



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 355 587**

⑯ Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **07020026 .6**

⑯ Fecha de presentación : **12.10.2007**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **2048225**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

④ Título: **Método y kit para el aislamiento rápido de células Foxp3+ Treg humanas.**

③ Titular/es: **Max-Delbrück-Centrum für Molekulare
Medizin (MDC)
Berlin-Buch, Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2011

② Inventor/es: **Rötzschke, Olaf;
Falk, Kirsten y
Kleinewietfeld, Markus**

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2011

④ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

MÉTODO Y KIT PARA EL AISLAMIENTO RÁPIDO DE CÉLULAS Foxp3+ Treg HUMANAS

La presente invención se refiere a métodos para aislar células T reguladoras CD4+CD25+ de la caja de cabeza de tenedor (*forkhead box*) P3 (Foxp3+) humanas (denominadas aquí como células Foxp3+ Treg) a partir de una muestra que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC), a un kit para aislar células Foxp3+ Treg humanas, y al uso de anticuerpo anti-CD49d y anticuerpo anti-CD127 para el aislamiento de células Foxp3+ Treg humanas.

Antecedentes de la Técnica

Las células T reguladoras, o "Treg" son fundamentales para controlar diversas respuestas inmunitarias, por cuanto las Treg suprimen rápidamente la actividad de otras células inmunitarias. En particular, las Treg son cruciales para mantener la tolerancia disminuyendo respuestas inmunitarias indeseadas frente a antígenos propios y no propios (véanse, por ejemplo, Fontenot, J. D. y Rudensky, A. Y. *Nat Immunol* 6, 331-7 (2005); Sakaguchi, S., *Annu Rev Immunol* 22, 531-62 (2004)). Por ejemplo, se han descubierto defectos de Treg en pacientes con esclerosis múltiple (EM), diabetes tipo I (T1D), psoriasis, miastenia grave (MG) y otras enfermedades autoinmunitarias (Baecher-Allan, C. y Hafler, D. A., *Immunol Rev* 212, 203-16 (2006)). También existen relaciones similares para atopia y enfermedades alérgicas (Robinson, D. S., Larche, M. y Durham, S. R., *J Clin Invest* 114, 1389-97 (2004)). Para todas estas enfermedades existen informes que apuntan a una supresión inmunitaria *in vitro* reducida de las células Treg de los pacientes. Esto ha conducido a un creciente interés en la posibilidad de usar las Treg en inmunoterapia para tratar o prevenir infecciones crónicas, enfermedades autoinmunitarias, alergias y complicaciones relacionadas con transplantes, tales como el rechazo de injertos o la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (para un repaso, véase Roncarolo, M. G. y Battaglia, M., *Nat Rev Immunol* 7, 585-98 (2007)).

El marcador característico de las Treg es Foxp3. Se conocen métodos para el aislamiento de células Foxp3 Treg humanas. Por ejemplo, Hoffmann, P. et al. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 267-74 (2006) describen el aislamiento de células T CD4+CD25+ con función reguladora a partir de productos de leucaféresis estándar usando un protocolo de separación celular magnética de dos etapas. Los productos celulares generados contenían de media 49,5% de células Foxp3+ Treg. También, existen kits comerciales, por ejemplo el kit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit de Miltenyi Biotec, o el kit Dynal® CD4+CD25+ Treg Kit de Invitrogen.

Todos los métodos descritos hasta ahora para el aislamiento de células Foxp3+ Treg humanas emplean la selección positiva de células Foxp3+ Treg basándose en marcadores de la superficie celular de las Treg (véase, por ejemplo, Seddiki, N. et al., *J Exp Med* 203, 1693-700 (2006)). Esto es, las células Foxp3+ Treg se aislan usando anticuerpos para marcadores de la superficie celular asociados a Treg, principalmente CD25. Sin embargo, la mayoría de los marcadores de la superficie celular de las Treg, tales como CD4, CD25 y Foxp3, no están restringidos a las Treg. Por ejemplo, el CD25 empleado habitualmente también es expresado por células T CD4+ efectoras y de memoria (véase, por ejemplo, Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. y Hafler, D. A., *J Immunol* 167, 1245-53 (2001)). En consecuencia, estos métodos de selección positiva no permiten el aislamiento de una población uniforme que dé cuenta de la mayoría de las células Foxp3+ Treg como se esquematiza anteriormente; Hoffmann, P. et al. obtuvieron de media 49,5% de células Foxp3+ Treg.

También, la aplicación en terapia celular de células Foxp3+ Treg, que se han aislado mediante selección positiva basándose en marcadores de superficie celular de las Treg, plantea varios problemas. En primer lugar, el aislamiento de células Foxp3+ Treg basado en marcadores de superficie celular, por ejemplo CD25, conduce a contaminaciones más o menos importantes de la población de células Foxp3+ Treg con otras células, por ejemplo células efectoras CD4+ que representan la diana principal de la supresión por Treg. En consecuencia, existe un riesgo elevado si tales células Foxp3+ Treg seleccionadas positivamente se aplicasen en terapia celular, puesto que puede conducir a la activación potencialmente mortal del sistema inmunitario del paciente tratado. Tal respuesta inmunitaria mortal se documentó recientemente en el fracaso de los ensayos "Tegenero" (Suntharalingam, G. et al., *N Engl J Med* 355, 1018-28 (2006)). En segundo lugar las células Foxp3+ Treg seleccionadas positivamente que han sido marcadas mediante un anticuerpo pueden exhibir función deteriorada. Puesto que las células marcadas mediante un anticuerpo están potencialmente preactivadas, pueden sufrir depleción mediada por el complemento o por las células, o pueden mostrar patrones de ecotaxis y migración alterados. En consecuencia, las células Foxp3+ Treg seleccionadas como dianas por anticuerpos durante su aislamiento son indeseables no sólo por razones de seguridad.

Como se explica, los métodos y kits descritos anteriormente muestran desventajas importantes con respecto al aislamiento de células Foxp3+ Treg. Adicionalmente, hasta ahora no existe ningún método que permita acceder a las células Foxp3+ Treg mediante selección negativa, es decir, dejando las células Foxp3+ Treg sin

marcadores/anticuerpos. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método que evite las desventajas mencionadas anteriormente de la técnica anterior. Adicionalmente, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un kit para el aislamiento de células Foxp3+ Treg.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en los resultados acerca de la correlación de marcadores de la superficie celular específicos de células Foxp3+ Treg y marcadores de la superficie celular de células T CD4+ no reguladoras. En particular, se examinaron los marcadores de la superficie celular CD127 y CD49d. Durante los experimentos en el contexto de la presente invención, se pudo demostrar que los marcadores de superficie CD127 y CD49d están ausentes en la mayoría de las células Foxp3+ Treg. En el contexto de la presente invención, se pudo demostrar que las células Foxp3+ Treg humanas sin tocar se pueden aislar con gran pureza en una única etapa de depleción, mediante el uso combinado de anticuerpos dirigidos contra CD127 y CD49d, por ejemplo una pureza de >90% (es decir, las células Foxp3+ Treg constituyen más del 90% de las células en el producto celular aislado). Adicionalmente, la actividad supresora de las células Foxp3+ Treg aisladas se confirmó mediante experimentos en el contexto de la presente invención. Las células Foxp3+ Treg aisladas inhibieron fuertemente reacciones mixtas de linfocitos (MLR) *in vitro*, y evitaron el ataque mortal de PBMC humana transferida *in vivo* en un modelo de GvHD basado en ratones Rag2-/- γc-/-.

En un primer aspecto de la presente invención, uno de sus objetos se resuelve mediante un método para aislar células Foxp3+ Treg humanas a partir de una muestra que contiene células mononucleares de sangre periférica, o "PBMC", comprendiendo el método las etapas de:

- (a) tratar la muestra con un anticuerpo anti-CD127 y un anticuerpo anti-CD49d;
- (b) separar las células Foxp3+ Treg.

La expresión "tratar la muestra", como se usa en la presente invención, debe implicar especialmente que las células contenidas en la muestra se ponen en contacto físico directo con los anticuerpos de una manera tal que los anticuerpos pueden interaccionar con las células seleccionadas como dianas. En otras palabras, en el método según la presente invención, las células mononucleares de sangre periférica PBMC se ponen en contacto con un anticuerpo anti-CD127 y un anticuerpo anti-CD49d, y las células Foxp3+ Treg se separan.

El término "separar", como se usa en la presente invención, se refiere a la retirada por medios físicos de un tipo celular, por ejemplo células Foxp3+ Treg, a partir de otros tipos celulares, por ejemplo células efectoras CD4+, o de todas las células T CD4+ no reguladoras a partir de las células Foxp3+ Treg. Para una descripción más detallada de las técnicas de separación, refiérase a P.T. Sharpe, *Methods of Cell Separation, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 18, ELSEVIER (1988), y D. Fisher, G. E. Francis, D. Rickwood (Eds.), *Cell Separation: A Practical Approach*, Oxford University Press (1999).

Como se ha resumido anteriormente y en otros términos, la invención resuelve el problema técnico citado mediante un método simple, muy fiable y reproducible para el aislamiento de células Foxp3+ Treg. En particular, como se menciona anteriormente, los métodos de la técnica anterior se basan en marcadores de la superficie celular de células Foxp3+ Treg. Sin embargo, como se explicó, dichos métodos sólo permiten el aislamiento de células Foxp3+ Treg que estaban marcadas, a saber, marcadas con un anticuerpo dirigido contra uno de los marcadores de la superficie celular de las células Foxp3+ Treg. Además, dichos métodos requieren al menos dos etapas de aislamiento: (i) depleción de las células no CD4; (ii) aislamiento de las células CD25+. En contraste con esto, el método de la presente invención permite en primer lugar el aislamiento de células Foxp3+ Treg dejando a dichas células Foxp3+ Treg libres de marcadores, o "sin tocar". Adicionalmente, las células Foxp3+ Treg se pueden aislar en una sola etapa. De este modo, el aislamiento de las células Foxp3+ Treg usando el método según la presente invención es más rápido, más fácil y, por encima de todo, más eficaz con respecto al aislamiento de una población uniforme que da cuenta de la mayoría de las células Foxp3+ Treg contenidas en la muestra. Finalmente, el método de la presente invención se puede automatizar, aumentando por lo tanto adicionalmente la fácil aplicabilidad del método.

El resultado más alejado obtenido según la presente invención fue el hallazgo de que las células Foxp3+ Treg sin tocar se pueden obtener con pureza elevada mediante el uso combinado, es decir, secuencial o simultáneo, de un anticuerpo anti-CD49d y un anticuerpo anti-CD127, que seleccionan como dianas a dos marcadores de la superficie celular, a saber, CD127 y CD49d, correlacionados de forma inversa con la expresión de Foxp3, en el método según la presente invención. Las células Foxp3+ Treg aisladas, obtenidas mediante el método según la presente invención, son completamente funcionales, demostrado por su capacidad para inhibir reacciones linfocitarias mixtas *in vitro* y para prevenir respuestas letales de xeno-GvHD *in vivo*. Hasta ahora, la contaminación de células Foxp3+ Treg aisladas con células CD4+ no reguladoras, por ejemplo células CD4+ efectoras y de memoria, era el principal inconveniente en el

método de aislamiento de células Foxp3+ Treg. Hay una considerable cantidad de CD4+ no reguladoras en las poblaciones de células Foxp3+ Treg aisladas mediante selección positiva basada en marcadores de la superficie celular de las Treg. Por ejemplo, en las poblaciones de células Foxp3+ Treg aisladas por Hoffmann, P. et al. Biol Blood Marrow Transplant 12, 267-74 (2006) usando selección positiva, de media más del 50% de las células en estas poblaciones eran células CD4+ no reguladoras. Naturalmente, tales cantidades considerables de células CD4+ no reguladoras indeseadas impiden el uso de tales poblaciones de células Foxp3+ Treg, por ejemplo en inmunoterapia como se menciona anteriormente.

Preferiblemente, en el método de la presente invención, las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo simultáneamente.

La ventaja de llevar a cabo las etapas (a) y (b) simultáneamente reside en que el aislamiento de células Foxp3+ Treg es menos laborioso, es simple, rápido y también más barato.

Además, en el método según la presente invención, la etapa (a) puede comprender adicionalmente la separación de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

La ventaja de separar adicionalmente células T no CD4+ a partir de las PBMC se basa en que las células T CD4+ no reguladoras se eliminan con una mayor eficiencia, y, como resultado, la pureza del producto celular obtenido es mayor.

En el método según la presente invención, las células T no CD4+ se pueden separar de las PBMC mediante selección negativa usando un anticuerpo anti-CD4+.

La expresión "selección negativa", como se usa en la presente invención, significa que las células indeseadas son eliminadas del repertorio de células mediante el marcaje/captura de dichas células indeseadas, a la vez que se dejan las células de interés libres (sin marcadores).

Además, en el método según la presente invención, se puede usar uno o más anticuerpos que permitan la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC, para la separación de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

La ventaja de separar células T no CD4+ a partir de las PBMC mediante depleción se basa en que las células T CD4+ quedan limpias y sin tocar.

Según la presente invención, se prefiere un método en el que el anticuerpo/anticuerpos usado o usados para la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC se pueden seleccionar del grupo que comprende anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD49b, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-TCRg/d, anticuerpo anti-CD235a, o mezclas.

Según la presente invención, para la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC, se pueden usar preferiblemente anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, y/o anticuerpo anti-CD16.

La ventaja de usar un anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, y/o anticuerpo anti-CD16 para la depleción específica de células T no CD4+ es que este subconjunto de anticuerpos es pequeño en comparación con algunos subconjuntos comercialmente disponibles.

Adicionalmente preferido según el método de la presente invención, se puede usar el anticuerpo anti-CD14 y/o el anticuerpo anti-CD16 para la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

Adicionalmente preferido según la presente invención es un método en el que al menos uno de los anticuerpos usado en la etapa (a) está marcado o inmovilizado.

El término "marcado", como se usa en la presente invención, significa que una molécula, por ejemplo un conjugado, está conjugado con un marcador. El experto conoce muchos marcadores diferentes que se pueden conjugar con un anticuerpo. Por ejemplo, radioisótopos, por ejemplo ^{32}P , ^{35}S o ^{3}H ; marcadores de fluorescencia o de luminiscencia, por ejemplo fluoresceína (FITC), rodamina, rojo Texas, ficoeritrina (PE), aloficiocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dcloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo el fragmento F(ab)2; marcadores de afinidad, por ejemplo biotina, avidina, agarosa, proteína morfogenética ósea (BMP), haptenos unidos a la matriz; y

enzimas o sustratos enzimáticos, por ejemplo fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP).

El término "inmovilizado", como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier soporte al que se puede ligar un anticuerpo a la vez que retiene su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz, por ejemplo una matriz de nailon; una placa de microtitulación o un soporte plástico sólido similar; perlas, por ejemplo perlas de agarosa o magnéticas. Los anticuerpos inmovilizados se describen, por ejemplo, en el documento US 4.615.985 y las referencias citadas allí.

La ventaja de usar anticuerpos marcados o inmovilizados en comparación con anticuerpos no marcados es que los anticuerpos marcados o inmovilizados se pueden usar más fácilmente con un equipo estándar, y también se facilita una adaptación a técnicas de aislamiento estándar.

10 Preferido según la presente invención, al menos se inmoviliza un anticuerpo usado en la etapa (a).

Preferiblemente, en el método de la presente invención, al menos un anticuerpo usado en la etapa (a) se inmoviliza sobre una matriz de nailon.

La ventaja de inmovilizar un anticuerpo en una matriz de nailon se basa en que la inmovilización en una matriz de nailon es muy eficiente y permite un aislamiento flexible, fácil, rápido, simple y barato a base de columna de 15 células. La inmovilización en una matriz de nailon se describe, por ejemplo, en el documento US 4.615.985.

Preferido adicionalmente según el método de la presente invención, los anticuerpos usados en la etapa (a) se pueden marcar uniformemente.

La ventaja de marcar uniformemente los anticuerpos se basa en que los anticuerpos se pueden detectar todos de una vez.

20 Preferiblemente, en el método de la presente invención, el marcador se puede seleccionar del grupo que comprende isótopos, marcadores de fluorescencia o luminiscencia, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, marcadores de afinidad, y enzimas o sustratos enzimáticos.

Preferido según el método de la presente invención, el anticuerpo anti-CD127 se puede marcar con biotina, fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE).

25 Preferido según el método de la presente invención, el anticuerpo anti-CD49d se puede marcar con biotina, fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE).

Preferido según el método de la presente invención, la etapa (b) se puede llevar a cabo usando centrifugación, particularmente centrifugación en gradiente de densidad, elutriación celular, separación magnética, 30 clasificación celular activada por fluorescencia, separación inmunológica, adhesión, lisis por complemento o citometría de flujo.

Preferido según el método de la presente invención, la etapa (b) se puede llevar a cabo usando separación celular magnética, clasificación celular activada por fluorescencia, o una separación inmunológica a base de columna.

35 La expresión "separación inmunológica a base de columna" se refiere a una forma de clasificar células, en la que los anticuerpos empleados en el método según la invención se pueden unir a resinas de columnas cromatográficas y se pueden usar para unirse a una célula que posee un antígeno reconocido por el anticuerpo específico.

Preferido según el método de la presente invención, se puede usar un anticuerpo anti-CD45RO como un anticuerpo adicional en la etapa (a), y las células Foxp3+ Treg aisladas son células T CD45RA+.

40 La ventaja de usar un anticuerpo anti-CD45RO como anticuerpo adicional en la etapa (a) se basa en que un subconjunto específico de células Foxp3+ Treg, a saber, células T CD45RA+, se puede aislar de una manera muy eficiente y con una pureza muy elevada.

Preferido según el método de la presente invención, se puede usar un anticuerpo anti-CD45RA como un anticuerpo adicional en la etapa (a), y las células Foxp3+ Treg aisladas son células T CD45RO+.

45 La ventaja de usar un anticuerpo anti-CD45RA como anticuerpo adicional en la etapa (a) se basa en que un subconjunto específico de células Foxp3+ Treg, a saber, células T CD45RO+, se puede aislar de una manera muy eficiente y con una pureza muy elevada.

En un segundo aspecto de la presente invención uno de sus objetos se resuelve mediante un kit para aislar células Foxp3+ Treg humanas, que comprende un anticuerpo anti-CD49d y un anticuerpo anti-CD127.

Preferiblemente, el kit según la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que comprende anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD49b, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-TCRg/d, y anticuerpo anti-CD235a.

Adicionalmente, el kit de la presente invención puede contener al menos un anticuerpo que está inmovilizado.

Además, el kit según la invención puede contener al menos un anticuerpo que está marcado.

Preferiblemente, el kit de la presente invención puede contener anticuerpos que están marcados uniformemente.

El kit preferido según la invención puede contener anticuerpos marcados, en el que el marcador se puede seleccionar del grupo que comprende isótopos, marcadores de fluorescencia o luminiscencia, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, marcadores de afinidad, y enzimas o sustratos enzimáticos.

Preferiblemente, el kit puede contener un anticuerpo anti-CD127 que puede estar marcado con biotina, FITC, o PE, y un anticuerpo anti-CD49d que puede estar marcado con biotina, FITC, o PE.

En un tercer aspecto de la presente invención, uno de sus objetos se resuelve mediante el uso de un anticuerpo anti-CD49d y un anticuerpo anti-CD127, o de un kit según la invención, para el aislamiento de células Foxp3+ Treg humanas.

Preferiblemente, el uso según la invención se puede caracterizar porque la separación de las células Foxp3+ Treg humanas se puede lograr separando las PBMC CD49d+CD127+, incluyendo células T CD4+ no reguladoras, de las células Foxp3+ Treg no marcadas vía centrifugación, elutriación celular, separación magnética, clasificación celular activada por fluorescencia, separación inmunológica, adhesión, lisis por complemento o citometría de flujo.

Adicionalmente, el uso según la invención se puede caracterizar porque la depleción de células T no CD4+ a partir de las PBMC se puede llevar a cabo usando al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD49b, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-TCRg/d, y anticuerpo anti-CD235a.

Figuras

Fig. 1: Correlación inversa de CD127 y CD49d con la expresión de Foxp3. Las PBMC humanas se tiñeron para CD4, CD25, CD127, CD49d y Foxp3, y se analizaron mediante FACS. **a.** Tinción doble de PBMC humanas para CD4 y CD25. Se indica el porcentaje de células CD4+ de las PBMC totales. **b.** Correlación de CD25, CD127 y CD49d con la expresión de Foxp3. Se muestra la cotinción de Foxp3 con CD25 (panel izquierdo), CD127 (panel central) y CD49d para las células CD4+ seleccionadas según la Fig. 1a. Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

Fig. 2: CD49d discrimina células Foxp3+ Treg de las células Foxp3-CD127-. **a.** Expresión de Foxp3 en subconjuntos CD127/CD49d de células T CD4+. Las PBMC se tiñeron para CD4, CD25, CD127, CD49d y Foxp3, y se seleccionaron en una región para células CD4+. Panel superior: cotinción de CD49d y CD127. Se indican las ventanas y porcentajes de las tres poblaciones principales. Paneles inferiores: se muestra la cotinción de CD25 y Foxp3 para las células CD127+ (panel izquierdo), CD49d-CD127- (panel central) y CD49d+CD127- (panel derecho). Los porcentajes representan el número de células CD25+Foxp3+ Treg en el cuadrante indicado. **b.** Aislamiento de células CD49d-CD127- y CD49d+CD127- mediante clasificación por FACS. Las células CD4+ sin tocar, aisladas a partir de PBMC con el kit de depleción de MACS comercial, se tiñeron con α -CD49d y α -CD127 (panel izquierdo) y se clasificaron mediante FACS en el subconjunto CD49d-CD127- (panel central) y CD49d+CD127- (panel derecho). Los números indican la fracción de células en cada cuadrante. **c.** Capacidad supresora. La inhibición de la respuesta proliferativa por los dos subconjuntos celulares aislados se determinó en un ensayo de supresión a base de FACS como se muestra en la Fig. 3b. La proliferación de células CD4+ se indujo mediante los anticuerpos α -CD3, se añadieron células supresoras a una relación de 1:2. La supresión se expresa como "% de inhibición", y se calculó mediante la fracción de células que se dividen con referencia al número de células CD4+ estimuladas mediante α -CD3 que se dividen.

Fig. 3: Aislamiento de células Foxp3 Treg mediante clasificación celular magnética. **a.** Perfil de FACS para la población de partida de PBMC procedente de un donante sano aislada mediante centrifugación en gradiente de densidad mediante Ficoll. Panel izquierdo: perfil de FACS para la SSC frente a FSC. Paneles derechos: perfiles de FACS para las poblaciones seleccionadas en la región de todas las células (fila superior) o en la de linfocitos (fila inferior) indicadas por las flechas para CD4 frente a CD25 o CD127 frente a CD49d. **b.** Perfil de FACS para la población negativa a las perlas tras la depleción para CD127 y CD49d mediante el sistema MACS. Panel izquierdo: perfil de FACS de células como en la Fig. 1a. Paneles derechos: perfil de FACS para la expresión de CD4 frente a CD25 y CD127 frente a CD49d para las regiones indicadas como en la Fig. 3a. Los números indican el porcentaje de células en el cuadrante correspondiente.

Fig. 4: Pureza de células Treg según la expresión de Foxp3. La población de partida y la población negativa a perlas obtenida tras la separación se tiñeron en la superficie con CD25 y CD4, y se fijaron para el análisis subsiguiente de la expresión de Foxp3 intracelular. **a.** Perfil de FACS para la población de partida de PBMC tras la fijación y tinción con Foxp3. Panel izquierdo: perfil para SSC frente a FSC. Paneles derechos: perfiles de FACS para todas las células (fila superior) o para linfocitos (fila inferior) como se indica mediante las flechas para CD4 frente a CD25 y Foxp3 frente a CD25 según las ventanas de selección en el perfil de SSC frente a FSC (panel izquierdo). **b.** Perfil de FACS de la población negativa a perlas tras la depleción de CD127 y CD49d y fijación/tinción con Foxp3. Panel izquierdo: perfil de FACS para células como en Fig. 4a. Paneles derechos: perfil de FACS de células seleccionadas en ventanas (flechas) según Fig. 4a para todas las células (fila superior) o para linfocitos (fila inferior) para CD4 frente a CD25 y CD127 frente a CD49d. Los números indican el porcentaje de las células en el cuadrante correspondiente.

Fig. 5: Inhibición de la reacción mixta de linfocitos (MLR) *in vitro* y prevención de GvHD *in vivo*. Las células Treg sin tocar se aislaron de PBMC humanas mediante depleción de CD127/CD49d de una sola etapa como se describe en la Fig. 4. **a.** Inhibición de MLR. La reacción de MLR se muestra para tres donantes diferentes. En cada reacción, se incubaron 10^5 PBMC con el mismo número de PBMC radiadas de un segundo donante con desemparejamiento haplotípico (alógeno). La reacción se inhibió añadiendo $2,5 \times 10^4$ células Treg autólogas aisladas en una depleción de MACS de una sola etapa (alógeno y Treg). La proliferación se determinó mediante la incorporación de ^3H -timidina, y se expresó como "recuentos por minuto" (cpm). **b.** Prevención de GvHD aguda. Se indujo xeno-GvHD aguda mediante la transferencia adoptiva de 30×10^6 PBMC humanas agotadas en CD25 (PBMC CD25-) en ratones Rag2 $-\text{/}-$. La progresión de la enfermedad se registró determinando la pérdida de peso (panel izquierdo). Un grupo recibió sólo PBMC CD25- (círculo oscuro), un segundo grupo recibió PBMC CD25- junto con $0,5 \times 10^5$ células Treg autólogas sin tocar, en una cotransferencia (círculos en blanco). Se usaron grupos de 6 ratones; se determinó el peso medio relativo con referencia al comienzo del experimento, y se expresó como "porcentaje de pérdida de peso". En el panel izquierdo se indica la incidencia de signos clínicos (pelaje erizado, postura encorvada e inmovilidad) y muerte.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con respecto a las figuras adjuntas sin estar limitada a ellos. Adicionalmente, la presente invención se basa en experimentos científicos que se han llevado a cabo sobre muestras biológicas obtenidas de pacientes. Los pacientes han autorizado el uso de la muestra para el estudio que se describe en la presente invención. En caso de pacientes muertos, la autorización ha sido dada por un familiar.

40 Ejemplos

Métodos y materiales particulares usados en los Ejemplos:

Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos específicos para CD4 (RPA-T4), CD25 (MA251), y CD127 (hIL-7R-M21) se adquirieron de BD Bioscience. El anticuerpo anti-CD49d (BU49) se obtuvo de ImmunoTools. α -CD3 (UCHT-1) se produjo en el MDC. α Foxp3 (PCH101) se adquirió de eBioscience; la tinción intracelular se llevó a cabo según la recomendación del fabricante. CFDA se obtuvo de Molecular Probes; ^3H -timidina se obtuvo de GE Healthcare.

Citometría de flujo y preparación celular

Las PBMC humanas se obtuvieron de voluntarios sanos. Las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente con Ficoll (GE Healthcare). El análisis de FACS se llevó a cabo en un instrumento FACSCalibur o LSR II (BD Bioscience). Los datos se analizaron usando el software FACSDiva (BD Bioscience), CellQuest (BD Bioscience) o Flowjo (Treestar).

Aislamiento de Treg

5 Las PBMC de un donante sano se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll). Se tiñeron 5×10^7 células con α CD127-biotina y α CD49d-Fitc durante 10 minutos a 4-8°C. Después de lavar con tampón de MACS durante 10 minutos a 4-8°C, las células se incubaron con $20 \mu\text{l}/10^7$ células de perlas aFitc y $30 \mu\text{l}/10^7$ células de perlas aBiotin (Miltenyi Biotech) durante 15 minutos a 4-8°C. Después de lavar con el tampón de MACS durante 10 minutos a 4-8°C, las células se agotaron usando una columna LD (Miltenyi Biotech). Tras la separación, las células se tiñeron con los anticuerpos indicados, y se analizaron mediante FACS. Para la expresión de Foxp3, las células se fijaron y se tiñeron según el fabricante (eBioscience).

Ensayo de proliferación a base de CFDA

10 Las células efectoras CD4+ se marcaron con $0,5 \mu\text{M}$ de diacetato de 5-carboxifluoresceína (CFDA; Molecular Probes) como se describe anteriormente²⁵. Las células T efectoras CD4+ (25.000 células/pocillo) se incubaron con PBMC irradiadas agotadas en CD4 (50.000 células/pocillo; 3000 rad) y $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de anti-CD3 (UCHT-1) durante 3-4 días en placas de 96 pocillos con fondo en forma de V (Costar). Para la supresión de células T, se añadieron células Treg a la relación indicada. La proliferación de células T CD4+ se analizó mediante FACS.

Reacción mixta de linfocitos (MLR)

15 Se llevó a cabo la MLR con PBMC humanas como se describe anteriormente²⁶. De forma breve, las PBMC (100.000 células/pocillo) se incubaron con PBMC alogénicas (100.000 células/pocillo) irradiadas (3.000 rad) en RPMI/10% de FCS (Invitrogen) durante 5 días. Para la supresión de la proliferación, se añadieron células Treg autólogas aisladas a la relación indicada. La proliferación se monitorizó mediante incorporación de ^3H -timidina ($1 \mu\text{Ci}/\text{pocillo}$) durante 10-15 h adicionales de cultivo, y se determinó usando un lector de placas beta (Wallac).

Enfermedad de injerto xenogénico frente a huésped (x-GvHD)

20 Se indujo una forma aguda de GvHD en ratones Rag2 $-\text{/}-$ $\gamma\text{c} \text{/} \text{-}$ (adquiridos de Taconic) como se describe anteriormente⁹. De forma breve, las PBMC se agotaron con microperlas α -CD25 (Miltenyi Biotech) usando una columna LD (Miltenyi Biotech). Las células Treg se obtuvieron de PBMC de donantes sanos usando el procedimiento de una etapa. Un día antes de la transferencia, los ratones recibieron i.v. 0,2 ml de liposomas que contienen clodronato. Cuatro horas antes de la transferencia de las células, se irradió a los ratones (350 rad). Se inyectaron i.v. 30×10^6 PBMC agotadas en CD25, ya sea solas o como una mezcla con $0,5 \times 10^5$ células Treg en PBS/0,1% de seroalbúmina humana. El peso de los ratones y los síntomas clínicos se determinaron durante todo el período del experimento; los signos clínicos de la enfermedad fueron pelaje erizado, postura encorvada y movimiento impedido.

Ejemplo 1

30 CD127 y CD49d están inversamente correlacionados con Foxp3.

35 Dependiendo del donante, alrededor de 30-60% de las PBMC humanas son células T CD4+ (Fig. 1a); de éstas, aproximadamente el 3-10% son células Treg. Aunque las células Treg humanas expresan niveles elevados de la cadena α del receptor IL-2 (CD25) (CD25^{elevado}), este marcador no separa la población de células Treg de las células CD4+ no reguladoras tan claramente como en ratones. También algunas células CD4+ efectoras y de memoria expresan cantidades bajas de CD25 (CD25^{bajo}), de forma que su población se solapa parcialmente con el subconjunto de Treg CD25^{elevado} (Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. y Hafler, D. A., J Immunol 167, 1245-53 (2001)). Las separaciones de Treg basadas en este marcador tienen por lo tanto un riesgo inherente de estar contaminadas por estas células. Al igual que varios otros genes, la expresión de CD25 en células Treg es conducida directamente por Foxp3 (Hori, S., Nomura, T. y Sakaguchi, S., Science 299, 1057-61 (2003)). Por lo tanto, la contratinción con Foxp3 indica una correlación casi lineal para las células CD25^{elevado}, en la que las células que expresan las cantidades más altas de Foxp3 también se tiñen de la forma más brillante para CD25 (Fig. 1b, panel izquierdo).

40 En contraste con CD25, la cadena α del receptor de IL-7 (CD127) está inversamente correlacionada con la expresión de Foxp3 (Liu, W. et al., J Exp Med 203, 1701-11 (2006); Seddiki, N. et al., J Exp Med 203, 1693-700 (2006)) (Fig. 1b, panel central). También aquí la correlación es casi lineal, pero las células con el nivel más elevado de Foxp3 tienen el nivel de expresión más bajo de CD127. Sin embargo, la segregación no es completa. En el ejemplo mostrado en la Fig. 1b (panel central), alrededor de 2/3 de las células CD127- también son Foxp3-. Por lo tanto, para la caracterización de células Treg, CD127 se usa siempre en combinación con CD25 (Liu, W. et al., J Exp Med 203, 1701-11 (2006); Seddiki, N. et al., J Exp Med 203, 1693-700 (2006)).

Nuestros propios estudios han identificado un segundo marcador de superficie, ausente en la mayoría de las células Treg. CD49d es la cadena α de la integrina VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$). También aquí, la cosegregación es incompleta (Fig. 1b, panel derecho). Aparentemente no existe una correlación lineal inversa con Foxp3, como se observa para CD127.

La doble tinción reveló por contra la ausencia de CD49d en células Foxp3+, independientemente del nivel de expresión de Foxp3.

Ejemplo 2

CD49d discrimina células Foxp3+ Treg de células Foxp3- CD127-.

Aunque la segregación de ambos marcadores con células Treg fue incompleta, el uso combinado de CD127 y CD49d puede complementarse entre sí. La doble tinción con α -CD127 y α -CD49d permitió dividir la población de células CD4+ en las tres poblaciones principales: células CD127+, CD49d+CD127- y CD49d-CD127- (Fig. 2a, panel superior). La tinción con α -CD25 y α -Foxp3 confirmó que la basta mayoría de las células CD127+ fueron células CD25-Foxp3- no reguladoras (Fig. 2a, panel izquierdo inferior). De forma más importante, CD49d dividió el subconjunto CD127- en dos subpoblaciones casi igualmente grandes. La mayoría de las células CD49d+CD127- fue Foxp3-; sólo menos del 18% fueron CD25+Foxp3+ (Fig. 2a, panel derecho inferior). Por el contrario, la población CD49d-CD127- consistió casi exclusivamente en células Foxp3+. Más del 83% de las células fueron CD25+Foxp3+ Treg que expresa niveles elevados de Foxp3 (Fig. 2a, panel central inferior).

Para confirmar que el fenotipo CD49d-CD127- se correlaciona con la capacidad supresora, se aislaron células CD49d+CD127- y CD49d-CD127- mediante clasificación según FACS a partir de PBMC CD4+ (Fig. 2b). Casi no se observó inhibición con el subconjunto CD49d+CD127- (Fig. 2c). Por el contrario, las células CD4+ clasificadas sólo basándose en la ausencia de CD49d y CD127 previnieron eficazmente la expansión de células CD25-CD4+ activadas. De este modo, el uso de CD49d permite discriminar las células CD127- no supresoras de las células Foxp3+ Treg funcionales.

Ejemplo 3

Purificación de células Treg humanas sin tocar mediante MACS.

El resultado del experimento de clasificación por FACS indicó que la depleción combinada de células T CD4+ con α -CD127 y α -CD49d por MACS debería producir una población limpia de células Treg sin tocar. Para validar la aplicabilidad de este enfoque, se marcaron PBMC humanas con α -CD127 y α -CD49d, y se agotaron mediante MACS usando anticuerpos marcados con perlas magnéticas (Fig. 3 y Fig. 4).

Ejemplo 4

Inhibición de reacciones alo-/xenogénicas *in vitro* e *in vivo*.

Para confirmar la función y viabilidad de células Treg aisladas mediante depleción directa de PBMC, se ensayó la capacidad supresora en una reacción mixta de linfocitos (MLR). La MLR es la contraparte *in vitro* de GvHD. Se basa en la activación alogénica de células T mediante moléculas de MHC "extrañas", evidente tras mezclar PBMC de dos donantes diferentes. Para determinar si las células Treg son capaces de controlar la respuesta alorreactiva, se añadieron a PBMC autólogas no radiadas mezcladas con PBMC radiadas de donantes haplotípicos desemparejados (Fig. 5a). En estos experimentos, las células Treg purificadas a partir de PBMC según el Ejemplo 3 demostraron ser potentes supresores de la respuesta alogénica. Como se muestra para tres donantes diferentes, la presencia de células Treg suprimió fuertemente la proliferación de PBMC autólogas. De este modo, las células Foxp3+ derivadas de PBMC sin tocar son células Treg completamente funcionales capaces de controlar respuestas inmunitarias alogénicas *in vitro*.

El experimento de MLR demuestra claramente la capacidad supresora de las células Treg aisladas *in vitro*. Con respecto a las aplicaciones terapéuticas futuras, es crucial, sin embargo, demostrar que las células Treg sin tocar pueden suprimir también respuestas inmunitarias destructivas *in vivo*. Para este fin, se usó un modelo *in vivo* de GvHD aguda, que se basa en la transferencia de PBMC humanas agotadas en CD25 en ratones Rag2 $^{-/-}$ γc $^{-/-}$ (Mutis, T. et al., Clin Cancer Res 12, 5520-5 (2006)). La eliminación de células Treg de la población celular transferida permite simular una forma particularmente agresiva de la enfermedad que conduce frecuentemente a la muerte de los animales. La depleción de las células Treg a partir de las PBMC se llevó a cabo mediante MACS usando microperlas α -CD25; las células Treg sin tocar se aislaron nuevamente en una única etapa mediante el uso combinado de α -CD127/ α -CD49d junto con un kit de aislamiento de CD4+ comercial. Todos los ratones que recibieron 30×10^6 PBMC agotadas en CD25 mostraron una pérdida de peso más o menos pronunciada en los primeros días del experimento (Fig. 5b). Cuatro de los

6 ratones desarrollaron síntomas clínicos, y, de estos, 2 ratones murieron durante el experimento. En línea con una publicación previa, la gravedad de GvHD inducida por PBMC disminuyó cuando se cotransfrieron células Treg autólogas (Mutis, T. et al., Clin Cancer Res 12, 5520-5 (2006)). En este caso, $0,5 \times 10^6$ células Treg sin tocar fueron suficientes para abolir completamente la pérdida de peso, y todos los ratones del grupo tratado permanecieron sin síntomas durante todo el transcurso del experimento. De este modo, las células Treg sin tocar, asiladas mediante depleción de CD127/CD49d, son células supresoras potentes capaces de controlar respuestas inmunitarias destructivas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Aplicabilidad industrial

El método según la presente invención tiene las siguientes ventajas:

- 10 1.) Seguridad. Las normativas para reactivos empleados en terapia humana son muy estrictas. Esto se aplica particularmente a los compuestos administrados durante el tratamiento. Las células producidas mediante clasificación positiva portan un anticuerpo extraño sobre su superficie. El riesgo inherente de los anticuerpos es difícil de determinar, y también la "humanización" no previene necesariamente los efectos adversos, como se documenta recientemente en el fracaso dramático de α -CD28 superagonista (Suntharalingam, G. et al., N Engl J Med 355, 1018-28 (2006); Sharpe, A. H. y Abbas, A. K., N Engl J Med 355, 973-5 (2006)). El riesgo se evita cuando se usan células Treg sin tocar que se han purificado sólo con anticuerpos depletivos.
- 15 2.) Viabilidad y estado funcional de las células. Otra ventaja que tienen las células sin tocar en comparación con las células clasificadas positivamente es la viabilidad *in vivo*. Las células marcadas con anticuerpos son propensas a la depleción. Los anticuerpos sobre la superficie de células se pueden unir al complemento o, dependiendo del subtipo del anticuerpo, se pueden unir a receptores Fc en la superficie de células NK o de macrófagos. El resultado de esta interacción es a menudo la muerte celular mediante lisis mediada por el complemento o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC). La unión de perlas revestidas con anticuerpos también puede conducir a la formación de racimos celulares más grandes que son eliminados mediante mecanismos de captación no específicos del receptor. Como consecuencia, una fracción significativa de las células transferidas puede ser eliminada antes de que muestren un efecto beneficioso. Además, la unión de anticuerpos a receptores de la superficie celular durante la purificación puede alterar también el estado funcional. La molécula seleccionada como diana durante la clasificación positiva de células Treg es CD25. Ya que la cadena α del receptor de IL-2 es vital para la supervivencia y función de células Treg. El bloqueo puede abolir la expansión y función supresora (Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. y Shevach, E. M., J Immunol 172, 6519-23 (2004); Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. y Rudensky, A. Y., Nat Immunol 6, 1142-51 (2005); Kohm, A. P. et al., J Immunol 176, 3301-5 (2006); McNeill, A., Spittle, E. y Backstrom, B. T., Scand J Immunol 65, 63-9 (2007)), mientras que la reticulación del receptor de IL-2 por los anticuerpos, por otro lado, puede conducir a una activación prematura (Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P. y Bangham, C. R., Blood 106, 988-95 (2005); von Bonin, A., Huhn, J. y Fleischer, B., Immunol Rev 161, 43-53 (1998)), complicaciones potenciales que se pueden evitar simplemente cuando se usan células Treg sin tocar.
- 20 3.) Tiempo y costes. Comparado con los métodos estándar, el nuevo enfoque es barato y rápido. Los CD49d/CD127 se pueden adaptar a todos los métodos de separación habituales. Por ejemplo, el método se puede llevar a cabo usando sólo una única columna de MACS. De este modo, el aislamiento no requiere un equipo caro, y es más rápido y más fácil que los métodos convencionales a base de MACS.
- 25 4.) Pureza y compatibilidad con GMP. Los clasificadores celulares basados en citometría de flujo actualmente no están aceptados para la "buena práctica de fabricación" (GMP). Para ensayos clínicos, el aislamiento de las células de donantes se ha de llevar a cabo mediante tecnologías con perlas magnéticas. Sin embargo, los primeros intentos para aislar células Treg en condiciones GMP produjeron una pureza media menor de 50% (Hoffmann, P. et al., Biol Blood Marrow Transplant 12, 267-74 (2006)). Puesto que la purificación mediante MACS se basó en la selección positiva de células CD25+, las células contaminantes fueron mayoritariamente células efectoras y de memoria CD4+CD25^{bajo}, planteando un riesgo inherente de disparar GvHD cuando se transfieren en pacientes inmunodeficientes. Como método basado en MACS, el nuevo enfoque es compatible con GMP. Las células Treg se obtienen mediante un grado significativamente mayor de pureza >70%, >80%, >90%, >95%, o incluso >98%, virtualmente sin células efectoras CD4+ contaminantes. Además, las células Treg se aíslan sin tocar, lo que mejora adicionalmente la compatibilidad del procedimiento con GMP.

40 En consecuencia, el método de la presente invención ofrece una manera simple y barata de aislar células Foxp3+ Treg humanas. Adicionalmente, el estado "sin tocar" de las células, la elevada pureza y la compatibilidad con GMP del método hace al método ampliamente aplicable en diferentes marcos. Por lo tanto, el nuevo método se puede

emplear para poner a las células Treg humanas “sin tocar” a disposición de la investigación y desarrollo, para el diagnóstico, y también ofrece una nueva perspectiva para el uso habitual para la fabricación de medicamentos para inmunoterapias.

Bibliografía Citada

- 5 Fontenot, J. D. y Rudensky, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6, 331-7 (2005).
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-62 (2004).
- 10 Baecher-Allan, C. y Hafler, D. A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 203-16 (2006)
- Robinson, D. S., Larche, M. y Durham, S. R. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest* 114, 1389-97 (2004)
- Roncarolo, M. G. y Battaglia, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 7, 585-98 (2007)
- 15 Hoffmann, P. et al. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol. Blood Marrow Transplant* 12, 267-74 (2006)
- Seddiki, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203, 1693-700 (2006)
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. y Hafler, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-53 (2001).
- 20 Suntharalingam, G. et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355, 1018-28 (2006).
- Liu, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-11 (2006).
- 25 Hori, S., Nomura, T. y Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-61 (2003)
- Mutis, T. et al. Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2-/-gammac-/- immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 12, 5520-5 (2006)
- Sharpe, A. H. y Abbas, A. K. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 355, 973-5 (2006)
- 30 Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. y Shevach, E. M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172, 6519-23 (2004).
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. y Rudensky, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142-51 (2005).
- 35 Kohm, A. P. et al. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 176, 3301-5 (2006).
- McNeill, A., Spittle, E. y Backstrom, B. T. Partial depletion of CD69low-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand J Immunol* 65, 63-9 (2007).
- Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P. y Bangham, C. R. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106, 988-95 (2005).
- 40 von Bonin, A., Huhn, J. y Fleischer, B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol Rev* 161, 43-53 (1998).
- Randolph, D. A. y Fathman, C. G. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med* 57, 381-402 (2006).

Tang, Q. y Bluestone, J. A. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* 212, 217-37 (2006).

Masteller, E. L. et al. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175, 3053-9 (2005).

5 Waldmann, H. et al. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 16, 119-26 (2004).

Fontenot, J. D. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-41 (2005).

Kleinewietfeld, M. et al. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 105, 2877-86 (2005).

10 Ebert, L. M. y McColl, S. R. Coregulation of CXC chemokine receptor and CD4 expression on T lymphocytes during allogeneic activation. *J Immunol* 166, 4870-8 (2001).

P.T. Sharpe, Methods of Cell Separation, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 18, ELSEVIER (1988).

15 D. Fisher, G. E. Francis, D. Rickwood (Eds.), Cell Separation: A Practical Approach, Oxford University Press (1999).

REIVINDICACIONES

1.- Un método para aislar células T reguladoras Foxp3+ CD25+ humanas (células Foxp3+ Treg) a partir de una muestra que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC), comprendiendo el método las etapas de:

(a) tratar la muestra con un anticuerpo anti-CD127 y un anticuerpo anti-CD49d;

5 (b) separar las células Foxp3+ Treg.

2.- El método según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo simultáneamente.

3.- El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la etapa (a) comprende adicionalmente la separación de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

10 4.- El método según la reivindicación 3, en el que las células T no CD4+ se separan de las PBMC mediante selección negativa usando un anticuerpo anti-CD4.

5.- El método según la reivindicación 3, en el que uno o más anticuerpo/anticuerpos que permiten la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC se usa o usan para la separación de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

15 6.- El método según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo/anticuerpos usado o usados para la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC se selecciona o seleccionan del grupo que comprende anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD49b, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-TCRg/d, y anticuerpo anti-CD235a, o mezclas.

20 7.- El método según la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, y/o anticuerpo anti-CD16 se usa o usan para la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el anticuerpo anti-CD14 y/o el anticuerpo anti-CD16 se usa o usan para la depleción específica de células T no CD4+ a partir de las PBMC.

25 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al menos uno de los anticuerpos usados en la etapa (a) está marcado o inmovilizado.

10.- El método según la reivindicación 9, en el que al menos un anticuerpo usado en la etapa (a) está inmovilizado.

30 11.- El método según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que al menos un anticuerpo usado en la etapa (a) está inmovilizado en una matriz de nailon.

12.- El método según la reivindicación 9, en el que los anticuerpos usados en la etapa (a) están marcados uniformemente.

35 13.- El método según la reivindicación 9 o reivindicación 12, en el que el marcador se selecciona del grupo que comprende isótopos, marcadores de fluorescencia o luminiscencia, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, marcadores de afinidad, y enzimas o sustratos enzimáticos.

14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 12 ó 13, en el que el anticuerpo anti-CD127 está marcado con biotina, fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE).

15.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12 a 14, en el que el anticuerpo anti-CD49d está marcado con biotina, fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE).

40 16.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la etapa (b) se lleva a cabo usando centrifugación, elutriación celular, separación magnética, clasificación celular activada por fluorescencia, separación inmunológica, adhesión, lisis por complemento o citometría de flujo.

17.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la etapa (b) se lleva a cabo

usando separación celular magnética, clasificación celular activada por fluorescencia, o una separación inmunológica a base de columna.

18.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que se usa un anticuerpo anti-CD45RO como anticuerpo adicional en la etapa (a), y en el que las células Foxp3+ Treg aisladas son células T CD45RA+.

19.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que se usa un anticuerpo anti-CD45RA como anticuerpo adicional en la etapa (a), y en el que las células Foxp3+ Treg aisladas son células T CD45RO+.

20.- Un kit para aislar células Foxp3+ Treg humanas, que comprende un anticuerpo anti-CD49d y un anticuerpo anti-CD127.

21.- El kit según la reivindicación 20, en el que el kit comprende adicionalmente uno o más anticuerpo/anticuerpos seleccionados del grupo que comprende anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD49b, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-TCRg/d, y anticuerpo anti-CD235a.

22.- El kit según la reivindicación 20 o reivindicación 21, en el que al menos uno de los anticuerpos está inmovilizado.

23.- El kit según la reivindicación 20 o reivindicación 21, en el que al menos uno de los anticuerpos está marcado.

24.- El kit según la reivindicación 23, en el que los anticuerpos usados están marcados uniformemente.

25.- 25.- El kit según la reivindicación 23 o reivindicación 24, en el que el marcador se selecciona del grupo que comprende isótopos, marcadores de fluorescencia o luminiscencia, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, marcadores de afinidad, y enzimas o sustratos enzimáticos.

26.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 20, 21, 23, 24 ó 25, en el que el anticuerpo anti-CD127 está marcado con biotina, FITC, o PE, y el anticuerpo anti-CD49d está marcado con biotina, FITC, o PE.

27.- 27.- Uso de un anticuerpo anti-CD49d y un anticuerpo anti-CD127 o de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26 para el aislamiento de células Foxp3+ Treg humanas.

28.- El uso según la reivindicación 27, caracterizado porque la separación de las células Foxp3+ Treg humanas se logra separando las PBMC CD49d+CD127+, incluyendo células T CD4+ no reguladoras, de células Foxp3+ Treg no marcadas vía centrifugación, elutriación celular, separación magnética, clasificación celular activada por fluorescencia, separación inmunológica, adhesión, lisis por complemento o citometría de flujo.

29.- El uso según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, caracterizado porque la depleción de células T no CD4+ a partir de las PBMC se lleva a cabo usando al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD49b, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-TCRg/d, y anticuerpo anti-CD235a.

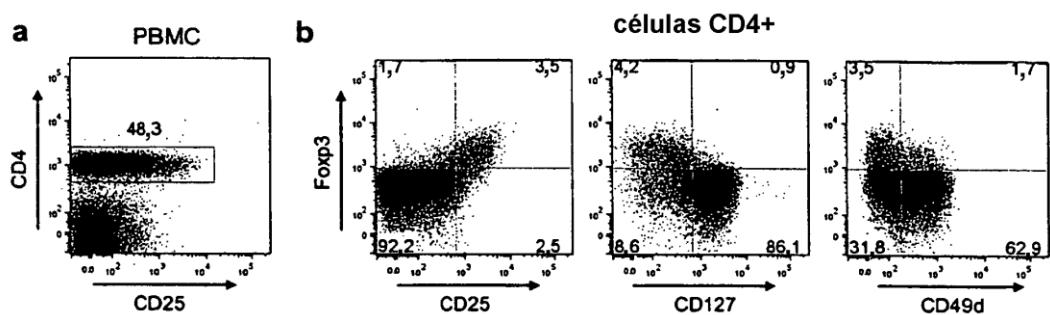


Fig. 1

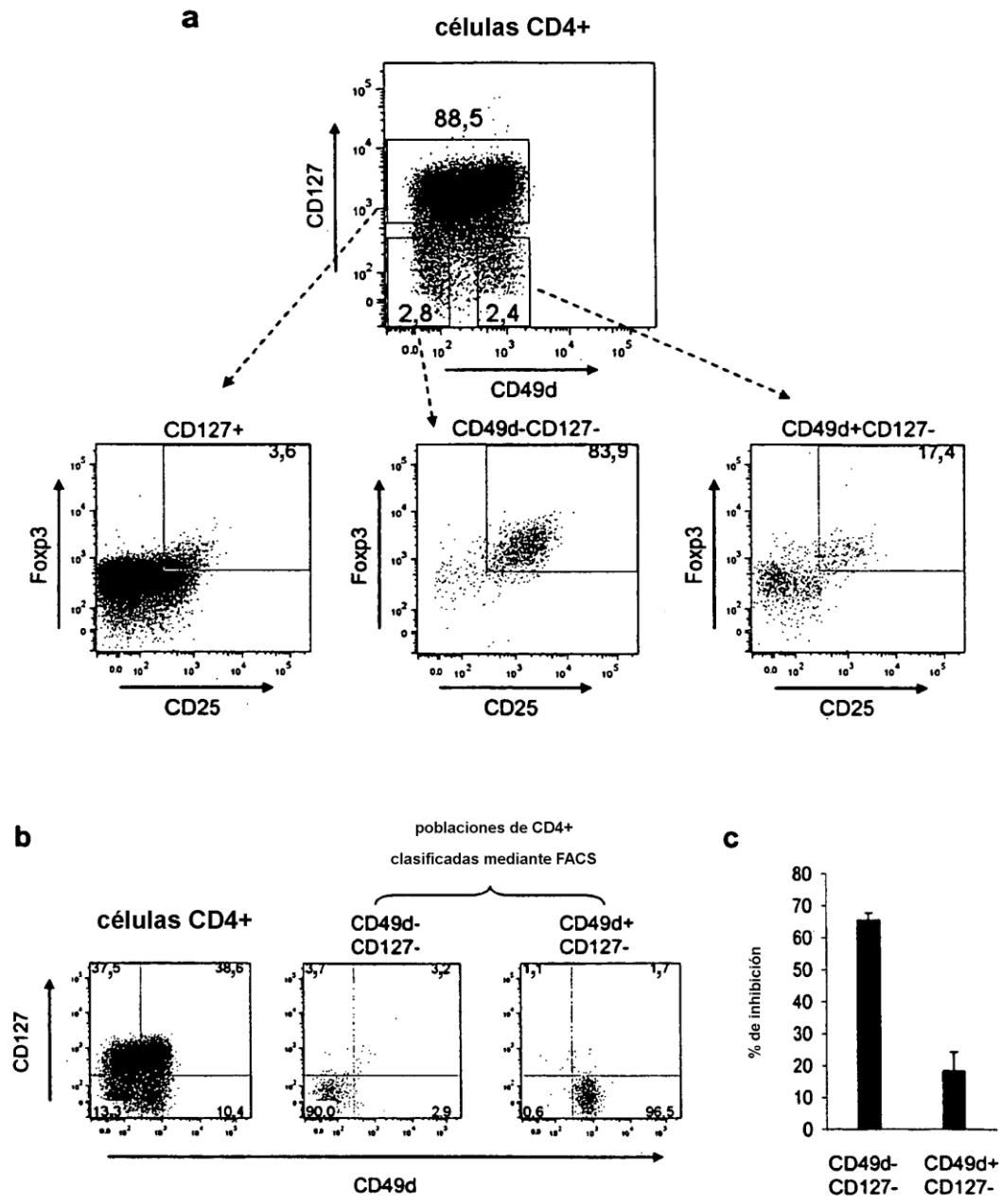


Fig. 2

PBMC completas (antes de clasificar células vivas)

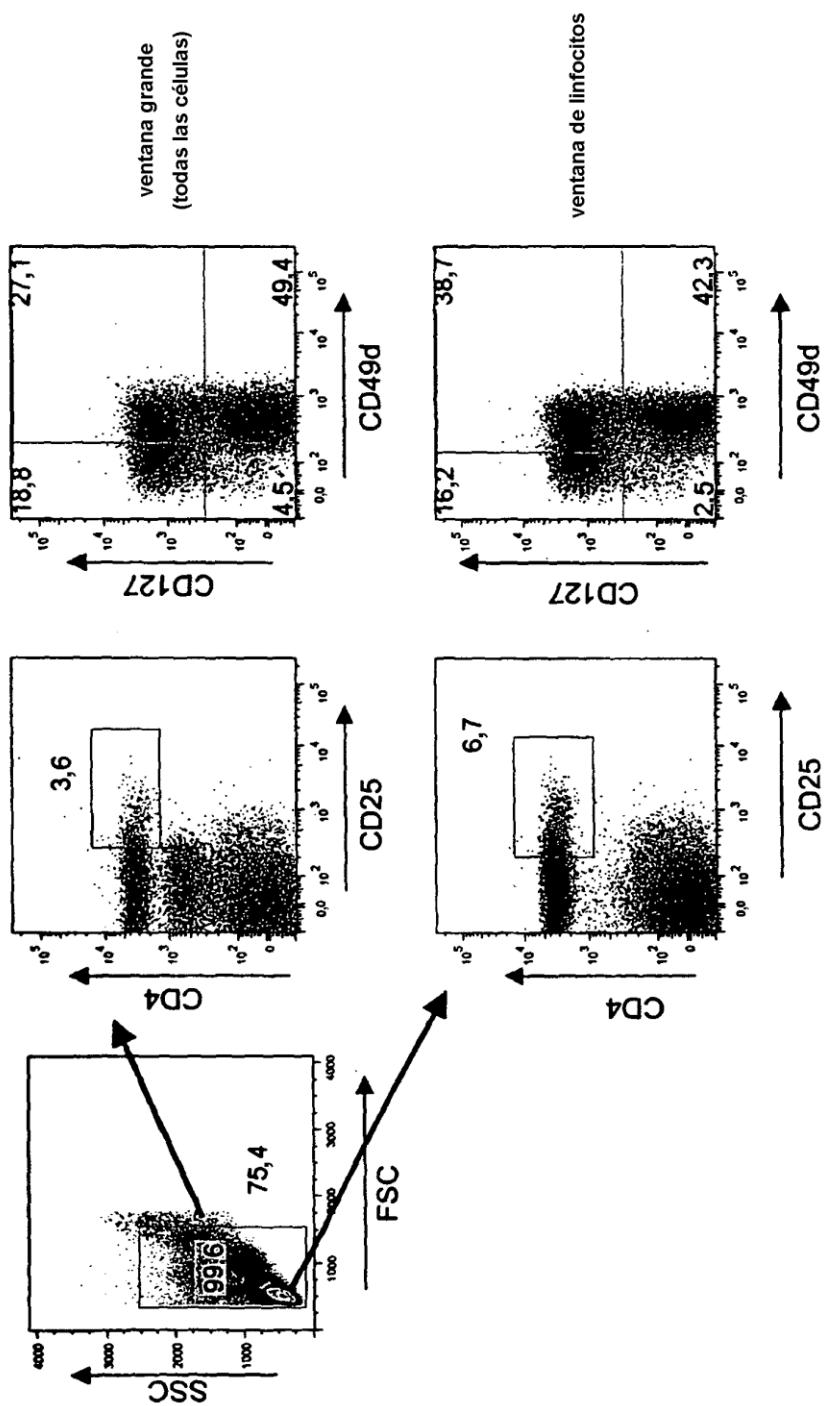


Fig.3a

Células Treg (después de clasificar células vivas)

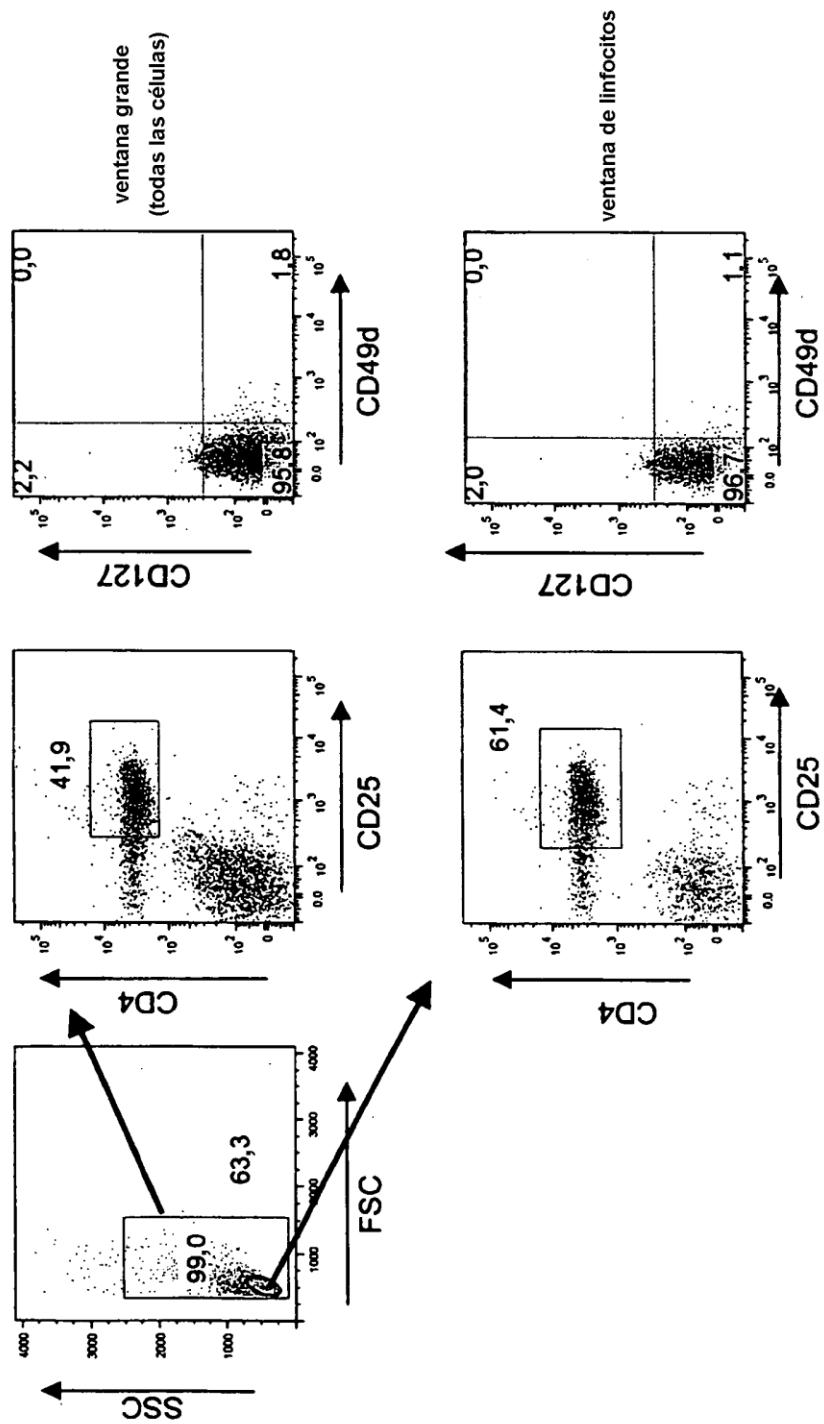


Fig.3b

PBMC completas (antes de clasificar células fijas)

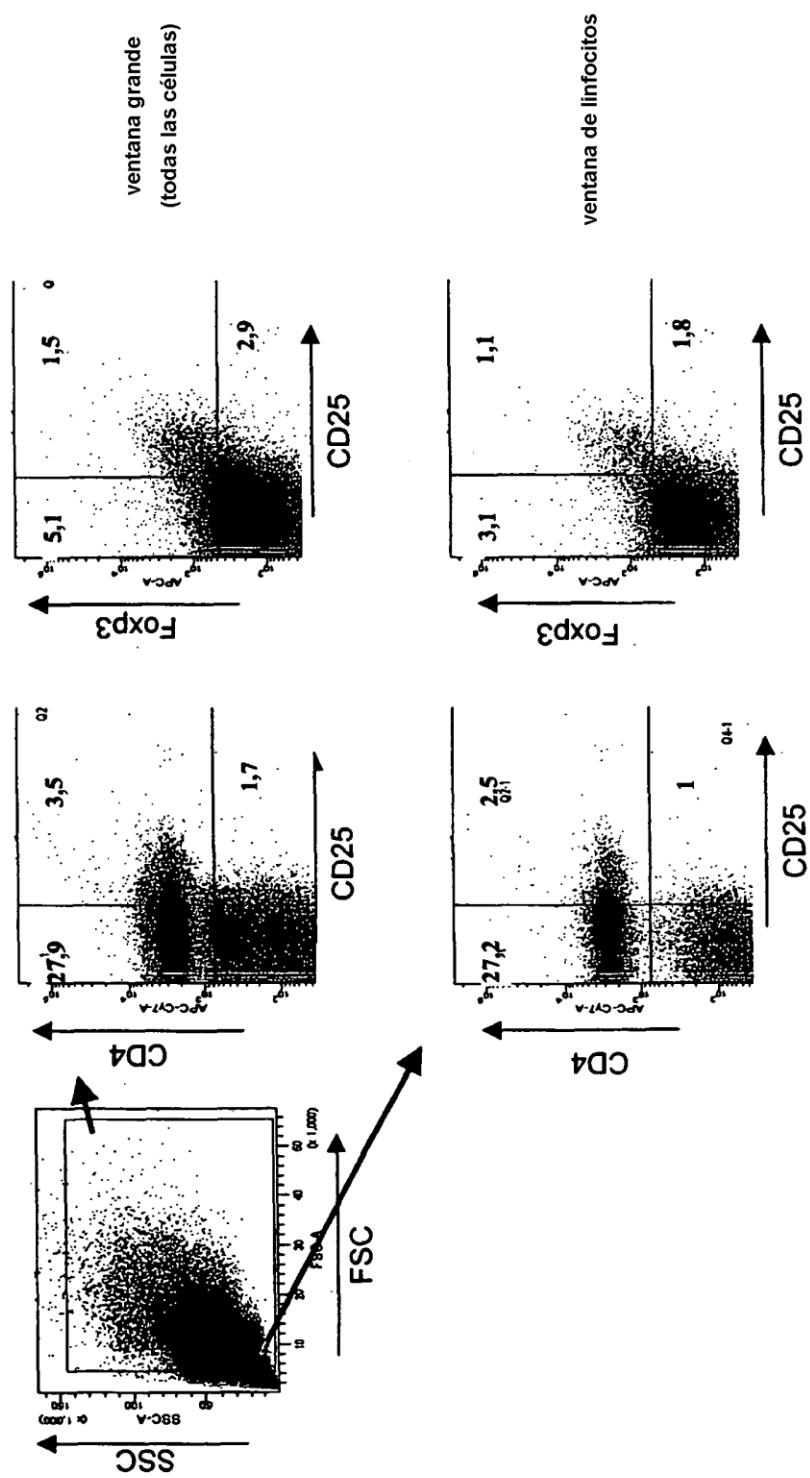


Fig.4a

Células Treg (después de clasificar células fijas)

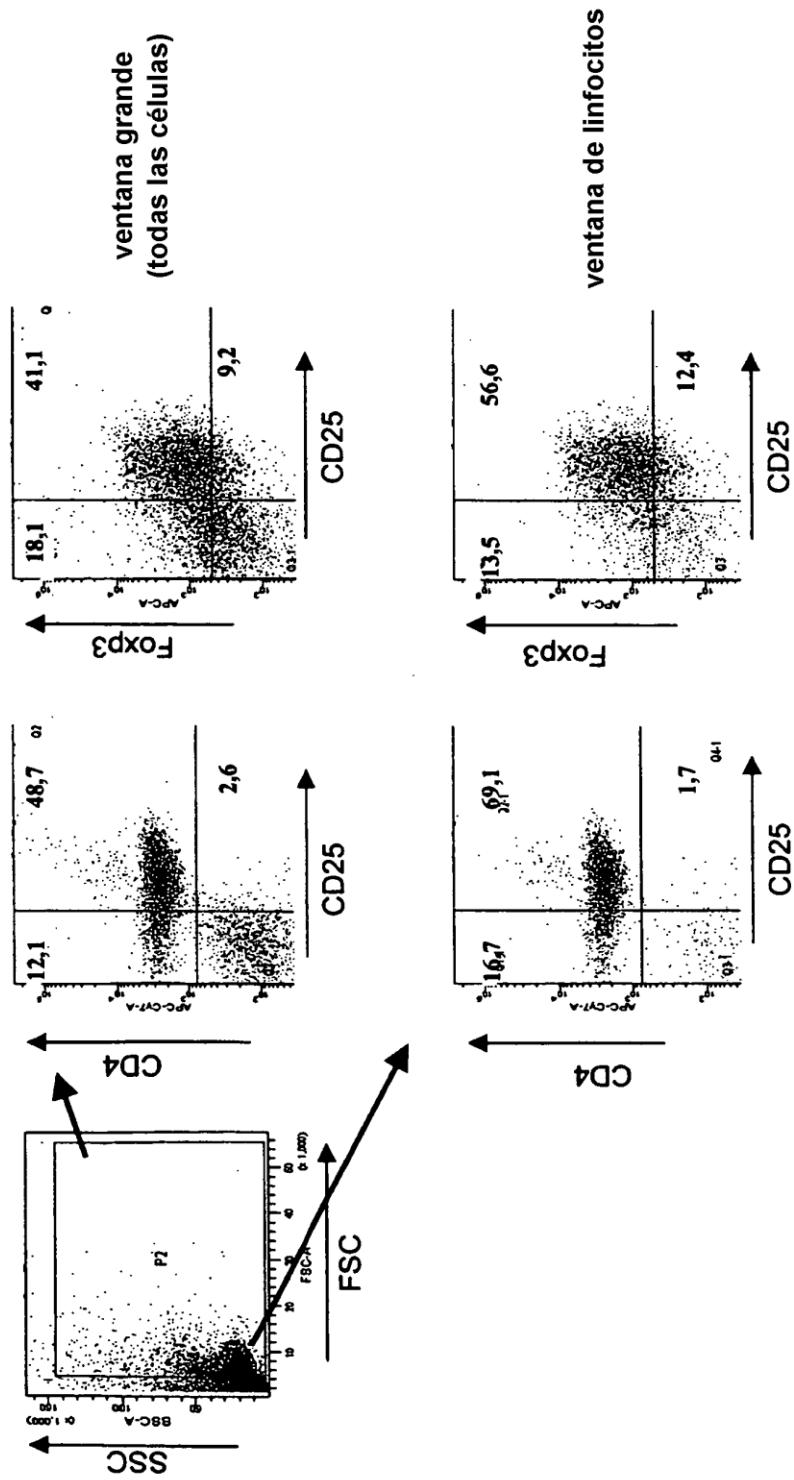


Fig. 4b

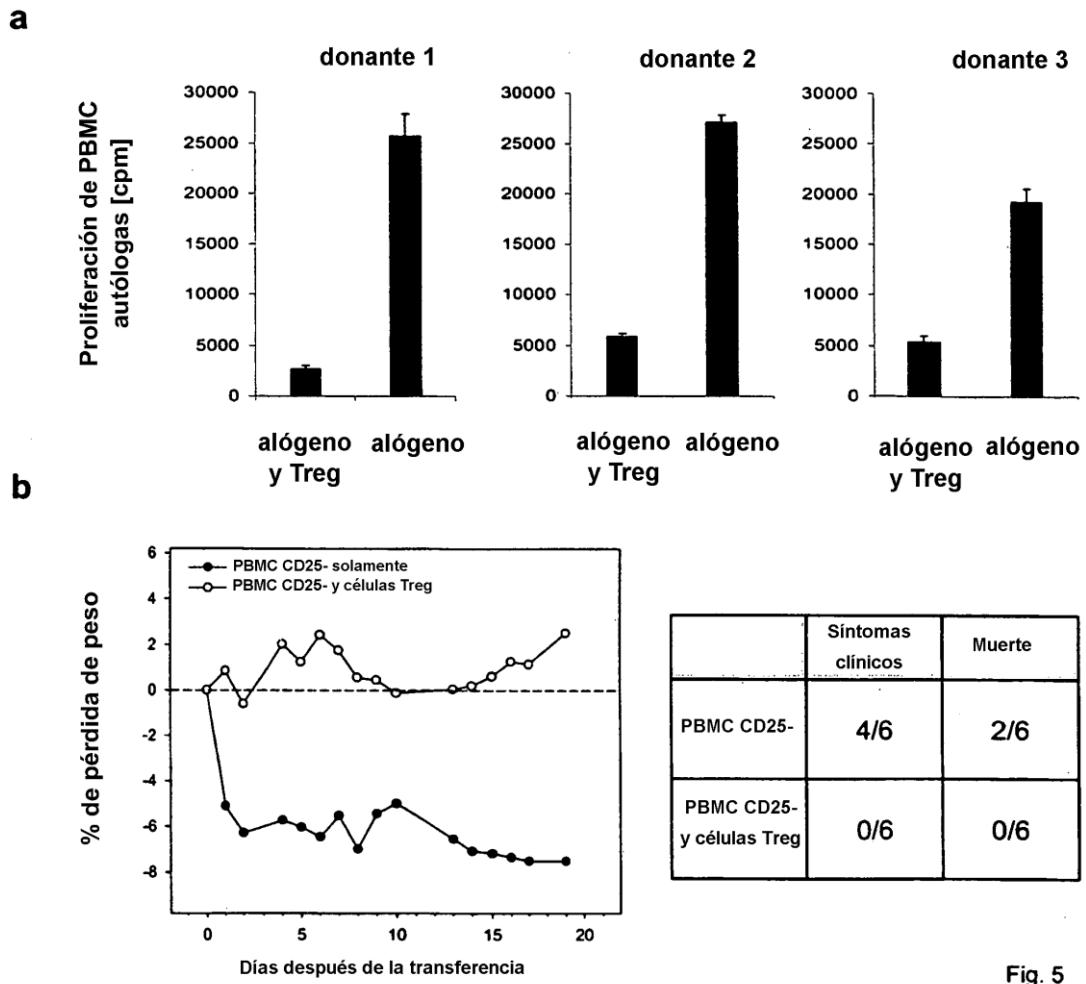


Fig. 5