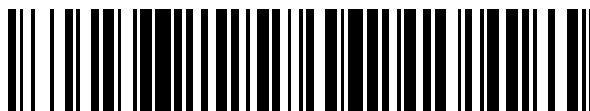


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 433**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2015** E 15180501 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** EP 3130678

54 Título: **Métodos in vitro para la detección de la resistencia a TREG y enfermedades autoinmunes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ (100.0%)
Langenbeckstraße 1
55131 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**TRINSCHKEK, BETTINA;
SATOH, KAZUKI y
JONULEIT, HELMUT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 727 433 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos in vitro para la detección de la resistencia a TREG y enfermedades autoinmunes

5 Las células T reguladoras (Treg) CD4+ CD25+ que se producen en la naturaleza representan una estirpe única de células T que está dotada de la capacidad de suprimir de forma activa las respuestas inmunes. Las Treg representan menos del 2% de todas las células T periféricas en individuos sanos (Jonuleit, H. et al.: "Identification and functional characterization of human CD4+ CD25+ T-cells with regulatory properties isolated from peripheral blood" (Identificación y caracterización funcional de células T CD4+ y CD25+ humanas con propiedades reguladoras, aisladas de sangre periférica), *J Exp Med.* 2001; 193: 1285-1294).

10 Como moduladores inmunes, las Treg juegan un papel crucial para el mantenimiento de una tolerancia inmunológica periférica, al suprimir la activación de otras células inmunes y conferir propiedades regulatorias gracias a la supresión de células de efecto T (Jonuleit et al.: "Infectious tolerance human CD25(+) regulatory T-cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells" (Las células T reguladoras CD25(+) con tolerancia infecciosa transportan actividad supresora a las células adyuvantes T CD4(+) convencionales), *J. Exp Med.* 2002, 196, 255-260; Stassen, M. et al.: "Human CD25+ regulatory T-cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells" (Células T reguladoras CD25+ humanas: dos subconjuntos definidos por las integrinas alfa 4 beta 7 o alfa 4 beta 1 confieren diferentes propiedades supresoras sobre las células adyuvantes T CD4+), *Eur J Immunol.* 2004; 34: 1303-1311). Una capacidad de respuesta impedida de las células T CD4+ con respecto a las células T reguladoras (Treg) se conoce también como resistencia a Treg. La resistencia a Treg puede detectarse en diversas enfermedades autoinmunes, inflamatorias y no inflamatorias. Si bien la función supresora de las Treg depende de la activación, una vez activadas, las Treg suprimen otras células autoinmunes de una manera no específica, de lo que resulta un efecto inmunorregulatorio amplio y sistémico (Thornton et al.: "CD4+ CD25+ immunoregulatory T-cells suppress poly-clonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production" (Las células T inmunorreguladoras CD4+ CD25+ suprimen la activación de células T policlonales in vitro al inhibir la producción de interleuquina 2), *J Exp Med.* 1998, 188: 287-296). La activación de las células T autorreactivas se controla por células T reguladoras (Treg) bajo condiciones fisiológicas (Jonuleit et al., 2001: "Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T-cells with regulatory properties isolated from peripheral blood" (Identificación y caracterización funcional de células T CD4(+) CD25(+) humanas con propiedades reguladoras, aisladas de sangre periférica), *J Exp Med.* 193: 1285-1924; Josefowicz et al., 2012: "Regulatory T-cells: mechanisms of differentiation and function" (Células T reguladoras: mecanismos de regulación y función), *Annual review of immunology* 30: 531-564; Sakaguchi et al., 2009: "Regulatory T-cells: how do they suppress immune responses?" (Células T reguladoras: ¿cómo suprimen las respuestas inmunes?), *International immunology* 21: 1105-1111). Debido a su función única para regular respuestas inmunes innatas y adaptativas, las Treg se han convertido en un objeto principal de la investigación inmunológica. Así, pues, las Treg juegan un importante papel en diversas afecciones o enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide, la fiebre reumática, el lupus eritematoso sistémico (SLE –"systemic lupus erythematosus"–), la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la enfermedad del intestino inflamatorio autoinmune, la diabetes de tipo I, la esclerosis múltiple (MS –"multiple sclerosis"–), la miastenia grave, la soriasis, el pénfigo común, el penfigoide.

45 Entre estas enfermedades, la esclerosis múltiple (MS) es difícil de tratar debido a que, como enfermedad autoinmune heterogénea, únicamente una pequeña proporción de los pacientes responde a la terapia. Resulta difícil investigar nuevos tratamientos terapéuticos, si bien el éxito terapéutico se ha mejorado significativamente en los últimos años. Se conoce hasta la fecha que las Treg se ven funcionalmente impedidas en los pacientes de MS (Baecher-Allan y Hafler, 2004b: "Suppressor T-cells in human diseases" (Células T supresoras en enfermedades humanas), *J Exp Med.* 200: 273-276; Constantino et al., 2008: "Multiple sclerosis and regulatory T-cells" (La esclerosis múltiple y las células T reguladoras", *J Clin Immunol* 28: 697-706; Haas et al., 2005: "Reduced suppressive effect of CD4+ CD25 high regulatory T-cells on the T-cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis" (Efecto supresor reducido de las células T reguladoras de alto contenido en CD4+ CD25 sobre la respuesta inmune de las células T contra la glicoproteína de oligodendrocito de mielina en pacientes con esclerosis múltiple), *European journal of immunology* 35: 3343-3352; Schneider et al., 2003: "In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T-cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signalling" (En la esclerosis múltiple activa recurrente-remitente, la resistencia de las células de efecto T a las T(regs) adaptativas implica un intercambio de señales con la intermediación de IL-6), *Sci. Transl. Med.* 5:170ra115; Trinschek et al., 2013: "Kinetics of IL-6 production defines T effector cell responsiveness to regulatory T-cells in multiple sclerosis" (La cinética de la producción de IL-6 define la capacidad de respuesta de las células de efecto T a las células T reguladoras en la esclerosis múltiple), *PloS one* 8:e77634; Zozuyla y Siendl, 2008: "The role of regulatory T-cells in multiple sclerosis" (El papel de las células T reguladoras en la esclerosis múltiple), *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4: 384-398). Debido a este desequilibrio, las células T autorreactivas escapan a la supresión por parte de las Treg y migran a través de la barrera entre el cerebro y la sangre para atacar el sistema nervioso central (Goverman, 2009: "Autoimmune T-cell responses in the central nervous system" (Respuestas de las células T autoinmunes en el sistema nervioso central), *Nature reviews, Immunology* 9: 393-407). La citoquina IL-6 juega un papel preponderante al inducir una fosforilación PKB/c-Akt mejorada, una expresión de la IL-6R regulada por exceso y, en un bucle de realimentación positivo, su propia producción acelerada (Trinschek et al., 2013: "Kinetics of IL-6

production defines T-effector cell responsiveness to regulatory T-cells in multiple sclerosis” (La cinética de la producción de IL-6 define la capacidad de respuesta de las células de efecto T a las células T reguladoras en la esclerosis múltiple), *PLoS one* 8:e77634). Sin embargo, por el momento no es posible distinguir entre células Treg defectuosas y células T resistentes a las Treg en pacientes con autoinmunidad. Esta diferenciación se complica por el hecho de que ambas poblaciones de células T no difieren en su expresión de ciertos marcadores de activación o en sus perfiles de citoquina (Ferrante et al., 1998: “Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signalling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis” (Producción de citoquina y expresión de marcadores superficiales en la esclerosis múltiple aguda y estable: producción de IL-12 alterada y aumento de los linfocitos de expresión de las moléculas de activación de linfocitos señalizadores (SLAM) en la esclerosis múltiple aguda), *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 160: 1514-1521; Vladoic et al., 2002: “Cerebrospinal fluid and serum protein levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R gp80) in multiple sclerosis patients” (Niveles de fluido cerebroespinal y de proteína de suero en la interleuquina-6 (IL-6) del factor alfa de la necrosis tumoral (TNF-alfa) y en el receptor de interleuquina-6 soluble (sIL-6R gp80), en pacientes de esclerosis múltiple), *Cytokine* 20: 86-89). Estas barreras aumentaron la demanda de identificación de moléculas que están asociadas con el impedimento de la función de las células T y que proporcionan enfoques importantes para la comprensión de la interacción de células T – Treg (Havla et al., 2015: [Immunotherapies for multiple sclerosis: review and update] (Inmunoterapias para la esclerosis múltiple: revisión y actualización), *Der Internist* 56: 432-445; Katsavos y Anagnostouli, 2013: “Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview” (Biomarcadores en esclerosis múltiple: una visión general actualizada), *Multiple sclerosis international* 2013: 340508; Weiner, 2009: “The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease?” (El desafío de la esclerosis múltiple: ¿cómo curamos una enfermedad heterogénea?), *Annals of neurology* 65: 239-248).

Es, por tanto, el propósito de la presente invención proporcionar métodos nuevos y mejorados que hagan posible la detección de la capacidad de respuesta impedida de las células de efecto T a las células T reguladoras (Treg), así como la detección de afecciones autoinmunes, inflamatorias y no inflamatorias, o de enfermedades asociadas con la resistencia a las Treg.

Este propósito se resuelve por los métodos y las moléculas marcadoras biológicas que se utilizan en la presente memoria, de acuerdo con la presente invención. Realizaciones preferidas constituyen la materia objeto de las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se refiere a métodos para la detección de la capacidad de respuesta impedida de las células T CD4+ a las células T reguladoras (Treg), a la que se hace referencia como resistencia a Treg, mediante la medición de los niveles de expresión de coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa, PPARGC1A (PGC-1 α).

La invención se propone identificar moléculas biológicas que permitan la detección de la resistencia a Treg en células humanas o animales aisladas, o en cultivos celulares. Se ha demostrado por los presentes inventores que la resistencia a Treg es causada por una expresión del receptor de IL-6 aumentada, una producción de la IL-6 y una fosforilación mejorada de PKB/c-Akt. Se generaron perfiles de expresión genética funcional de las células T CD4+ resistentes a Treg obtenidos de pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune, a fin de identificar potenciales biomarcadores asociados con la resistencia a Treg. Los perfiles de expresión de las células T activadas por Treg, su capacidad de proliferación y la producción de citoquina no difieren entre células T activadas de pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune e individuos sanos. Los biomarcadores identificados en esta memoria están asociados con la resistencia a las Treg y proporcionan una herramienta de diagnóstico para supervisar el éxito terapéutico de un tratamiento dado. Como consecuencia de ello, las enfermedades autoinmunes pueden personalizarse por el direccionamiento de moléculas específicas, lo que conduce a efectos secundarios reducidos, con lo cual se mejoran la eficiencia y el éxito de la terapia. Los biomarcadores identificados en esta memoria están estrechamente vinculados al recorrido de la IL-6, la cual desempeña un papel primordial al inducir una fosforilación de PKB/c-Akt mejorada, una expresión de IL-6r regulada en exceso y, en un bucle de realimentación positiva, su propia producción acelerada. El coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa, PPARGC1A (PGC-1 α), es un candidato que ha sido adicionalmente investigado por los presentes inventores y que satisface todos los criterios de un biomarcador para la detección de la resistencia a Treg y, por tanto, para la detección de una afección o enfermedad autoinmune asociada con la resistencia a Treg. Se compararon pacientes con esclerosis múltiple (MS –multiple sclerosis–) con individuos sanos en un estudio que comparaba los perfiles de expresión de PGC-1 α en las células T activadas. De acuerdo con ello, las células de efecto T obtenidas de pacientes con MS muestran un nivel de expresión fuertemente reducido, en comparación con las células T obtenidas de individuos sanos. Se aplicaron análisis bioinformáticos funcionales para identificar otros diversos biomarcadores que son específicos para MS y otras afecciones autoinmunes, todos los cuales están estrechamente vinculados a la función de las células T y a la resistencia a Treg. Similarmente al PGC-1 α , los otros reguladores de aguas arriba de las células T resistentes a Treg, HNF4A, Hdac, RORA, ESRRA, LPIN1, son también regulados significativamente por exceso en las células T CD4+ y CD8+ sensibles a las Treg, pertenecientes a individuos sanos, con la activación, pero regulados por defecto en las células T resistentes a Treg, activadas, de pacientes autoinmunes, lo que los convierte en candidatos adecuados para la detección de la resistencia a Treg y/o de afecciones autoinmunes.

Puesto que la susceptibilidad de las células T a las Treg está correlacionada con los niveles de expresión del PGC-1 α , la expresión del PGC-1 α se regula por defecto en respuesta a la IL-6, al igual que en células T activadas de pacientes autoinmunes y los niveles de expresión correlacionados con la resistencia a Treg. Puesto que el PGC-1 α está regulado por defecto en pacientes autoinmunes, una terapia podría estar dirigida a la regulación por exceso del PGC-1 α en células T activadas, al objeto de mejorar la susceptibilidad a la función de Treg.

Los presentes inventores encontraron, de manera adicional, que la regulación por defecto del PGC-1 α es directamente inducible por la IL-6, por lo que se proporcionan enfoques prometedores para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Se conoce que la IL-6 es una citoquina pleiotrópica que tiene una función clave en las respuestas autoinmunes y también contribuye al desarrollo y mantenimiento de diversas enfermedades autoinmunes (Malpass, 2013; Neurath y Finotto, 2001). La fosforilación de PKB/c-Akt se acelera por la síntesis de la IL-6, que se encuentra en las células T de los pacientes de artritis y MS, y que vuelve a estas células insensibles al control de Treg. Como parte de la solución terapéutica, pueden identificarse agonistas que puedan regular por exceso la expresión del PGC-1 α en células T activadas de pacientes autoinmunes. En la presente invención, se ha demostrado el efecto del IFN- β [interferón beta] en células T aisladas de pacientes de MS con el fin de inducir regulación por exceso de la expresión del PGC-1 α en estas células T. Los niveles de expresión del PGC-1 α pueden ser normalizados de forma aproximada mediante tratamiento con IFN- β , lo que demuestra que el PGC-1 α resulta también adecuado para supervisar el proceso del tratamiento terapéutico. Se ha encontrado, de manera adicional, que la inducción de la expresión del PGC-1 α evita la fosforilación de PKB/c-Akt y, subsiguientemente, restablece la sensibilidad a la supresión por medio de las Treg, incluso en presencia de IL-6. Por otra parte, el tratamiento con IFN- β inducía un perfil de expresión normalizado del PGC-1 α que estaba asociado con la restitución de la función de las células T, lo que demuestra que el PGC-1 α es un regulador maestro en la transmisión de la supresión por Treg.

La detección de la resistencia a Treg se lleva a cabo, preferiblemente, comparando los niveles de expresión del PGC-1 α con los niveles de expresión de biomarcador respectivos de células T CD4+ sensibles a las Treg, activadas, de tal manera que una regulación por defecto del PGC-1 α dentro de células T resistentes a Treg, activadas, en comparación con las células T CD4+ y CD8+ sensibles a Treg, activadas, es indicativa de la resistencia a las Treg. En los métodos de acuerdo con la presente invención, la regulación por exceso del PGC-1 α o de cualquier otro de los biomarcadores está correlacionada con una capacidad de respuesta de las células T CD4+ sensibles a Treg a la supresión por medio de las Treg. Es posible obtener controles adicionales para la resistencia a Treg, puesto que una regulación por defecto del PGC-1 α está asociada con una producción de IL-6 acelerada seguidamente a una estimulación del receptor de células T (TCR –“T cell receptor”–), una fosforilación incrementada de PKB/c-Akt, y/o una expresión incrementada del receptor de IL-6 (IL-6r).

La presente invención también se refiere a un método de representación en pantalla, in vitro, para la detección de una enfermedad inflamatoria o de una afección autoinmune, que comprende las etapas de generar un perfil de expresión genética funcional midiendo los niveles de expresión de el coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa, PPARGC1A (PGC-1 α) en células T CD4+ resistentes a Treg de pacientes que sufren una enfermedad o afección autoinmune, y comparando el perfil de expresión genética obtenido con el perfil de expresión obtenido de las células T CD4+ sensibles a Treg de controles sanos. En particular, el método de representación en pantalla de la invención permite una detección temprana de diversas enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, cuando se comparan los perfiles de expresión en células T activadas de pacientes de MS, con perfiles de expresión de individuos sanos. Se constata también que el método de representación en pantalla de la invención puede también utilizarse para la detección de enfermedades o afecciones autoinmunes similarmente asociadas a la resistencia a las Treg, tales como la artritis reumatoide, la fiebre reumática, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la enfermedad del intestino inflamatorio autoinmune, la diabetes de tipo I, la miastenia grave, la soriasis, el pénfigo común y el penfigoide. Como se demuestra adicionalmente, la mejora de la función de las células T se correlaciona con una normalización de la expresión del PGC-1 α , lo que indica que un restablecimiento de la actividad de las Treg constituye un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento de afecciones autoinmunes tales como la esclerosis múltiple o cualquiera otra de las afecciones autoinmunes mencionadas. La transición desde las células T afectadas de resistencia a Treg a las células T afectadas de sensibilidad a Treg está correlacionada con los niveles de expresión del PGC-1 α o de cualquier otra de las moléculas biomarcadoras, tales como HNF4A, Hdac, RORA, ESRRA, LPIN1. Además de ello, los niveles de expresión de la IL-6 aumentan significativamente en células T activadas obtenidas de pacientes de MS en los que el PGC-1 α está regulado por defecto. Por el contrario, la expresión de IL-6R está significativamente reducida y el PGC-1 α está regulado por exceso en células T activadas de individuos sanos. Como se ha mencionado anteriormente, la regulación por defecto del PGC-1 α en células T de MS activadas está vinculada a una fosforilación de PKB/c-Akt potenciada y a una falta de respuesta de las células T a la supresión por intermediación de Treg. Por otra parte, la inducción de la expresión del PGC-1 α era suficiente para evitar la fosforilación de PKB/c-Akt, y subsiguientemente se restablecía su sensibilidad a la supresión por intermediación de las Treg, incluso en presencia de IL-6.

Los siguientes ejemplos mostrarán la invención con mayor detalle.

Ejemplos:

5 Perfilación genética avanzada de células T CD4+ resistentes a Treg tomadas de pacientes de MS
 Puesto que los procesos de activación de las células T son regulados de forma transcripcional, los presentes
 inventores postularon que la resistencia a Treg de las células T de MS se refleja por cambios transcripcionales
 específicos en el perfil de expresión genético. Los presentes inventores analizaron, por lo tanto, los perfiles de
 10 expresión de los genes sensibles a la estimulación con TCR de las células T CD4+ de MS resistentes a Treg, en
 comparación con las células T CD4+ de HC (controles sanos), sensibles a Treg (Figura 1A). Se identificó un número
 de 3.512 genes sensibles a estimulación en MS, y de 2.472 genes de células T de HC con una expresión alterada
 por la estimulación (Figura 18). Subsiguientemente, se llevaron a cabo análisis bioinformáticos avanzados de
 reguladores de aguas arriba con conjuntos de datos que representan estos genes regulados de forma diferente. Era
 15 el propósito determinar, gracias a estos, reguladores de aguas arriba específicamente activados o inhibidos en
 células T de pacientes de MS o en HC (Figura 1C). De manera adicional, para acotar adicionalmente el grupo de
 reguladores de aguas arriba, se han representado (Figura 1D) moléculas con una alta astringencia y moléculas que
 presentan una asociación funcional con el recorrido de señalización de IL-6/c-Akt. Estos parámetros redujeron el
 grupo de reguladores de aguas arriba de objetivo a 16 genes que deberían estar funcionalmente implicados en la
 resistencia a las Treg.

20 El PGC-1 α es fuertemente regulado por exceso en TC de HC con la estimulación, mientras que es regulado por
 defecto con células T de MS

A fin de investigar si las moléculas de las que se predice que están asociadas con la resistencia a Treg y el
 intercambio de señales de IL-6 se encuentran también, en sí mismas, reguladas de forma diferenciada, los
 25 presentes inventores llevaron a cabo qRT-PCR de reguladores de aguas arriba identificados en células T CD4+ y
 CD8+ obtenidas de pacientes de MS y HC. De forma notable, las moléculas predichas *in silico* [por computadora o
 mediante simulación computacional] *HNF4A*, *Hdac* y *PPARGC1A* (Figura 2A) se regulan ciertamente, en sí mismas,
 como predichas por el análisis bioinformático en cuanto a sus reguladores de aguas arriba, en tanto que la expresión
 30 mRNA [ácido ribonucleico mensajero] de IRF8, FGF19 y RORA no se alteró. La diferencia más importante se
 encontró en el *PPARGC1A*, y análisis adicionales revelaron que la expresión del *PPARGC1A* estaba
 significativamente regulada por exceso en las células T CD4+ y CD8+ sensibles a Treg de HC, con la activación,
 pero regulada por defecto en células T resistentes a Treg, activadas, de pacientes de MS (Figura 2B, a la izquierda).
 De forma interesante, la regulación diferencial depende directamente del estado de activación, puesto que la
 35 expresión relativa de las células T restantes en pacientes de MS y en HC se expresa de forma comparable (Figura
 2B, a la derecha). El *PPARGC1A* (coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa), o,
 brevemente, PGC-1 α , es conocido como un coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el
 metabolismo de la energía, y fue sugerido como integrador maestro de señales externas (Austin y St-Pierre, 2012;
 Wu et al., 1999). La expresión del PGC-1 α está conectada al intercambio de señales de PKB/c-Akt e IL-6
 40 (Handschin et al., 2007; Romanino et al., 2011), corroborando adicionalmente la predicción bioinformática de que
 esta molécula representa un candidato prometedor para las células T disfuncionales de los pacientes de MS.

La IL-6 bloquea la regulación por exceso del PGC-1 α en células T activadas

A fin de investigar adicionalmente el papel del intercambio de señales de IL-6 en la regulación del PGC-1 α y la
 45 resistencia a Treg, los presentes inventores estimularon células T sensibles a Treg obtenidas solo de HC, o
 conjuntamente con Treg, en presencia o ausencia de IL-6. Ciertamente, la suplementación de IL-6 en cultivos
 conjuntos, o cocultivos, supresores impedía un control eficiente de las células T por parte de las Treg (Figura 3A).
 De forma concomitante, la adición de IL-6 exógena impedía la regulación por exceso del PGC-1 α en células T CD8+
 activadas, e incluso regulaba por defecto la expresión del PGC-1 α en células T CD4+ activadas (Figura 3A), ambas
 50 asociadas con una fosforilación potenciada de PKB/c-Akt en estas células T (Figura 3B). En caso contrario, el mAb
 anti-IL-6R o el inhibidor VIII de c-Akt impedía la fosforilación de PKB/c-Akt (Figura 3C) y, en consecuencia,
 restablecía la resistencia a Treg inducida por la IL-6. Estos resultados muestran que la expresión del PGC-1 α está
 estrictamente asociada con la resistencia a Treg y su regulación es modulada por la IL-6.

55 La regulación del PGC-1 α en células T impide la activación de PKB/c-Akt y está estrictamente correlacionada con su
 capacidad de respuesta a la supresión por la intermediación de Treg

A fin de evaluar la hipótesis de los presentes inventores de que la regulación por exceso de PGC-1 α en células T
 está positivamente correlacionada con su sensibilidad a la supresión por intermediación de Treg, se utilizaron
 agonistas y antagonistas de receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa (PPAR α –“peroxisome proliferator-
 60 activated receptor Alpha”). La activación de PPAR α es necesaria para la biogénesis mitocondrial por
 intermediación del PGC-1 α (Finck et al., 2006). La presencia de agonista de PPAR α potenció la expresión del PGC-
 1 α y, simultáneamente, redujo la fosforilación de PKB/c-Akt en las células T. La incubación con el antagonista de
 PPAR α dio como resultado los esperados resultados opuestos (Figuras 4A y 4B) sin inducir toxicidad (Figura 4
 suplementaria). Para investigar la consecuencia funcional de la modulación de PGC-1 α sobre la sensibilidad de las
 células T por lo que respecta a la supresión por intermediación de Treg, se utilizaron las modificaciones de los

ensayos de supresor convencionales. En ausencia de Treg, ninguno de los modificadores de PPAR- α , ni el agonista ni el antagonista, tuvieron una influencia significativa en la proliferación de células T. Sin embargo, la adición del agonista restableció la supresión por la intermediación de Treg en cocultivos, aún en presencia de IL-6 exógena (Figura 4C). En caso contrario, la resistencia a Treg únicamente podría ser inducida por la administración de antagonista de PPAR α (Figura 4D), lo que muestra la importancia de la regulación por exceso de PGC-1 α en células T en lo que respecta a su susceptibilidad a la supresión por intermediación de Treg.

La terapia con IFN- β normaliza la expresión del PGC-1 α y restablece la capacidad de respuesta a Treg en células T de pacientes de MS

La terapia con IFN- β es una terapia convencional en el tratamiento de la MS reincidente-remitente, pero los mecanismos por los cuales el IFN- β ejerce sus efectos no se han comprendido por completo (Dubois et al., 2003). Los presentes inventores analizaron si la terapia con IFN- β mejora la función de las células T de los pacientes de MS también por lo que respecta al control de Treg. Aquí, se encontró que un tratamiento de cuatro meses con IFN- β restablecía la sensibilidad de las células T periféricas a la supresión por intermediación de Treg, hasta cerca de un nivel de células T obtenido de HC (Figura 5A). Ello restablecía la susceptibilidad a la supresión correlacionada con una fosforilación de PKB/c-Akt reducida (Figura 5B) y hacía disminuir la expresión de IL-6R (Figura 5C). A fin de determinar si la capacidad de respuesta de las células T restablecida se correlacionaba con la normalización del PGC-1 α , se analizó la expresión de mRNA de PGC-1 α en células T de pacientes de MS con o sin terapia con IFN- β . Mientras que el PGC-1 α estaba fuertemente regulado por defecto tras la activación en pacientes de MS nuevos en terapia (Figura 5C) se encontró una regulación por exceso significativa del PGC-1 α en pacientes que se sometían a tratamiento con IFN- β , comparable a la expresión en células T activadas procedentes de células T activadas procedentes de HC, lo que muestra el potencial del PGC-1 α como herramienta de diagnóstico para la predicción del éxito terapéutico.

Los datos presentados en esta memoria muestran que el PGC-1 α es una molécula biomarcadora adecuada, que es específica de células T y que se correlaciona directamente con la susceptibilidad de las células T a las Treg. La expresión del PGC-1 α se regula por defecto en respuesta a la IL-6 en células T activadas de pacientes de MS, y bajos niveles de PGC-1 α se correlacionan con la resistencia a Treg. La regulación por exceso inducida por terapia del PGC-1 α puede ser utilizada en virtud de su probada susceptibilidad a la función de las Treg. Por tanto, la regulación por defecto de la expresión del PGC-1 α en células T periféricas es indicativa de la resistencia a las Treg, lo que permite identificar los estados o afecciones autoinmunes asociadas a la resistencia a las Treg. Se muestra también que la regulación por defecto del PGC-1 α es directamente inducible por la IL-6, lo que hace posible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Por otra parte, la fosforilación de PKB/c-Akt impide la incorporación del PGC-1 α a los promotores cognados, perjudicando la capacidad de favorecer la gluconeogénesis y la oxidación de los ácidos grasos en los pacientes de diabetes. La regulación por exceso del PGC-1 α por los agonistas, por otra parte, limitaba la fosforilación de PKB/c-Akt, lo que conducía a sensibilidad a las células T también en presencia de IL-6. El IFN- β mejora significativamente la regulación inmune de las células T autoagresivas en pacientes de MS, al humedecer la transducción de señales a través del recorrido de la IL6, con lo que se restablece su sensibilidad por lo que respecta a la supresión por intermediación de Treg. La mejora de la función de las células T está correlacionada con una normalización de la expresión del PGC-1 α cercana al nivel de los individuos sanos, lo que demuestra que el PGC-1 α es un marcador adecuado para la supervisión de soluciones terapéuticas.

Los resultados también proporcionan una fuerte evidencia de que el análisis bioinformático avanzado es beneficioso para descubrir moléculas que están vinculadas a la función de las células T disregulada. La regulación por defecto del PGC-1 α en células T de MS activadas se vinculó a la fosforilación de PKB/c-Akt mejorada, y a la falta de respuesta de las células T a la supresión por intermediación de Treg. Por otra parte, la inducción de la expresión del PGC-1 α era suficiente para impedir la fosforilación de PKB/c-Akt y, subsiguientemente, restableció su sensibilidad a la supresión por intermediación de Treg, incluso en presencia de la IL-6. Por otra parte, el tratamiento con IFN- β indujo un perfil de expresión normalizado del PGC-1 α que estaba asociado con el restablecimiento de la función de las células T, lo que demuestra que el PGC-1 α es un regulador maestro en la transmisión de la supresión por Treg.

Métodos

Pacientes y controles sanos

Se incluyeron en este estudio 85 pacientes con un curso reincidente-remitente (RRMS, de edades entre 18 y 64 años) y 4 pacientes con un síndrome clínicamente aislado (CIS –“clinically isolated syndrome”–, de edades entre 22 y 53), de manera que todos ellos satisfacían los criterios de McDonald revisados para la esclerosis múltiple. 31 pacientes fueron tratados durante al menos 4 meses con IFN- β . 58 pacientes no habían recibido tratamiento previo ni agentes inmunosupresores seis meses antes del instante temporal del análisis y se encontraban clínicamente estables. Sirvieron como controles PBMC procedentes de controles sanos. Los PBMC fueron aislados dentro de 12 horas desde la recogida de sangre y fueron utilizados directamente en experimentos in vitro. La sangre se mantuvo a temperatura ambiental antes de su enriquecimiento con PBMC. De acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki y con los protocolos aprobados en comités de ética, los pacientes aportaron por escrito su

consentimiento informado antes de participar en este estudio.

Análisis de microconjuntos ordenados

5 Se extrajo y purificó ARN [ácido ribonucleico] total a partir de células T utilizando el QIAshredder, el RNeasy Mini kit y el RNase-Free DNase Set (QIAGEN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó con el Bio-Analyzer (analizador biológico) (Agilent). Se sintetizó ADN [ácido desoxirribonucleico] complementario (cADN) a partir de 100 ng de ARN total utilizando el Ambion WT Expression Kit (Life Technologies). De forma subsiguiente, el cADN se fragmentó y biotiniló utilizando el chip genético WT Terminal Labelling y un juego de control (*control kit*) (Affymetrix). El fragmento de cADN biotinilado fue hibridado al chip genético Human Transcriptome Array 2.0, y, a continuación, el microconjunto ordenado fue lavado y manchado con una Fluidics Station (estación fluidica) 450 (Affymetrix), utilizando un chip genético Hybridization, Wash and Stain Kit (juego de hibridación, lavado y manchado) (Affymetrix). El chip genético fue entonces analizado con el chip genético Scanner 3000 (Affymetrix). Las señales fluorescentes correspondientes a la intensidad de hibridación se normalizaron utilizando el método de promediado en múltiples chips robusto ("Robust Multichip Average"), del Expression Console Software (software de consola de expresión) (Affymetrix). Los presentes inventores extrajeron como representación en pantalla probetas genéticas que mostraban diferencias transcripcionales mayores que dos veces el cambio en la mediana de tres individuos por una simulación policlonal (Welch's t-test: $P < 0,05$). Entonces, los conjuntos de datos que representan genes diferencialmente expresados se aplicaron al Análisis de Recorridos de Ingenuidad (IPA – "Ingenuity Pathways Analysis"–). Se utilizó la puntuación z de activación para la predicción de la regulación funcional y transcripcional en análisis de aguas arriba. La puntuación z se calcula a partir de perfiles de expresión de las probetas genéticas pertenecientes a cada uno de los recorridos, utilizando la información integrada obtenida de sucesos transcripcionalmente alterados observados experimentalmente, recopilados en la base de conocimiento de ingenuidad ("Ingenuity Knowledge Base"). El significado de cada recorrido se estableció utilizando los ensayos exactos de Fisher ($P \leq 0,05$). Se considera significativa una puntuación z de menos (inhibido) o de más (activado) de 2.

Medios de cultivo y anticuerpos

30 Se cultivaron células humanas en un X-VIVO-15 (Lonza, Bélgica). Se llevó a cabo un análisis citométrico de flujo utilizando los siguientes anticuerpos: antihumano CD3 (SK7), antihumano CD3 (UCHT1), antihumano CD4 (RPA-T4), antihumano CD8 (SK1), antihumano CD14 (M5E2), antihumano CD19 (HIB19), antihumano CD25 (M-A251), todos ellos obtenidos de la BD Pharmingen, antihumano CD8 (BW 135/80, Miltenyi Biotec), interleuquina-6 humana biotinilada con Fluorokine® (R&D systems). La viabilidad celular durante el análisis citométrico de flujo fue determinada utilizando 7-AAD y eFluor506 (eBioscience). Para experimentos de bloqueo, los cultivos se suplementaron con anticuerpo neutralizador contra anti-IL-6R (Tocilizumab), inhibidor de PKB/c-Akt VIII (Calbiochem), antagonistas de PPARA (GW6471, Tocris, 0,05 μM –micromolar–) o agonistas de PPARA (GW7646, Tocris, 0,01 μM), conjuntamente con IL-6 (100 ng/ml o 1.000 IU/ml; CellGenix).

Citometría de flujo y clasificación FACS

40 Para el manchado superficial del PBMC o de las células T, se incubaron anticuerpos indicados durante 30 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con PBS. Las células manchadas se midieron en LSRII con FACS Diva Software (BD Bioscience). A fin de detectar el PKB/c-Akt fosforilado (anti-Akt, pS473, BD Phosflow), se fijaron células a 37°C (BD Citofix™ Buffer); se permeabilizaron (BD™ Phosflow Perm Buffer); se lavaron dos veces con solución amortiguadora de manchado BD Pharmingen™, y se mancharon con respecto al anticuerpo indicado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de subconjuntos de células T

50 Se aislaron Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ a partir de PBMC utilizando anti-CD25 MicroBeads (microperlas) (Miltenyi Biotec), y se despojaron de células CD8⁺, CD14⁺ y CD19⁺ contaminantes con Dynabeads (Invitrogen), tal como se ha descrito anteriormente (Jonuleit et al., 2001). La pureza era rutinariamente > 80%, y la capacidad funcional de Treg fue garantizada en ensayos de supresor estándar. Se llevó a cabo un aislamiento de células T CD3⁺ sin tocar, utilizando un juego de aislamiento de células T universal (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para algunos experimentos, el PBMC fue desprovisto de CD3 y de CD25 utilizando Dynabeads correspondientes (1 bolita / célula; Invitrogen).

Análisis de citoquina

60 Se cultivó PBMC desprovisto de Treg y obtenido de HC o de pacientes de MS, en presencia o en ausencia de Treg (en relación de 1:1), y se estimuló con mAb anti-CD3 (OKT-3). Se midieron las citoquinas de los sobrenadantes 72 h después de la estimulación, por medio del Cytometric Bead Array (conjunto ordenado de bolitas citométricas) (BD Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se analizaron con un GraphPad Prism 6 (Statcon).

Ensayos de supresor

65 Se estimularon PBMC (10^5 células) desprovistas de Treg con 0,5 g/ml de mAb anti-CD3 (OKT-3) y se cultivaron en presencia o en ausencia de proporciones de Treg diferentes (Treg : células T entre 1:1 y 1:64) (Jonuleit et al., 2001; Kubach et al., 2007). Se determinó la proliferación de células T al tercer día de los cultivos mediante la adición de 37 kBq/receptáculo ³H-Tdr durante 16 horas adicionales. Se llevaron a cabo algunos experimentos mediante la

5 suplementación de cultivos con mAb neutralizante contra anti-IL-6R (30 ng/ml; Tocilizumab; Roacterna; Roche), o
 10 suplementándolos con IL-6 (100 ng/ml o 1.000 IU/ml; CellGenix). Se añadió a los ensayos individuales inhibidor de
 PKB/c-Akt VIII (0,1 μ M; Calbiochem, Isozyme-selective, Akt1/2. Se llevaron a cabo algunos experimentos mediante
 la suplementación de cultivos con antagonistas de PPARA (GW6471, Tooris, 0,05 μ M) o agonistas de PPARA
 (GW7646, Tocris, 0,01 μ M), conjuntamente con IL-6 (100 ng/ml o 1.000 IU/ml; CellGenix). Para el análisis
 citométrico de las células T proliferantes, PBMC desprovistos de Treg fueron lavados en PBS caliente y manchados
 con CFSE 1 μ M y, tras ello, cultivados conjuntamente, o cocultivados, con o sin Treg (en proporción 1:1), y
 estimulados con 0,5 μ g/ml de anti-CD3 mAb. Se averiguó la proliferación al tercer día, tras excluir las células
 muertas. Se llevó a cabo el análisis en un LSRII (BD Bioscience) y se evaluó utilizando software DIVA (BD
 Bioscience).

RT-PCR y qRT-PCR

15 Se extrajo ARN de 2×10^6 células utilizando un Rneasy Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
 Se generó cADN por transcripción inversa con un Sensiscript RT Kit (Qiagen) y se amplificó por medio de RT-PCR
 cuantitativo (qRT-PCR, 7300 Real Time PCR System (sistema de PCR en tiempo real 7300) (Applied Biosystem)) y
 del QuantiFAST PCR Kit (Qiagen). Los niveles de expresión de mARN de IL-6 relativos (QuantiTect Primer
 (imprimador), Qiagen) fueron normalizados a EF1- α o β -Actina. Se analizó mARN relativo de PPARGC1 α , IRF8,
 FGF19, HNF4A, Hdac, RORA con QuantiTect Primer Assay (ensayo de imprimador QuantiTect) (Qiagen), de
 acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a β -ACT.

20 Análisis estadístico

Los resultados representan valores medios más / menos SEM. El significado estadístico se determinó utilizando el
 ensayo de Mann Whitney desparejo con respecto a HC. Valores P de menos de 0,05 se consideraron significativos y
 se indicaron en las correspondientes cifras. Para algunos experimentos se utilizó la corrección de Bonferroni para
 25 contrarrestar el problema de múltiples comparaciones: $p^* = p \times n$.

Leyendas de las figuras

30 Figura 1: El análisis de chip genético funcional identificó 16 reguladores de aguas arriba de células T de MS
 resistentes a Treg, en comparación con las células T sensibles a Treg de HC.

A) Una vista esquemática de conjunto de la disposición experimental utilizada para el análisis con el
 chip genético Affymetrix. B) Representación gráfica en volcán de genes de respuesta simulatoria que
 se expresan diferentemente en células T de HC y de MS que exhiben, estadísticamente, un cambio
 35 doble. C) Análisis de recorrido de células T activadas. Panel superior: números de reguladores de
 aguas arriba para los que se ha predicho que son activados en células T activadas de MS, de HC, o de
 ambos. Panel inferior: números de reguladores de aguas arriba para los que se ha predicho que son
 inhibidos en células T activadas de pacientes de MS, de HC, o de ambos. D) Se examinaron
 reguladores de aguas arriba que tenían estadísticamente una significación de más de +1 o -1 (en la
 40 puntuación z) en lo que respecta a una conexión con el recorrido de intercambio de señales de IL-6 /
 PKB/c-Akt (A: El regulador hace aumentar la producción / actividad de IL-6/Akt; B: El regulador hace
 disminuir la producción / actividad de IL-6 / Akt; C: La actividad / expresión del regulador es
 incrementada por IL-6/Akt; D: La actividad / expresión del regulador es reducida por IL-6/Akt; y E: Sin
 información).

45 Figura 2: El qRT-PCR identifica el PGC-1 α como una potencial molécula vinculada a la resistencia a Treg de las
 células T de MS.

50 Células T CD4⁺ o CD8⁺ obtenidas de pacientes de MS (en rojo) o de HC (en negro) se dejaron sin estimular o fueron
 activadas con mAb anti-CD3 o anti-CD28 fijados en placa. Los niveles de expresión de mARN de FGF 19, HNF4A,
 Hdac, RORA, IRF8 y PPARGC fueron detectados por qRT-PCR. Se utilizó β -Actina como gen constitutivo. Se
 muestran cuatro experimentos independientes en forma de mediana, con valores p de intervalo intercuartil relativos
 a células T de HC. B) Células T totales (panel izquierdo), o bien células T CD4⁺ o CD8⁺ (panel derecho) obtenidas
 55 de pacientes de MS (en rojo) o de HC (en negro), se dejaron sin estimular o fueron activadas con mAb anti-CD3 y
 anti-CD28 fijados en placa. Se detectaron los niveles de expresión de mARN de PPARGC1A por medio de qRT-
 PCR. Se utilizó β -Actina como gen constitutivo. Se muestran de seis a once experimentos independientes en forma
 de mediana con intervalo intercuartil, con valores p relativos a células T de HC. Izquierda: se muestran niveles de
 expresión de PPARGC1A en células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas, normalizados con respecto a las células T en reposo.
 Derecha: se muestran niveles de expresión de PPARGC1A en células T CD3⁺ en reposo, normalizados con respecto
 60 a la β -Actina de gen constitutivo.

Figura 3: La IL-6 induce una regulación por defecto de PGC-1 α en células T activadas y, con ello, media en la
 resistencia a Treg.

A) Panel superior: CD3⁺ se cocultivaron células T y Treg CD3⁺ en presencia (en gris) o en ausencia (en

negro) de IL-6, y se estimularon con mAb anti-CD3. Se determinó la proliferación por incorporación de $^3\text{H-Tdr}$ al tercer día, y se presentó visualmente como valor medio \pm SEM de mediciones por triplicado. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes. Panel inferior: se cultivaron PBMC obtenidos de HC durante 24 h con (en gris) o sin (en negro) IL-6, se lavaron abundantemente y se aislaron las células T CD4^+ o CD8^+ . Las células se dejaron sin estimular o se activaron con mAb anti-CD3 y anti-CD28 fijados en placa, durante cuatro horas. Se muestran los niveles de expresión de mRNA de PGC-1 α (PPARGC1A) en células T CD4^+ y CD8^+ (TC), normalizados con respecto a las células T en reposo. Se utilizó β -Actina como gen constitutivo. Las barras representan valores medios de cuatro experimentos, con valores p relativos a TC sin IL-6. B) Se analizó la fosforilación de PKB/c-Akt por medio de citometría de flujo en el interior de células T CD3^+ , una vez transcurridas 24 h de cultivo, con (en negro) o sin (en gris) IL-6. C) Determinación citométrica de flujo de fosforilación de PKB/c-Akt. Se incubaron células T obtenidas de HC durante 24 h, en presencia (en gris) o en ausencia (en negro) de IL-6, o en presencia de IL-6 y de mAb de IL-6 (gris, con franjas blancas). Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI –“mean fluorescence intensity”–) de pPKB/c-Akt en células T, un único resultado representativo de cinco experimentos independientes. D) Se cultivaron PBMC obtenidos de HC durante 24 h en presencia de IL-6 (en gris) o en presencia de IL-6 e inhibidor VIII (en franjas, de 0,01, 0,1 y 1 μM). Se analizó la fosforilación de PKB/c-Akt por citometría de flujo dentro de células T CD3^+ . Se muestran las medias aritméticas de los valores de MFI, incluyendo la desviación típica de un experimento representativo (n = 6).

Figura 4: La presencia de agonistas de PPAR α en cocultivos induce una regulación por exceso de PGC-1 α y, con ello, restablece la sensibilidad a las células T también en presencia de IL-6.

A) Se cultivaron PBMC obtenidos de HC durante 24 h con medios (en negro), antagonista de PPAR α (en azul) o agonista de PPAR α (en verde), se lavaron abundantemente y se detectó el nivel de expresión de mRNA de PGC-1 α en células T activadas, por medio de qRT-PCR. Se utilizó β -Actina como gen constitutivo. Las barras representan el valor medio de la expresión de PPAR-1 α de tres experimentos diferentes. B) Se analizó la fosforilación de PKB/c-Akt por citometría de flujo en el interior de las células T CD3^+ tras 24 h de cultivo con medios (en negro), agonista de PPAR α (en verde) o antagonista de PPAR α (en azul). Se muestra uno representativo de cuatro experimentos independientes. C) Se cocultivaron células T y Treg en presencia (en gris) o en ausencia (en negro) de IL-6 o en presencia de IL-6 y agonista de PPAR α (en verde), y se estimularon con mAb anti-CD3. Se determinó la proliferación por la incorporación $^3\text{H-Tdr}$ al tercer día, y se presentó visualmente en forma de valor medio \pm SEM de mediciones por triplicado. Se ha mostrado uno de entre tres experimentos independientes. D) Se cocultivaron células T y Treg en presencia (en azul) o en ausencia (en negro) de antagonista de PPAR α , y se estimularon con mAb anti-CD3. Se determinó la proliferación por la incorporación de $^3\text{H-Tdr}$ al tercer día, y se presentó visualmente en forma de valor medio \pm SEM de mediciones por triplicado. Se ha mostrado uno de entre tres experimentos independientes.

Figura 5: La resistencia a Treg de células T obtenidas de pacientes de MS se mejoró tras la terapia con IFN- β y se correlacionó con la regulación por exceso de PGC-1 α .

A) Se cocultivaron PBMC desprovistos de Treg, obtenidos de pacientes nuevos en terapia (en negro), de pacientes de MS tratados con IFN- β (en azul), o de HC (en blanco), con Treg alogénicas, y se estimularon con mAb anti-CD3. Se determinó la proliferación de células T mediante la incorporación de $^3\text{H-Tdr}$ al tercer día. Ambas representaciones gráficas muestran el porcentaje de supresión en presencia de Treg (relación 1:1), normalizado con respecto a la proliferación de PBMC por sí sola, en forma de mediana con intervalo intercuartil (n = 15), con valores P relativos a la supresión de HC o de pacientes de MS nuevos en terapia. A fin de evitar la proporción de errores de familiaridad, se utilizó la corrección de Bonferroni, indicada por (p*). B) Se determinó la fosforilación de PKB/c-Akt por citometría de flujo dentro de células T CD3^+ obtenidas de pacientes nuevos en terapia (en rojo), de pacientes de MS tratados con IFN- β (en azul) o de HC (en negro). El histograma gris representa un control isotópico de MS. El panel inferior muestra MFI de fosforilación de PKB/c-Akt de seis experimentos diferentes, con valores p relativos a MFI o MS. C) Se determinó la expresión de IL-6R dentro de PBMC obtenidos de HC (en negro), de pacientes nuevos en terapia (en rojo) o de pacientes de MS tratados con IFN- β (en azul), por citometría de flujo. Las representaciones gráficas en cajas muestran el porcentaje de células de IL-6R $^+$ dentro de las células T CD3^+ de seis donantes independientes, y se muestran valores p relativos a la expresión de IL-6R de pacientes de MS nuevos en terapia o de HC. D) Células T procedentes de pacientes nuevos en terapia, de pacientes de MS tratados con IFN- β o de HC se dejaron sin estimular o fueron activadas durante 4 h con mAb anti-CD3 o anti CD28 fijados en placa. Se detectó mediante qRT-PCR el nivel de expresión de mRNA de PGC-1 α en células T activadas. Se utilizó β -Actina como gen constitutivo. Se muestran seis experimentos independientes en forma de mediana con intervalo intercuartil (n = 6), con valores p relativos al nivel de expresión de TC de HC o de pacientes de MS nuevos en terapia; a fin de evitar la proporción de errores de familiaridad, se usó la corrección de Bonferroni, indicada como p*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la detección de capacidad de respuesta impedida de células T CD4+ a células T reguladoras (Treg), a la que se hace referencia como resistencia a Treg, mediante la medición de los niveles de expresión de coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa, PPARGC1A (PGC-1 α) en células T CD4+ activadas, ex vivo.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los niveles de expresión de PGC-1 α se comparan con los niveles de expresión de PGC-1 α de células T CD4+ y CD8+ sensibles a Treg y activadas, de tal manera que una regulación por defecto del PGC-1 α dentro de las células T CD4+ activadas, en comparación con las células T CD4+ sensibles a Treg y activadas, es indicativa de la resistencia a Treg.
- 15 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el cual una regulación por exceso de PGC-1 α se correlaciona con una capacidad de respuesta de las células T CD4+ activadas a la supresión por intermediación de Treg.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la resistencia a Treg se correlaciona con una producción de IL-6 acelerada tras la estimulación del receptor de células T (TCR), la fosforilación potenciada de PBK/c-Akt y/o una expresión del receptor de IL-6 (IL-6R) incrementada.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la capacidad de respuesta impedida de las células T CD4+ es restablecida mediante la normalización de la expresión de PGC-1 α en células T resistentes a Treg y activadas, con IFN- β .
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual, además del PGC-1 α , se determinan los niveles de expresión de los reguladores de aguas arriba de células T resistentes a Treg HNF4A, Hdac, RORA, ESRRA, LPIN1, dentro de las células T CD4+, y se comparan con células T sensibles a Treg.
- 35 7. Un método de representación en pantalla, in vitro, para la detección de una enfermedad o una afección autoinmune, el cual comprende las etapas de generar un perfil de expresión genética funcional midiendo los niveles de expresión de coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa, PPARGC1A (PGC-1 α) en células T CD4+ activadas obtenidas de pacientes que sufren de una enfermedad o afección autoinmune, y comparar el perfil de expresión genética obtenido con el perfil de expresión procedente de células T CD4+ sensibles a Treg, obtenidas de controles sanos.
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual la generación de un perfil de expresión genética funcional comprende las etapas de:
 - a. extraer y purificar ARN procedente de células T,
 - b. sintetizar cADN a partir de las plantillas de ARN,
 - c. etiquetar cADN con una molécula marcadora e hibridarla a un chip genético,
 - d. analizar los chips genéticos mediante la detección de la intensidad de la molécula marcadora.
- 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el cual, además del PGC-1 α , se determinan los niveles de expresión de los reguladores de aguas arriba de células T resistentes a Treg HNF4A, Hdac, RORA, ESRRA, LPIN1, dentro de células T CD4+, y se comparan con células T sensibles a Treg.
- 50 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el cual se detecta la capacidad de respuesta impedida de células T CD4+ y/o CD8+ a células T reguladoras (Treg) por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 55 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el cual la enfermedad o afección autoinmune es artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico (SLE), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamatorio autoinmune, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, soriasis, pénfigo común, penfigoide.
- 60 12. Uso del coactivador gamma de receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa, PPARGC1A (PGC-1 α) en un sistema de representación en pantalla ex vivo, utilizando células T CD4+ activadas, para la detección de la capacidad de respuesta impedida de células T CD4+ a células T reguladoras (Treg), a la que se hace referencia como resistencia a Treg.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 para la identificación de agonistas que regulan por exceso la expresión del PGC-1 α en células T activadas aisladas de pacientes autoinmunes.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 para supervisar el proceso de tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección autoinmune.

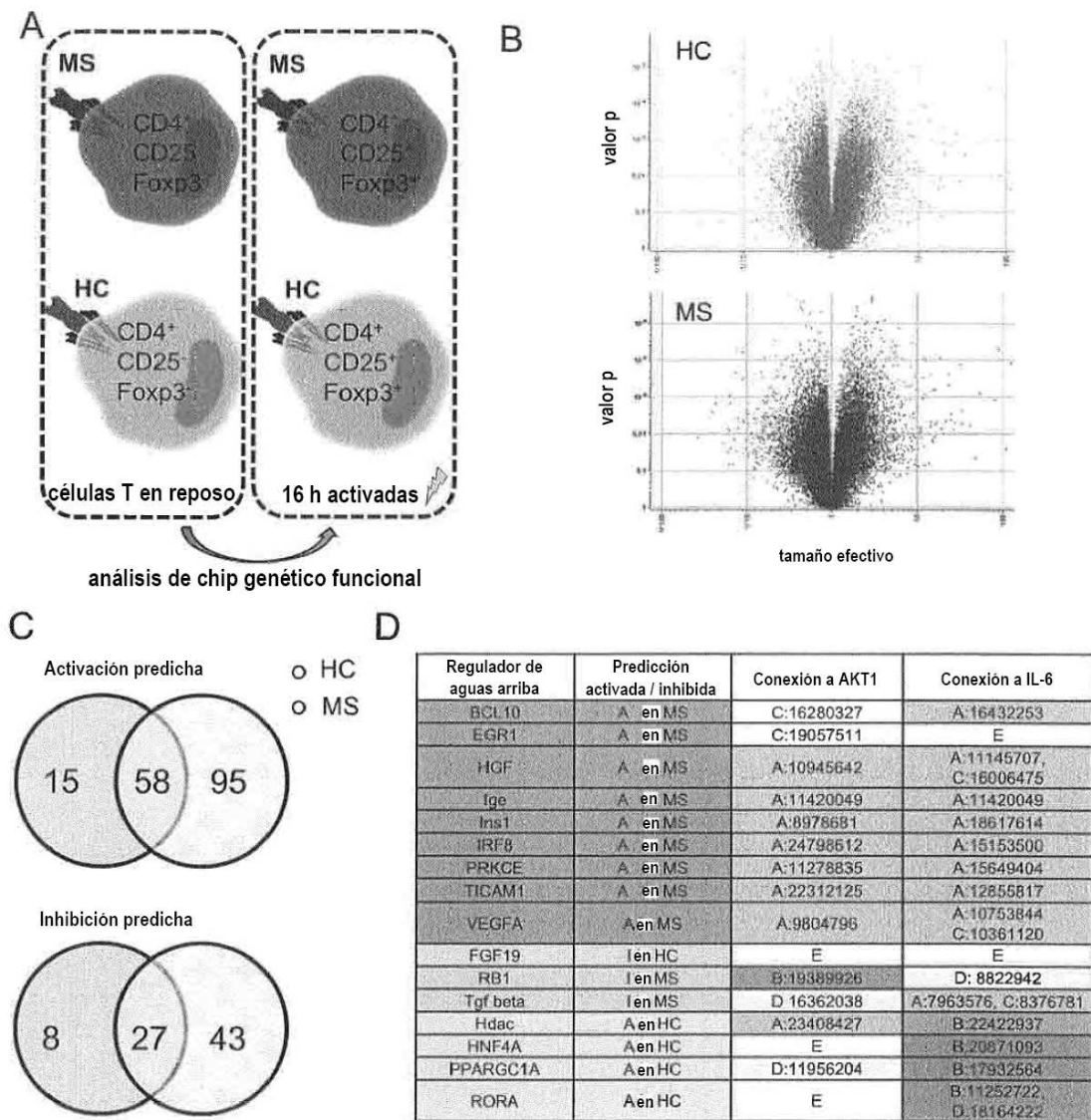


Figura 1

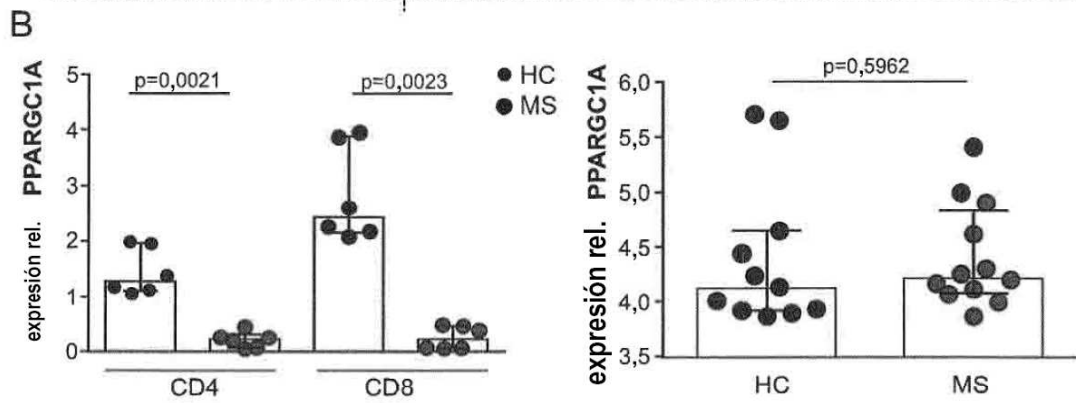
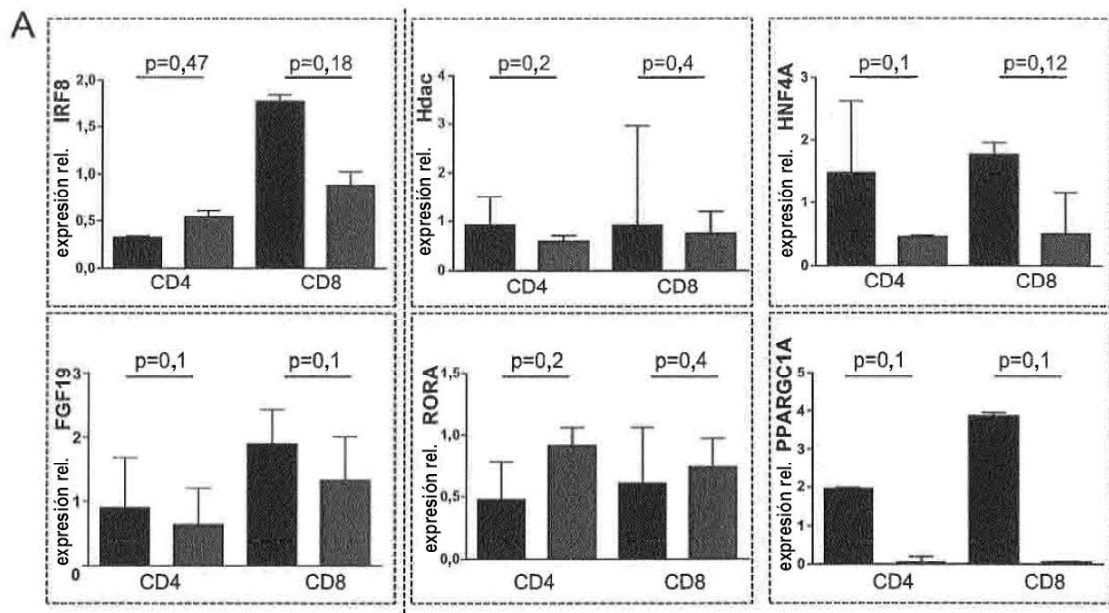


Figura 2

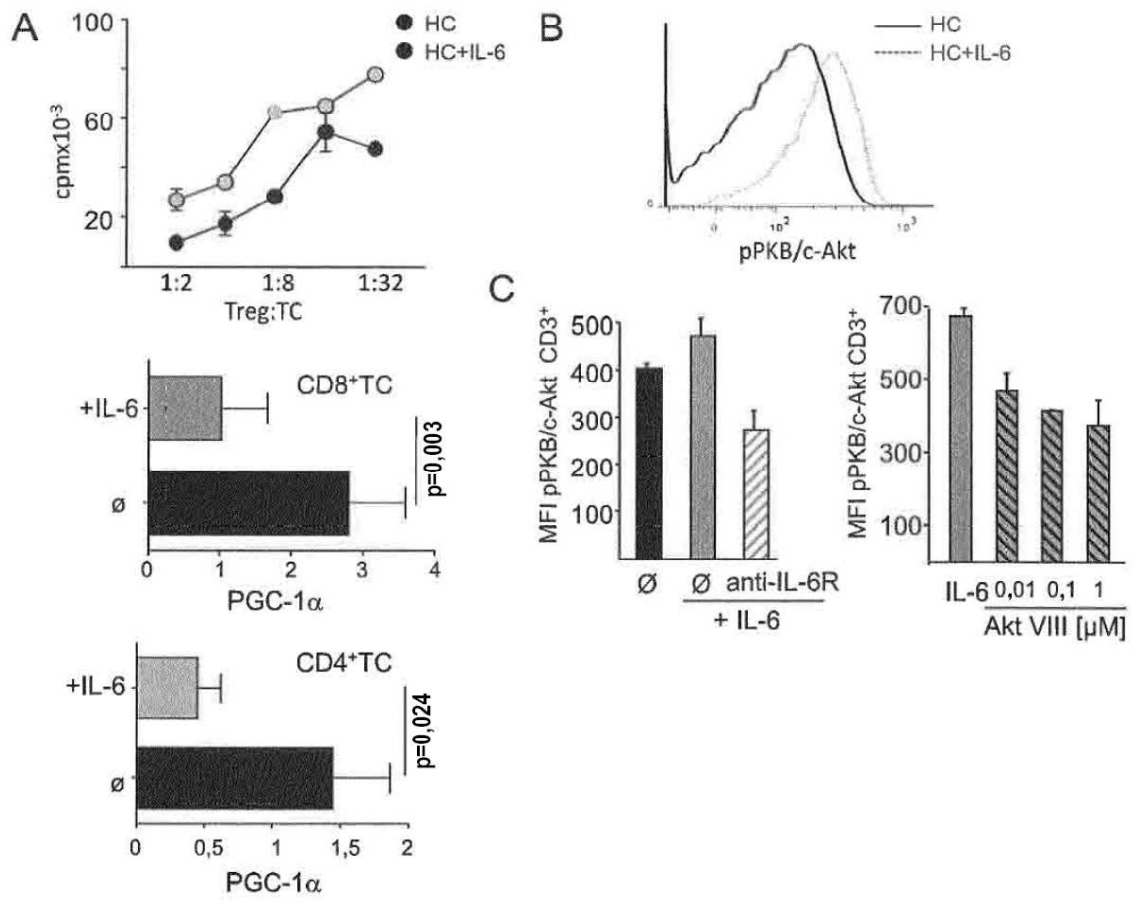


Figura 3

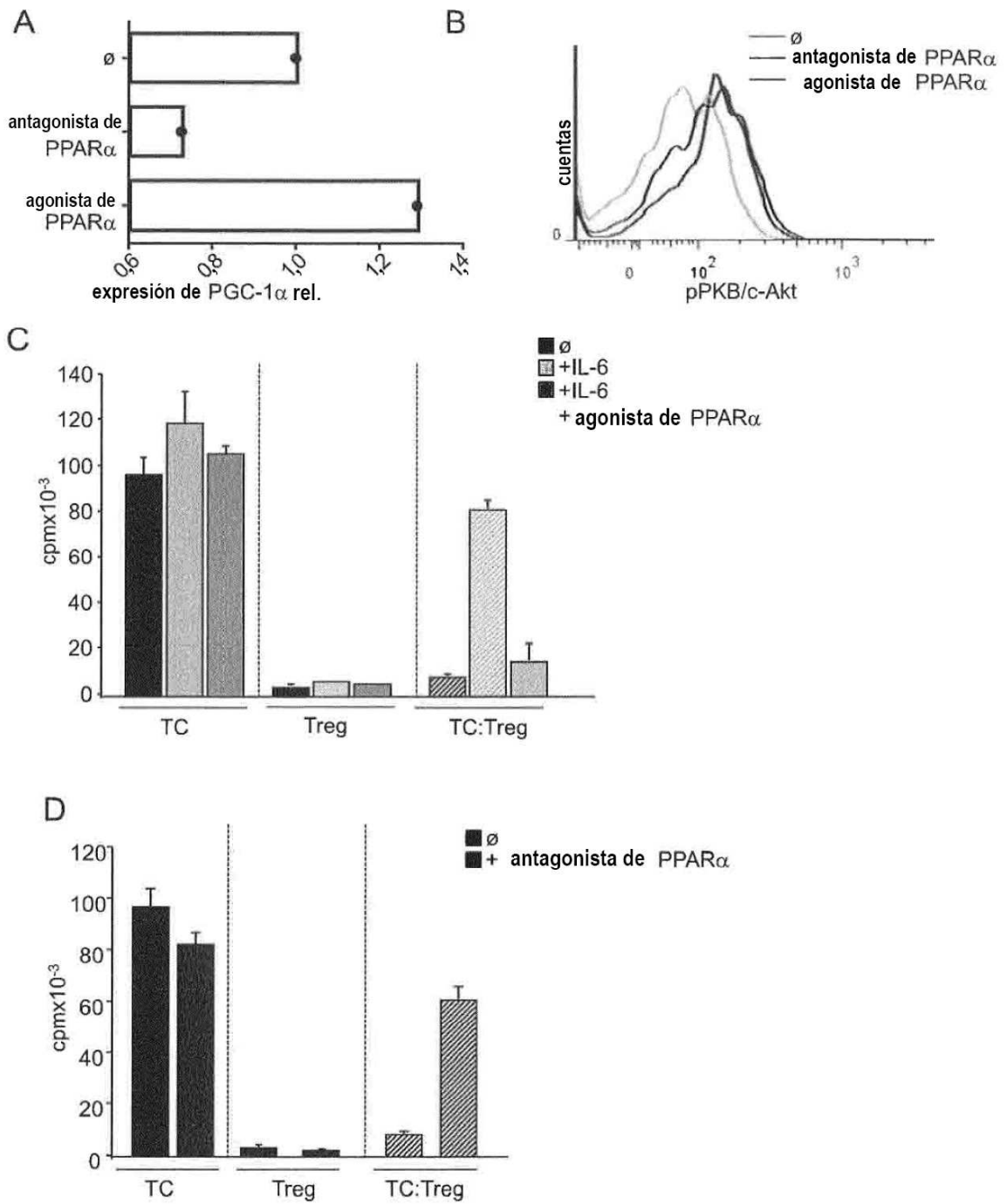


Figura 4

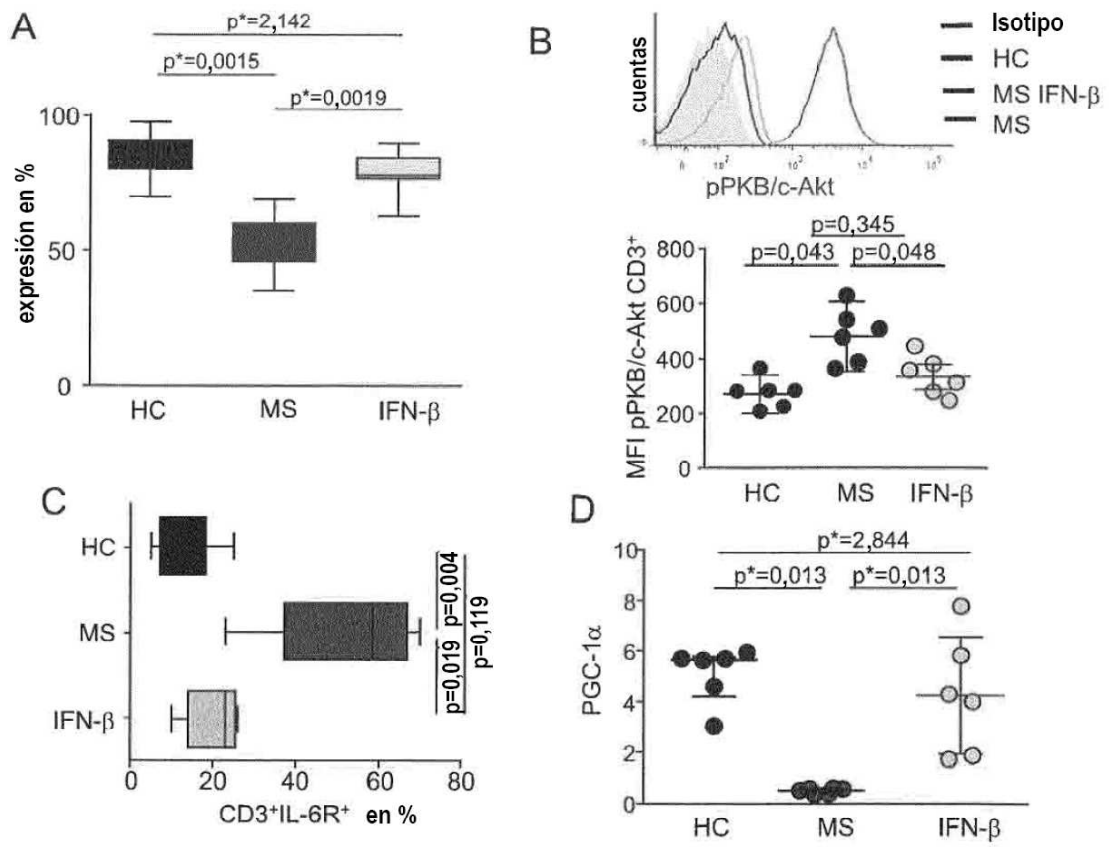


Figura 5