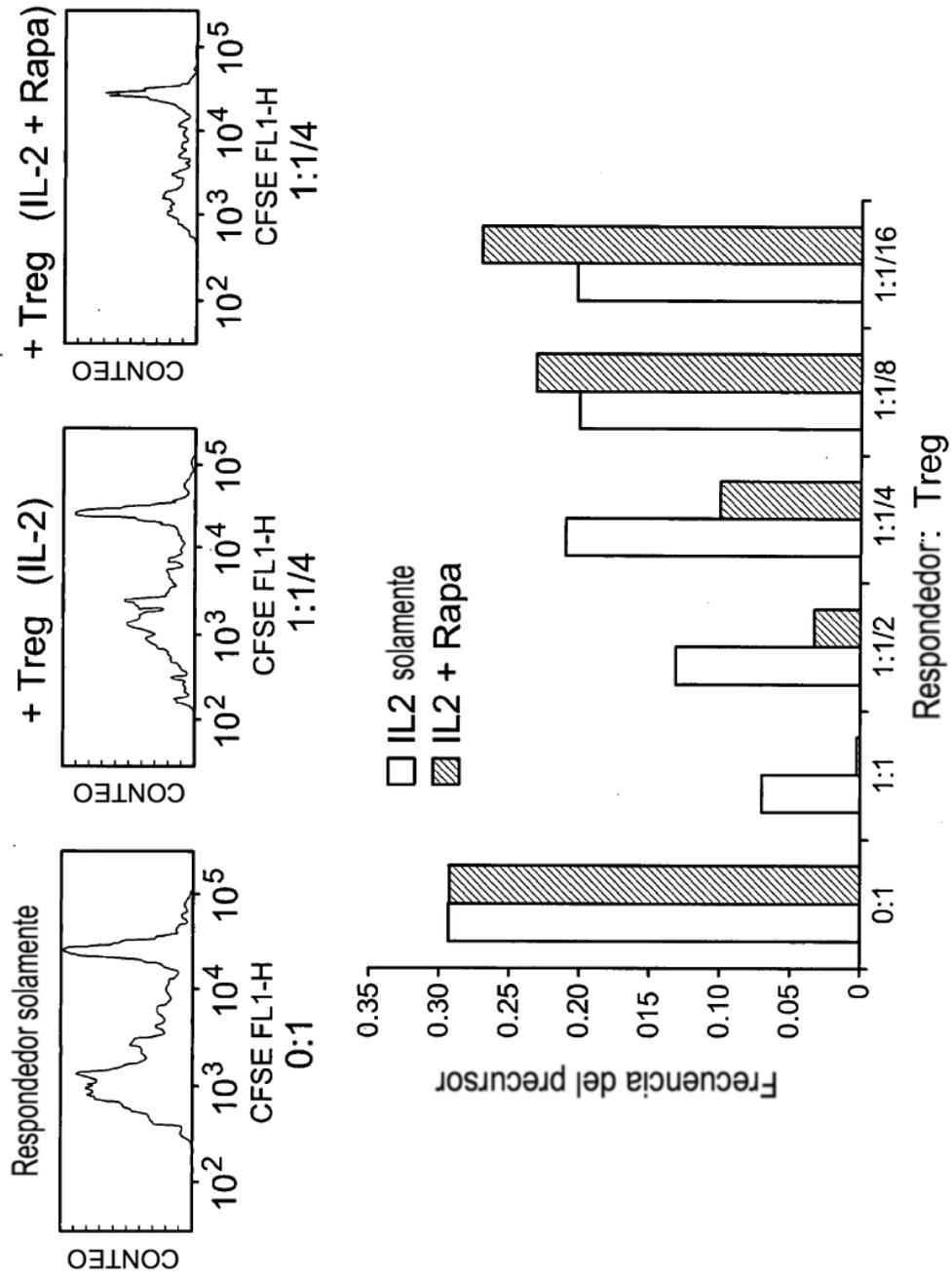


Fig. 12



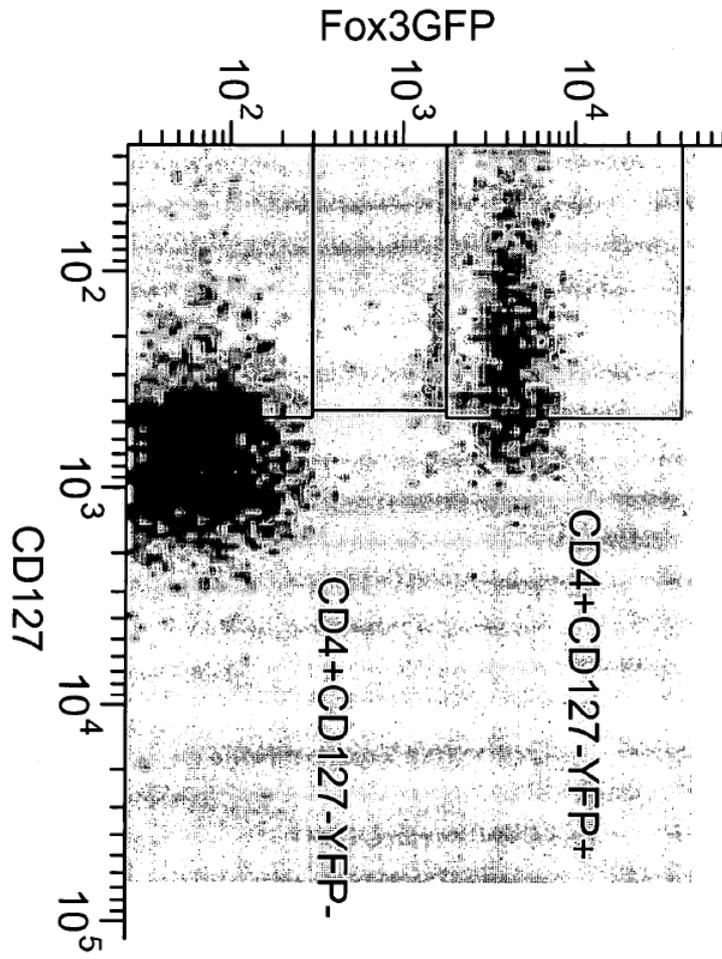


Fig. 13a

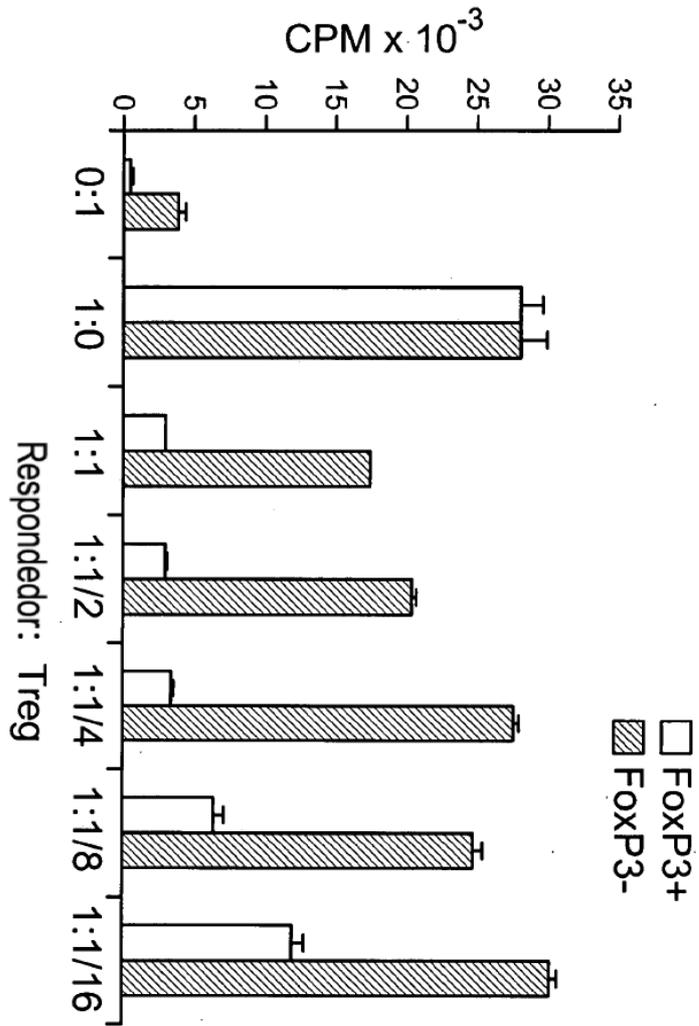


Fig. 13b

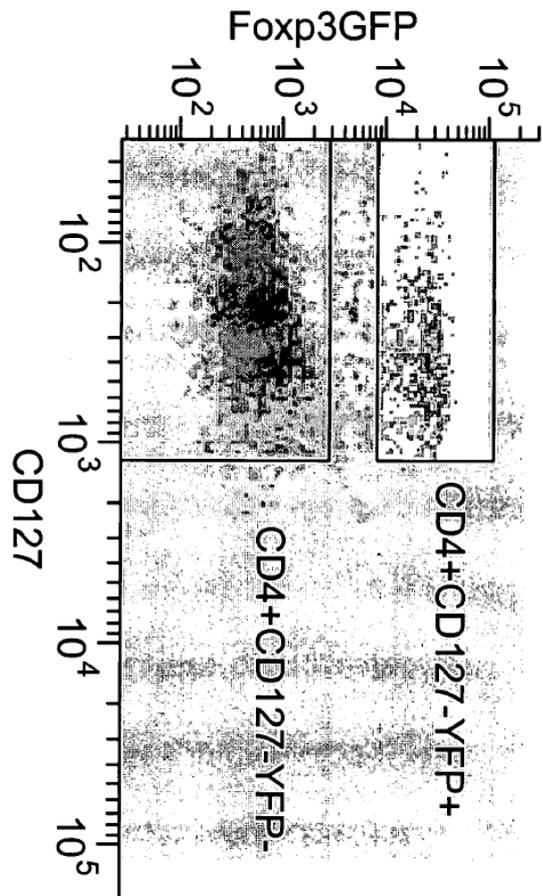


Fig. 14a

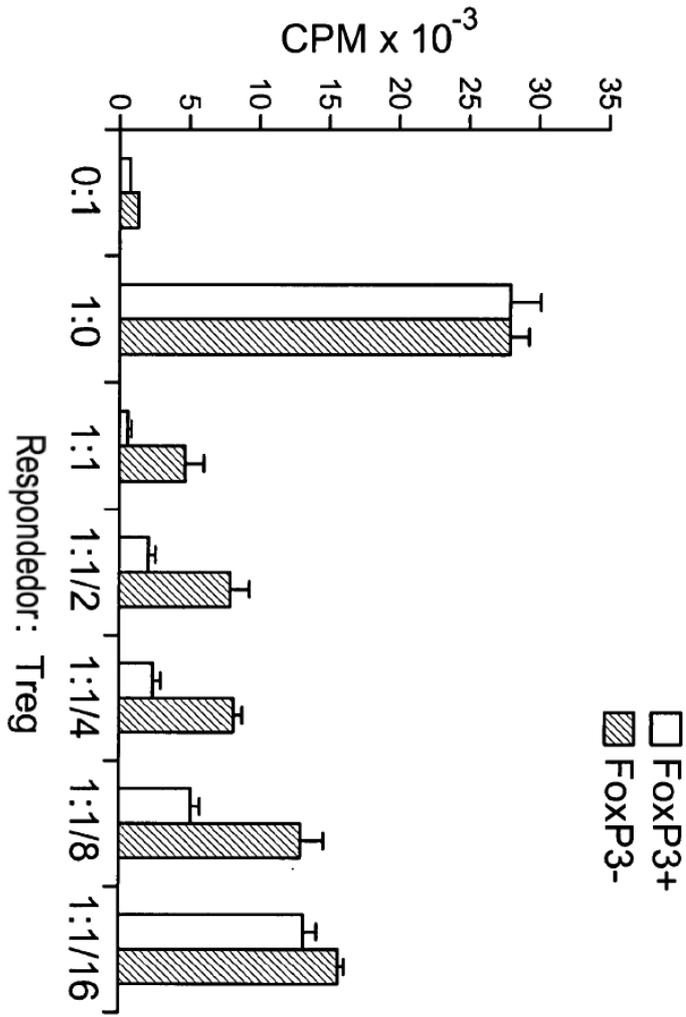


Fig. 14b