



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 937**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02090300 .1**

86 Fecha de presentación : **23.08.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1420253**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2004**

54 Título: **Procedimiento de detección y aislamiento de linfocitos T que reconocen un antígeno definido.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es:
**Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin
Schumannstrasse 21/22
10117 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Frentsch, Marco;
Rothe, Martin y
Thiel, Andreas**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

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

Procedimiento de detección y aislamiento de linfocitos T que reconocen un antígeno definido.

La invención se refiere a la utilización de CD154 para detectar y aislar *in vitro* linfocitos T que reconocen un antígeno definido, y un procedimiento para detectar y aislar linfocitos T en suspensiones celulares o líquidos corporales, que reconocen un antígeno definido.

El sistema inmunológico consiste en células y moléculas que circulan en el cuerpo y cuya homeostasis y cooperación son sintonizadas entre sí a través de citoquinas y factores de crecimiento. Las células no necesitadas se eliminan por apoptosis. Estos mecanismos se ven afectados por influencias exteriores o predisposiciones genéticas de las maneras más variadas. El sistema inmunológico tiene un papel central en el desarrollo de muchas enfermedades, en particular alergias, inflamaciones y enfermedades autoinmunitarias. Es responsable de una inmunidad reforzada después de las vacunas, sin embargo falla en el desarrollo de enfermedades tumorales.

Las células dendríticas (DC) son las vigilantes del sistema inmunológico y están localizadas en el cuerpo en aquel punto donde pueden penetrar sustancias extrañas y posiblemente peligrosas. Son células que presentan antígenos profesionales, que toman y digieren el antígeno, que presentan fragmentos peptídicos de linfocitos T antígeno específicos y que los activan en este caso. Los precursores inmaduros de las DC se desplazan continuamente a través de la sangre a los órganos linfáticos, donde pueden diferenciarse bajo determinadas circunstancias en DC's maduras. Hay diferentes células precursoras que pueden madurar en diferentes tipos de DC's. Estos diferentes tipos de DC's reaccionan también de diferente manera a los antígenos por la expresión de determinadas moléculas de la membrana y citoquinas. De esta manera controlan la activación de los linfocitos T, que luego pueden ser pro- (Th1) o antiinflamatorios (Th2), reguladores (Tr) o tolerantes (Ta). El modo de activación de los linfocitos T se determina a través de señales de activación coestimuladoras de células que presentan antígenos. Las señales de activación son ligandos para receptores de los linfocitos T. Estos ligandos se encuentran en la superficie de la APC, están ligados a la matriz extracelular o son segregados por las células, como las citoquinas. Además de la activación específica de los antígenos por señales a través del receptor de antígenos de los linfocitos T y ligandos coestimulantes sin embargo está descrita también una activación no específica de linfocitos T; p. ej. a través de citoquinas o lectinas.

Sin embargo, la totalidad de las variaciones moleculares en la reacción de activación y diferenciación funcional de los linfocitos T actualmente sólo está aclarada de forma incompleta. Así como también la captación del estado de activación y funcional de los linfocitos T, que reconocen un determinado antígeno, sólo es posible de forma imprecisa en el estado de la técnica actual.

Para aplicaciones clínicas en el diagnóstico de enfermedades y en la investigación es esencial poder detectar particularmente aquellos linfocitos T específicos que son activados o activables a través de un determinado antígeno. Además es deseable poder aislar aquellos linfocitos T antígeno específicos de las mez-

clas celulares particularmente para objetivos terapéuticos celulares.

En el estado de la técnica se divulgan varios procedimientos, con los cuales puede determinarse el estado de activación y funcional de los linfocitos T. De este modo, la patente DE 100 21 834 A1 divulga moléculas de ARNm para el uso como indicadores para el estado funcional de los linfocitos T, donde las moléculas de ARNm, en el caso de que los linfocitos T sean activados, en comparación con el estado normal o de reposo, se expresan como aumentadas o disminuidas. Mediante la determinación de la interacción entre las secuencias complementarias de ácidos nucleicos hibridizados, es posible determinar diferencias en la capacidad de expresión de moléculas de ARNm, permitiendo deducir el estado de activación de los linfocitos T. Además, este documento divulga la utilización de polipéptidos, que son codificados por las secuencias de nucleótidos, y los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos así como la utilización de estos anticuerpos para verificar el estado de activación y funcional de los linfocitos T.

La patente DE 37 37 703 A1 divulga anticuerpos, dirigidos contra un polipéptido activador de neutrófilos y que pueden emplearse como diagnóstico, para detectar y caracterizar estructuras activadas de la respuesta inmunitaria celular.

La patente DE 42 26 974 C2 divulga un procedimiento y un dispositivo para la preparación y separación de suspensiones celulares. El dispositivo de separación descrito y el procedimiento para la preparación continua de una suspensión celular puede utilizarse para separar diferentes componentes, por ejemplo de la sangre humana, donde las células, que están relacionadas con la respuesta inmunitaria celular, pueden ser purificadas específicamente.

En la patente US-SP 5,874,302 se divulga un procedimiento, con el cual se cultivan linfocitos T y los linfocitos T obtenidos de esta manera se emplean en tratamientos clínicos de tumores. Según la patente US-SP 5,874,302 se usa sangre como materia de base para la preparación de la suspensión de cultivos de células T, donde la correspondiente materia inicial es cocultivada con determinadas células tumorales.

La patente CA 1,296,622 divulga un procedimiento y un dispositivo para determinar el estado regulador inmunitario de los leucocitos. Los leucocitos se estimulan con sustancias estándar, para determinar el estado regulador inmunitario, por ejemplo con la ayuda de anticuerpos marcados. En primer lugar se aumenta para tal objeto una prueba de células mononucleares periféricas del paciente, que ha recibido un medio de influencia inmune, y sucesivamente se determina, en una parte alícuota de la prueba aumentada, el porcentaje de células mononucleares, las cuales expresan un antígeno de activación *in vitro*. Sucesivamente se compara el porcentaje con un valor predeterminado del porcentaje como indicador del efecto *in vitro*, por el cual puede determinarse el estado regulador inmunitario del paciente o el efecto de la terapia de influencia inmunitaria sobre el estado regulador inmunitario. A las subclases de las células mononucleares por determinar pertenecen por ejemplo los linfocitos T, linfocitos T citotóxicos y ayudantes de linfocitos T.

En la patente WO 99/58977 se describe un procedimiento para la selección directa de linfocitos T antígeno específicos. Los linfocitos T son separados aquí

por medio de la producción de citoquinas mediante citometría de paso o clasificación celular magnética. Se seleccionan aquí aquellos linfocitos T activados determinados, que expresan, después de la estimulación con un antígeno, una determinada citoquina o varias determinadas citoquinas.

En Berner *et al*, *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 59, 2000, páginas 190-195, se describe un procedimiento para la detección de células T activadas con antígenos mediante la determinación de la expresión de CD154 en pacientes que padecen artritis reumatoide. La expresión aumentada de CD154 en linfocitos T CD4 está relacionada con una activación aumentada de células T CD4 y una actividad patológica aumentada.

Además es imposible con los procedimientos conocidos distinguir la activación por una infección viral o bacteriana de una activación por una reacción autoinmunitaria o por un rechazo de un trasplante, aunque dicho diagnóstico es deseable desde los puntos de vista diagnósticos y clínicos. Mediante la detección deficiente de linfocitos T activados en una prueba biológica tampoco es posible separar intencionadamente las células correspondientes, puesto que éstas para ello deben ser determinadas en primer lugar de forma inequívoca.

Hasta ahora no se han descrito procedimientos diagnósticos inmunitarios que permitan una detección rápida y fácil de la totalidad de linfocitos T antígeno específicos y su aislamiento posterior. En las enfermedades más variadas es de mayor interés diagnóstico y terapéutico el hecho de detectar directamente los linfocitos T antígeno específicos que dirigen centralmente las respuestas inmunitarias y por consiguiente también las más diversas inmunopatógenesis o de aislarlos para fines terapéuticos celulares, como la transferencia de células T adoptiva. Esto se refiere a enfermedades como alergias y enfermedades autoinmunitarias, basadas en reacciones inmunitarias defectuosas, así como también enfermedades infecciosas crónicas, tumores o leucemias.

Los procedimientos habituales se basan en dos estrategias diferentes:

- (i) La detección "estructural" de linfocitos T antígeno específicos está basada en el marcado de receptores de células T marcados por los linfocitos T mediante multímeros MHC, que se unen a los respectivos péptidos antígenos (US 5,635,363 / FR 9911133). Las desventajas de dichos procedimientos consisten en depender por un lado del genotipo MHC marcado por los individuos por examinar y por otra parte se unen las moléculas MHC sólo con un epítipo peptídico inmunodominante del respectivo antígeno. Cada agente debe por consiguiente prepararse individualmente conforme al genotipo y al epítipo peptídico inmunodominante, que además sólo es conocido en pocos antígenos y también sólo para pocos MHC-alelos del antígeno. Además los multímeros MHC-II esenciales para la determinación y el aislamiento de linfocitos Th CD4⁺ antígeno específicos restringido en MHC-II no habían podido ser preparados hasta ahora para una aplicación de suficiente calidad a causa de

las características estructurales particulares de la molécula MHC-II.

- (ii) pruebas funcionales de linfocitos T antígeno específicos se basan bien en la proliferación reactiva del antígeno tras la estimulación con antígeno, que sin embargo sólo pueden detectarse transcurridos 3-5 días, o en la expresión reactiva del antígeno de moléculas de activación o secreción de citoquinas. Aunque los marcadores de la activación descritos hasta ahora en parte también están marcados por linfocitos T especiales no activados y por lo tanto no son específicamente suficientes, no puede determinarse por medio de la expresión "reactiva" de citoquinas la totalidad de linfocitos T específicos. Dada la detección deficiente de linfocitos T específicamente activados en una muestra biológica, asimismo no es posible separar intencionadamente estas células correspondientes, puesto que primero deberían ser determinadas para este fin.

Los procedimientos conocidos, en los cuales se detectan y aíslan los linfocitos T específicos por su secreción de citoquina, por ejemplo según la WO 99/58977, la totalidad de todos los linfocitos T específicos no puede ser determinada y aislada, puesto que a menudo cada célula T activada se caracteriza por programas individuales de citoquinas.

También es desventajoso en el procedimiento conocido del aislamiento de linfocitos T vivos por medio de la producción de citoquinas, que las células en el momento de su máximo rendimiento de secreción sean extraídas del cultivo, para aplicar a las mismas una "matriz de captura" para la respectiva citoquina específica. Luego deben cultivarse de nuevo las células durante un tiempo breve. Esto aumenta considerablemente el gasto técnico para la producción de linfocitos T específicos. Justo en los últimos años se han vuelto a describir en diferentes publicaciones los linfocitos T reguladores (Tr/Treg) descritos, a los no se pueden asociar pruebas de citoquina definidas, e.d. las células no pueden detectarse o aislarse mediante una secreción de citoquina. Además la expresión de determinadas citoquinas (p. ej. IL-10) depende también definitivamente del tipo de activación *in vitro* elegido.

La detección hasta ahora y el aislamiento de linfocitos T específicos es limitada también, en efecto es conocida una serie de moléculas biológicas, las cuales pueden tomarse como indicadores o marcadores para determinados linfocitos T activados, sin embargo actualmente es imposible decidir, debido al número delimitado y a la calidad del marcador de activación disponible, mediante la determinación de uno de estos marcadores, si se encuentran los linfocitos T en el estado deseado. Por ejemplo se expresa el marcador de activación CD69 de todos los linfocitos T tras la activación. Sin embargo también aquellas influencias del estrés conducen a la expresión de CD69, de modo que por determinación de este marcador ningún pronóstico sobre los linfocitos T antígeno específicos es posible.

La misión de la presente invención por lo tanto es proveer procedimientos, con los cuales todos los linfocitos T antígeno específicos puedan detectar-

se o aislarse fácilmente, económicamente y de forma segura independientemente de su potencial funcional.

La presente invención resuelve este problema técnico por un uso de CD154 para la detección y/o el aislamiento de linfocitos T, que reconocen un determinado antígeno.

CD154 es un miembro de la familia de genes TNF y se expresa entre otras en diferentes células, en particular linfocitos T. CD154 se regula de manera descendente durante una hasta tres horas después de la activación de los linfocitos T estimulados.

Los linfocitos representan el soporte específico de la respuesta inmunitaria, siendo conocidas dos grandes poblaciones: los linfocitos B y T. Los linfocitos T poseen numerosas moléculas de superficie, de las cuales la proteína CD4 y CD8 es de una importancia particular. Los linfocitos T CD4 son denominados también células T ayudantes (células Th), puesto que ayudan en la activación de otras células mediante la producción de sustancias mensajeras.

Linfocitos y otros leucocitos expresan muchas moléculas diferentes en su superficie celular. Algunos aparecen sólo brevemente durante determinadas fases de diferenciación o después de la activación de las células. Otras moléculas son constantes y típicas para la respectiva serie celular. Dichos antígenos que se expresan constantemente pueden usarse como marcadores para determinadas poblaciones celulares. Hay una nomenclatura unitaria para marcadores de superficie celular, el sistema de grupos de diferenciación CD (CD = cluster of differentiation), en el cual los marcadores son numerados correlativamente. Así por ejemplo existen en linfocitos NK y T tanto moléculas CD 154 como también CD 165 u otras moléculas.

Resultó sorprendente que puede utilizarse CD154 para detectar linfocitos T independientemente de su potencial funcional. La ventaja sorprendente del uso de CD154 para la detección y la separación de linfocitos T es que los linfocitos T independientemente de su función pueden detectarse o aislarse con seguridad, e. d. todos los linfocitos T antígeno específicos pueden separarse y determinarse en una prueba. Por consiguiente está disponible de forma ventajosa un nuevo candidato practicable para la determinación de linfocitos T antígeno específicos por el uso según la invención.

Según una forma de realización particular de la invención los linfocitos T son linfocitos Th, en particular linfocitos Th CD4⁺ y/o CD8. Para el reconocimiento de antígenos, las poblaciones de linfocitos de células T usan un receptor de células T (TZR), que representa una molécula heterodímera, que consiste en diferentes combinaciones de cadenas. La mayor parte de los linfocitos T lleva un receptor de células T alfa/beta. Estos linfocitos T poseen otras moléculas superficiales, en particular la proteína CD4 y CD8. Los linfocitos CD8 son estimulados por antígenos, que se presentan por moléculas de la clase I del MHC y como linfocitos T citolíticos, siendo de una importancia decisiva para la defensa vírica. Los linfocitos T CD4 reconocen los antígenos, que se presentan por moléculas MHC de la clase II y tienen una proporción esencial en la defensa de bacterias, hongos, protozoos y otros parásitos.

En otra forma de realización preferida de la invención se detectan y/o se obtienen linfocitos T in-

flamatorios, antiinflamatorios, reguladores y/o supresivos.

La invención se refiere también a un procedimiento para la detección y/o el aislamiento de linfocitos T antígeno específicos en una suspensión después de la activación con un antígeno, en el cual se pone en contacto la suspensión con un inhibidor del sistema CD40/CD154, se determina el CD154 intracelular o y/o extracelular y en el cual se detectan y/o se aíslan las células que presentan CD154.

Es sorprendente que poniendo "en contacto" la suspensión o prueba a analizar con un inhibidor del sistema CD40/CD154 se pueda determinar el CD154 de manera intra y/o extracelular y por consiguiente las células, que presentan CD154, pueden detectarse y aislarse o separarse, por ello, en estas células en particular se trata de la totalidad de linfocitos Th CD4⁺ antígeno específicos.

CD40 es una glicoproteína de un tamaño de 45-50 kDa anclada en la membrana y procedente de la familia de genes receptores TNF (familia de genes receptores de tumor-necrosis-factor). Está marcada por diferentes tipos de células hemopoéticas, pero también por células epiteliales y endoteliales, carcinomas, fibroblastos y células musculares. Puede ser ligada por CD154, que, por consiguiente es miembro de la familia de genes TNF y puede expresarse igualmente en muchas células con funciones muy diferentes. CD40 se expresa en diferentes células, como por ejemplo linfocitos B, células dendríticas, monocitos/macrófagos, células cebadas, células de origen/precursoras hemopoéticas (humanas), células epiteliales del timo (de ratón), células endoteliales, fibroblastos (de ratón), células musculares (humanas) y/o carcinomas (humanos). CD154 se expresa por ejemplo en linfocitos T, células dendríticas activadas (humanas), monocitos, células cebadas (humanas), granulocitos basófilos/ eosinófilos (humanos), linfocitos NK (de ratón), timocitos fetales (de ratón) y/o células B (humanas).

Conforme a las muestras de expresión muy heterogéneas sobre diferentes tipos de células están descritas numerosas interacciones CD40/CD154. El sistema CD40/CD154 es un ejemplo para diferentes sistemas, que se basan en interacciones de receptor-ligandos y como tales tienen una gran importancia en las reacciones del sistema inmunológico. Las interacciones CD40/CD154 entre los linfocitos T y las células dendríticas (DC) entre otras son importantes en la inducción y regulación de la respuesta inmunitaria. Las interacciones CD40/CD154 ocupan una posición especial en el caso del desarrollo de reacciones de anticuerpos humores. Una importancia clínica particular se manifestó en el llamado síndrome hiper IgM del cromosoma X, de una enfermedad inmune, en la cual la expresión de un CD154 no funcional da lugar a una formación de anticuerpos muy reducida y a infecciones piógenas. En otras células, la transmisión de señales a través de CD40/CD154 influye sin embargo también en el desarrollo de trombos *in vivo* y refuerza el desarrollo de arteriosclerosis.

El significado del CD154 marcado por linfocitos T es por consiguiente esencial, sobre todo durante la interacción con linfocitos B para el desarrollo de respuestas de anticuerpos humores. Aparentemente el CD154 marcado por linfocitos T puede entrar también en interacción con CD40 expresado por diferentes células (APC) que presentan antígenos. Esto

es evidente, puesto que durante la estimulación *in vitro* con antígenos específicos se regula descendiendo muy rápidamente del CD154 a los linfocitos T activados. Se considera responsable de este fenómeno a la interacción de CD154 sobre los linfocitos T activados con CD40's fuertemente expresados en dichos sistemas también por APC como monocitos. Las moléculas CD154 específicamente marcadas por linfocitos T activados se degradan luego en las células. Ya no se encuentra disponible, en un sistema influido por el procedimiento según la invención, como marcador para linfocitos Th CD4⁺ específicos.

Mediante la adición de un inhibidor del sistema CD40/CD154 se perturba o inhibe el efecto de cambio y de señal así como la interacción de CD40 y CD154. Los inhibidores del sistema CD40/CD154 según la invención pueden ser todas las moléculas o también influencias físicas, que son capaces de bloquear o inhibir la interacción entre CD40 y CD154. Por consiguiente, el medio inhibidor puede ser un anticuerpo, que está dirigido por ejemplo contra CD40, una molécula, un ión cesio o litio, que influye en la interacción entre CD40 y CD154 entre sí. Pero naturalmente puede ser también una sustancia, que inhiba la secreción o endocitosis en la célula, como p. ej. la Brefeldina-A (Bref-A). La Bref-A es un inhibidor del aparato de Golgi y la secreción de un gran número de citoquinas. Por medio de estas sustancias se asegura, que, bien CD40, CD154, la interacción entre ambos o el sistema CD40/CD154 se modifique de tal manera, que el CD154 o ya no se regula o desciende hasta la superficie celular, o, si este aún se halla dentro de la célula, ya no es transportado dentro de ésta. Con la interrupción del transporte dentro de la célula se impide la degradación de CD154. Por consiguiente el CD154 se estabiliza en el interior o exterior de la célula en función del receptor externo y puede ser detectado con el procedimiento de detección conocido por el experto y sucesivamente puede ser aislado. El experto conoce diferentes procedimientos y dispositivos, con los cuales pueden separarse, purificarse, enriquecerse o aislarse las células detectadas en el sistema inmunológico, p. ej. la citometría de flujo o la clasificación celular magnética.

Mediante la adición del inhibidor del sistema CD40/CD154 se impide la descomposición o la degradación del CD154 dentro y/o fuera de la célula, de modo que las células, que presentan CD154, pueden caracterizarse y sucesivamente aislarse gracias a esta caracterización. Mediante el procedimiento según la invención particularmente se pone a disposición el nuevo candidato según la invención, el CD154, para la determinación de los linfocitos T antígeno específicos.

En una forma de realización preferida de la invención son detectados y/o separados, como los linfocitos T, los linfocitos Th, en particular los linfocitos CD4⁺ y/o los linfocitos Th CD8⁺.

En una forma de realización preferida de la invención, el inhibidor del sistema CD40/CD154 es un anticuerpo dirigido contra CD40, un anticuerpo dirigido contra CD154, un inhibidor de la secreción y/o un inhibidor de la endocitosis. El experto conoce diferentes inhibidores de la secreción e inhibidores de la endocitosis. El anticuerpo en este caso puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal o un anticuerpo específicamente modificado o un fragmento del anticuerpo, por ejemplo, puede ser un anticuerpo asociado a un fa-

go o un fragmento del fago. Este puede estar dirigido contra un epítipo individual de CD40 o dirigido contra varias estructuras de CD40. Un anticuerpo según la invención es una molécula, la cual influye sobre el CD40, de tal manera que ventajosamente ya no es posible una interacción con CD154. Anticuerpo por lo tanto significa, según la invención, un polipéptido, codificado esencialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos, que liga específicamente o reconoce el CD40. El concepto epítipo utilizado en la invención significa cualquier determinante de antígenos sobre un antígeno, al que se liga el parátipo de un anticuerpo. Los determinantes de epitopos consisten particularmente en agrupamientos de superficies químicamente activas de moléculas, como aminoácidos o moléculas de azúcar y normalmente poseen tanto distintivos característicos específicos de la estructura tridimensional así como también características específicas de la carga.

En una forma de realización preferida de la invención se usa Brefeldina-A y/o Monsensin en función del inhibidor de la secreción y/o en función del inhibidor de la endocitosis. La Brefeldina A es un metabolito del hongo *Penicillium brefeldianum* y bloquea, en función del ionóforo carboxilado, el transporte de nuevas proteínas sintetizadas del retículo endoplasmático en el aparato de Golgi e impide el intercambio entre endosomas y lisosomas, mientras que la circulación entre la membrana celular y los endosomas ventajosamente se desarrolla sin perturbación.

En otra forma de realización especialmente preferida de la invención se detecta el CD154 de manera intracelular en células fijadas. Puesto que se regula de manera descendente o se degrada rápidamente el CD154 de manera extracelular, en cuanto haya tenido lugar una activación específica de antígenos de particularmente linfocitos Th, puede detectarse el CD154 de forma ventajosa, de manera intracelular, *in vitro* con mucha precisión. Particularmente mediante la adición de Brefeldina A se bloquea el transporte de la proteína CD154 en la superficie celular. Ventajosamente es posible por ello el análisis del CD154 total, intracelular, de una manera muy específica, lo cual permite una detección prácticamente completa de particularmente todos los linfocitos Th CD4⁺ reactivos. Mediante la determinación intracelular de CD154 se logra una muy buena proporción señal-sonido, lo que permite una determinación muy segura y eficiente de linfocitos Th antígeno específicos.

En otra forma de realización preferida de la invención se detecta de manera extracelular los CD154 en células vitales. Para emplear particularmente linfocitos Th CD4⁺ y/o CD8⁺ antígeno específicos en el campo terapéutico o clínico, es necesario detectar las células de tal modo que éstas no influyan negativamente en su funcionalidad, e. d. que una prueba ventajosamente se configure de tal manera que puedan detectarse las células vivas y vitales, para sucesivamente poder emplearlas para la preparación de un producto farmacéutico. Por ejemplo es posible neutralizar los CD40 mediante anticuerpos anti-CD40, para impedir la degradación de CD154 en la superficie celular, lo cual permite una detección y un aislamiento de linfocitos Th antígeno específicos CD4⁺ y/o CD8⁺.

Es preferido obtener los linfocitos T antígeno específicos, en particular CD4⁺ y/o CD8⁺ a partir de sangre fresca, células congeladas, células sanguíneas

mononucleares periféricas (PBMC) y/o a partir de otros líquidos corporales.

En una forma de realización preferida de la invención son las células de linfocitos T aislados y/o separados, las que no producen citoquinas o no presentan la muestra definida de citoquina. De forma ventajosa es también posible detectar o aislar todos los linfocitos T antígeno específicos, es decir la totalidad de esta población celular, que está dirigida contra un determinado antígeno, es decir independientemente de si los linfocitos T producen o no citoquinas o de si los linfocitos T no pueden asociarse a ninguna muestra definida de citoquina.

El procedimiento según la invención para detectar y aislar linfocitos T antígeno específicos, por ejemplo linfocitos Th CD4⁺, permite emplear particularmente linfocitos Th antígeno específicos para la terapia celular contra diferentes enfermedades, como por ejemplo cáncer o infecciones virales. Hasta ahora se han usado p.ej. los linfocitos Th en forma de líneas celulares o clones celulares para la terapia adoptiva de linfocitos Th. La preparación de estas líneas celulares o clones celulares es sin embargo muy costosa y precisa un período largo. El procedimiento según la invención permite por primera vez detectar y aislar *in vivo* así como también *in vitro* los linfocitos Th antígeno específicos, mediante la detección de CD154 en un tiempo breve. Por consiguiente es posible seleccionar por primera vez los linfocitos Th por su reactividad a antígenos independientemente de su fenotipo.

De forma ventajosa es posible con el uso de CD154, en función del marcador de linfocitos T antígeno específicos, obtener por ejemplo a partir de líquidos corporales o suspensiones celulares artificiales, linfocitos T antígeno específicos contra un antígeno elegido o antígenos elegidos, en particular para aplicaciones terapéuticas celulares. Es ventajosamente posible aislar linfocitos T específicos para la expansión o con la transferencia adoptiva sucesiva o directa, donde estos linfocitos T específicos representan linfocitos T inflamatorios o antiinflamatorios y particularmente reguladores o supresores.

En lo sucesivo se ilustrará la invención por medio de ejemplos, sin limitar la invención a ello.

Ejemplo 1

Se determinó la cinética de la expresión de CD154 intracelular en células Th antígeno reactivas después de la estimulación *in vitro* de sangre total humana con el superantígeno estafilococo Enterotoxina B (SEB). Cada 1 ml de sangre total de un donante normal sano se ha cultivado para los tiempos indicados con o sin SEB (1 µg/ml) a 37°C. En las últimas 2 horas del cultivo se ha añadido el inhibidor de la secreción BrefA. Se muestran análisis delimitados en células Th CD4⁺. En la figura 1 se muestra la cinética de la expresión de CD154 intracelular.

Ejemplo 2

La Fig. 2 muestra la detección de células Th específicas del toxoide tetánico (TT) y células Th específicas de alérgenos en la sangre total humana independientemente del tipo de citoquinas producidas de manera reactiva después de la estimulación *in vitro* con TT y alérgenos. Cada 1 ml de sangre total de donantes sanos ha sido cultivado con o sin los antígenos indicados (TT: 10 µg/ml/alérgenos: 20 µg/ml) durante 6 horas a 37°C. En las últimas 4 horas se añadió el inhibidor de la secreción BrefA. Se muestran análisis delimitados en células Th CD4⁺.

Ejemplo 3

El aislamiento de células Th vivas específicas de toxoide tetánico (TT) de mano de la expresión reactiva CD154 de células mononucleares humanas periféricas después de una estimulación *in vitro* con TT está representado en la figura 3. A partir de 20 ml de sangre total se obtuvieron células mononucleares periféricas. Éstas fueron cultivadas durante 6 horas con 10 µg/ml TT en presencia de un anticuerpo anti-CD40 a 37°C. Todas las pruebas fueron marcadas con anticuerpos contra CD4-FITC, CD69-APC y CD154-PE. Para la exclusión de células muertas se usó yoduro de propidio. En 3A se muestran análisis de la expresión de CD154 en relación con la expresión del marcador de activación de CD69 antes del aislamiento. Después de un enriquecimiento magnético con MicroBeads (3B) específicos de PE se han purificado posteriormente las células vivas Th CD4⁺, CD154⁺ con el FACS (figura 3C). En las figuras 3A y 3B los análisis están limitados a células Th CD4⁺.

REIVINDICACIONES

1. Uso de CD154 y de un inhibidor del sistema CD40/CD154, que bloquea o inhibe la interacción entre CD40 y CD154, para la detección y/o aislamiento *in vitro* de linfocitos T antígeno específicos.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que los linfocitos T que son detectados y/ aislados son los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺.

3. Uso según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** por el hecho de que los linfocitos T inflamatorios, antiinflamatorios, reguladores y/o supresores son detectados y/o aislados.

4. Procedimiento para la detección y/o el aislamiento de linfocitos T antígeno específicos en una suspensión después de la activación con un antígeno, en el cual se pone en contacto la suspensión con un inhibidor del sistema CD40/CD154, que bloquea o inhibe la interacción entre CD40 y CD154, se determina el CD154 de manera intra o extracelular y se detectan y se separan las células que presentan CD154.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **carac-**

terizado por el hecho de que los linfocitos T que son detectados y/o aislados son los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizado** por el hecho de que, como inhibidor del sistema CD40/CD154, se usa un anticuerpo CD40, un anticuerpo anti-CD154, un inhibidor de la secreción y/o un inhibidor de la endocitosis.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizado** por el hecho de que, como inhibidor de la secreción y/o inhibidor de la endocitosis, se usan Brefeldina A y/o Monsensin.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizado** por el hecho de que se detecta CD154 de manera intracelular en células fijadas.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 8, **caracterizado** por el hecho de que se detecta CD154 de manera extracelular en células vitales.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 9, **caracterizado** por el hecho de que los linfocitos T que carecen de un modelo de citoquina definido son aislados y/o separados.

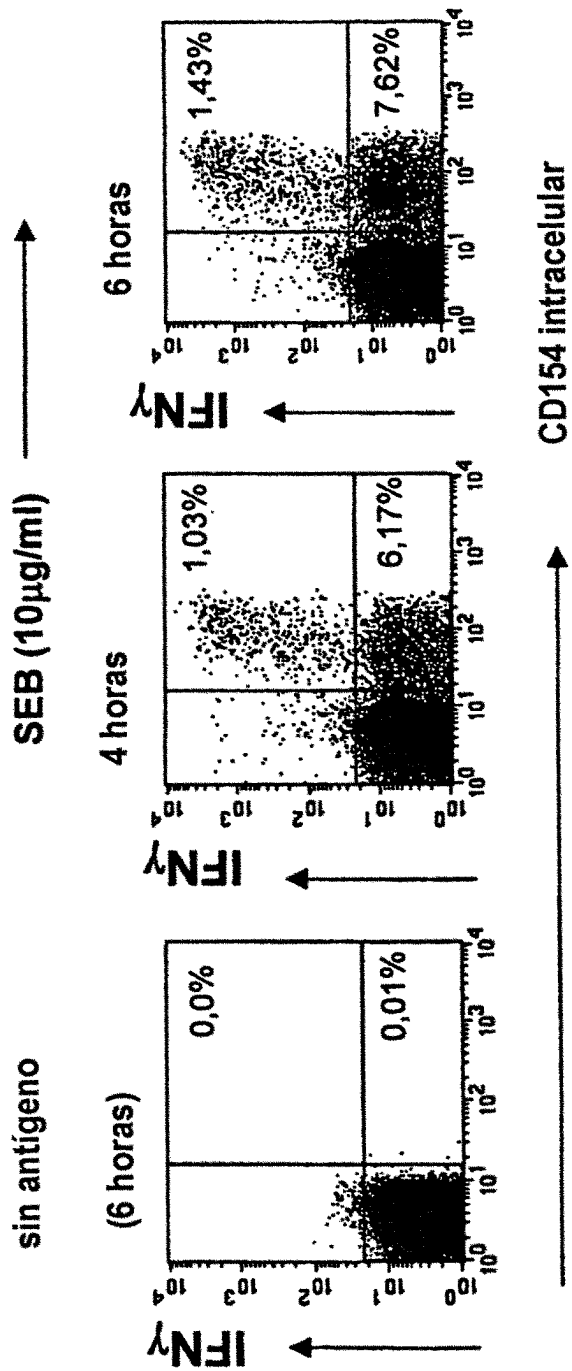


Figura 1

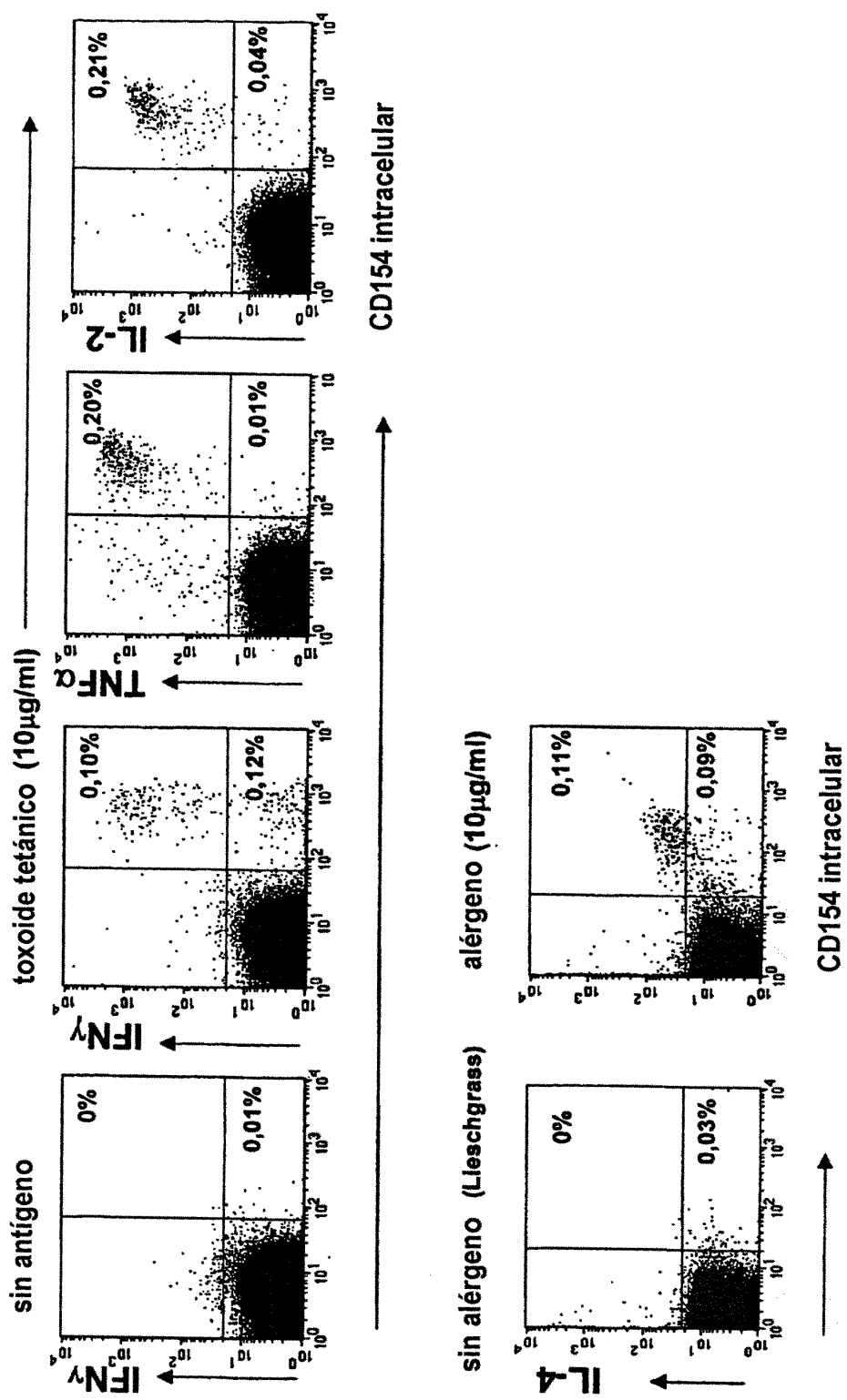


Figura 2

