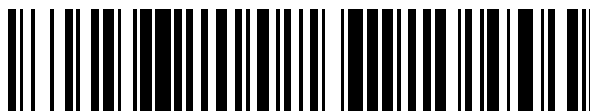


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 825 718**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 16166807 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3112866**

54 Título: **Activación específica de una célula T reguladora y su uso para el tratamiento del asma, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos y para la inducción de tolerancia**

30 Prioridad:

01.02.2007 EP 07101604

05.12.2007 EP 07122424

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

17.05.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, FRANZ-JOSEF;
BECKER, CHRISTIAN;
BOPP, TOBIAS;
JONULEIT, HELMUT y
SCHMITT, EDGAR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 825 718 T3

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

DESCRIPCIÓN

Activación específica de una célula T reguladora y su uso para el tratamiento del asma, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos y para la inducción de tolerancia

5 Introducción
El asma, las enfermedades alérgicas, el rechazo de trasplantes y las enfermedades autoinmunes comparten un principio fundamental, que todas son activadas por un sistema inmunológico desequilibrado que reacciona de modo hiperactivo frente a una exposición endógena y/o exógena específica y, con ello, contribuye significativamente al estado de enfermedad.

10
15 En general se acepta que estas aberraciones del sistema inmunológico comparten un mecanismo patofisiológico activado por células T efectoras hiperrespondedoras que desempeñan un papel fundamental en la reactividad inmunológica. Por tanto, una inmunomodulación dirigida a las células T efectoras resulta clave para un tratamiento con éxito del asma, los trastornos autoinmunes, la prevención de la enfermedad del injerto contra el receptor y la prevención del rechazo de injertos.

20 Los linfocitos T denominados células T reguladoras ("células Treg") controlan las respuestas inmunológicas reprimiendo la función efectora de las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺ (Shevach, 2002). Se han descrito diferente subconjuntos de células Treg. Estos incluyen, pero no se limitan a (i) células Treg CD4⁺CD25⁺ - también denominadas "células Treg naturales" (Sakaguchi, 2005), (ii) Tr1 (Roncarolo *et al.*, 2001), y (iii) Th3 (Weiner, 2001). Tr1 y Th3 son inducidas en la periferia, mientras que las células Treg CD4⁺CD25⁺ se desarrollan en el timo y constituyen 5-10% de las células T CD4⁺ periféricas en el ser humano sano. Al menos *in vitro*, estas células son anérgicas, producen cantidades mínimas de citoquinas y ejercen sus efectos supresores solo tras la estimulación y de una manera estrictamente dependiente del contacto celular. Tr1 y Th3 ejercen su actividad represora mediante la producción de IL-10 y TGF-beta, respectivamente (Shevach, 2002).

30 Los defectos genéticos que afectan principalmente al desarrollo o la función de las células Treg deberían provocar aberraciones autoinmunes e inflamatorias. El síndrome IPEX (inmunodesregulación, poliendocrinopatía y enteropatía, ligado a X), un trastorno recesivo poco común en los seres humanos, está provocado por una mutación en el gen del factor de la transcripción FOXP3 y la posterior ausencia de células Treg. El IPEX muestra una autoinmunidad agresiva, eccema grave, unos niveles elevados de IgE, eosinofilia y alergias alimentarias y una muerte temprana (Fontenot y Rudensky, 2005).

35 Los datos de la bibliografía demuestran que las células Treg desempeñan un papel importante en el asma y las enfermedades autoinmunes, y que tienen potencial para el tratamiento de GVHD y, con ello, de la tolerancia a los trasplantes (Robinson, 2004; Sakaguchi, 2005).

40 Por tanto, se ha intentado empezar a emplear las células Treg como agente terapéutico para pacientes con una enfermedad autoinmune establecida (Horwitz *et al.*, 2003). Se cree que dichos pacientes que carecen de las células Treg suficientes o presentan una función alterada de las células Treg que produce una actividad de células T efectoras descontrolada y mal dirigida. La idea previa para resolver este problema ha sido la administración de células Treg a dicho paciente. Puesto que las células Treg son muy escasas en la sangre periférica, la aplicación clínica de células Treg humanas depende de la expansión *ex vivo*, muy cara, de las células Treg (Hoffmann *et al.*, 2004; Horwitz *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004). Bluestone y Tang van un paso más allá: intentan resolver el problema no solo aumentando la cantidad de células Treg para terapia, sino también potenciando la actividad represora de las células Treg mediante la activación de las células Treg por medio de la activación del receptor de células T (TCR) con un anticuerpo anti-CD3 (Bluestone y Tang, 2004). En esta estrategia no se produce una activación específicas de células Treg, puesto que el anti-CD3 activa todas las células que expresan el receptor de células T, lo cual constituye un obstáculo, porque el tratamiento de anti-CD3 induce la función de las células T efectoras, lo cual conduce probablemente a una proliferación incontrolada y a la producción de citoquinas proinflamatorias no específicas y la exacerbación de la patología. Para eludir este efecto activador no deseado de las células T efectoras, las células Treg deben estar muy purificadas y deben ser activadas *ex vivo* con anti-CD3 que, de nuevo, es un procedimiento muy caro y laborioso. Además, la ausencia de un marcador específico de células Treg dificulta lograr una alta pureza de células Treg.

60 Por tanto, un objetivo principal es identificar una sustancia que pueda activar a las células Treg específicamente sin estimular más al sistema inmunológico y, por tanto, proporcionaría una base para la aplicación directa *in vivo* sin tratamientos *ex vivo* caros.

Un anticuerpo monoclonal 4C8 puede proporcionar una señal coestimuladora a células T CD4⁺ humanas y puede inducir a las células T reguladoras (Treg) a través de CD52, que es el antígeno de 4C8mAb. Otra estrategia se describe en el documento JP 02152989 A.

65 Se han descrito compuestos que interfieren con la unión de los anticuerpos anti-CD4 al epitopo OKT4A/Leu3a del receptor CD4, que inhiben la unión del anticuerpo anti-gp120 a células MT-4 infectadas.

El documento US 4.695.459 A describe ciertas enfermedades autoinmunes que pueden prevenirse o atenuarse empleando un anticuerpo anti-CD4 que es citotóxico para las células T de fenotipo Leu3 (CD).

5 El documento US 6.455.497 B1 describe un método y materiales para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-16 o una molécula que imita a IL-16.

10 El documento WO 2007/035551 A describe un ensayo y un método para identificar un agonista de GPR 83 capaz de estimular la función de las células T reguladoras. Se ha investigado la capacidad de un compuesto de ensayo para estimular la función de las células T reemplazadoras.

15 El documento US 2005/048587 A1 describe un método para identificar un compuesto modulador de la tolerancia empleando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 como agente estimulante.

20 Además, existe alguna información en la técnica anterior acerca de cómo pueden activarse las células Treg, por ejemplo, de modo no específico a través de la vía de CD3 (Thornton y Shevach, 1998), o a través de la vía de CD28/B7 (Shevach, 2002; Bluestone y Tang, 2004; Hunig y Dennehy, 2005), o a través de la vía de CD4 (documento WO 2004/083247 A1).

25 De modo más específico, el documento WO 2004/083247 A1 se refiere a un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo anti-CD4 monoclonal de ratón B-F5. Dicho anticuerpo es capaz de activar células T reguladoras CD25+CD4+ y es útil para preparar composiciones inmunosupresoras. hB-F5 proporciona una inmunosupresión eficaz, reflejada por un efecto clínico positivo en pacientes con artritis reumatoide, cuando se emplea en un tratamiento de 10 días a una dosis tan baja como de 1 mg/día, y preferiblemente a una dosis de 5 mg cada dos días.

30 El documento WO 2004/072296 A2 describe un método para inhibir una respuesta inmunológica anómala mediante la administración a un sujeto que lo necesite de una molécula de gp120, o uno de sus equivalentes funcionales, en una cantidad eficaz para inhibir una respuesta inmunológica anómala. Según las observaciones, la molécula de gp120 inhibe la infiltración no deseada de células T, con lo que la respuesta inmunológica anómala se reduce hasta un nivel normal. También describe un método para potenciar la migración de células inmunológicas específicas de antígeno hacia una diana que expresa un antígeno mediante la administración a un sujeto que lo necesite de un agente que inhibe la fagocitosis mediada por gp120, en una cantidad eficaz para potenciar la migración de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno hacia un virus de VIH o un virus de VIH asociado a una célula. La modulación de las células T reguladoras no se menciona.

35 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto alternativo adecuado para la activación de células Treg y el uso de dichos compuestos como medicamentos, y proporcionar un sistema de ensayo y métodos para determinar si una célula Treg ha sido activada.

40 Exposición de la Invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas y, por tanto, se refiere a un activador de células Treg para la activación de células reguladoras (Treg) a través de la interacción con un epítipo de células Treg, como se indica en SEC ID NO:1, y dicho activador de células Treg es un polipéptido que comprende una

45 secuencia de aminoácidos como se indica en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, o SEC ID NO:10 para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, que se caracteriza porque su cuadro clínico se ve influido positivamente por un aumento en las células Treg activadas en respuesta al activador de epítipo células Treg, seleccionada del grupo que consiste en asma alérgico, dermatitis atópica, alergia alimentaria, enfermedad del receptor frente al injerto, artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitaria, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, pénfigoide, una enfermedad inflamatoria debida a un trasplante de órganos o un trasplante de médula ósea.

50 La invención también se refiere a un uso *ex vivo* de un epítipo de una proteína de CD4 humana, que comprende los aminoácidos n.ºs 1-31 de SEC ID NO:1 para la activación de células Treg a través de la interacción con un activador de células Treg que se une a dicho epítipo.

55 La invención se refiere además al uso de un sistema de ensayo para determinar si una sustancia es un activador de células Treg para la activación de células reguladoras (Treg) a través de la interacción con un epítipo de células Treg, como se indica en SEC ID NO:1, comprendiendo dicho sistema de ensayo al menos:

- 60 (a) una célula Treg, y
 (b) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEC ID NO:1, en el que el sistema de ensayo comprende una PBMC ("peripheral blood mononuclear cell", célula mononuclear de sangre periférica) con merma de CD3 singénica inactivada o una célula dendrítica ("dendritic cell", DC) y
 65 (c) una célula T CD8+ alogénea o una célula T CD4+ alogénea, para determinar si una sustancia es un

activador de células reguladoras (Treg).

Por último, la invención se refiere a un método para determinar si una sustancia es un activador de células Treg para la activación de células reguladoras (Treg) a través de la interacción con un epitopo de células Treg, como se indica en SEC ID NO:1, que comprende:

- (a) preseleccionar una sustancia que puede interaccionar con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4,
- (b) proporcionar una disolución que comprende (i) una célula Treg, y preferiblemente además (ii) una PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) con merma de CD3 singénica inactivada o una célula dendrítica (DC), y (iii) una célula T CD8+ alogeneica o una célula T CD4+ alogeneica,
- (c) añadir la sustancia preseleccionada a (a) bajo condiciones que permiten la interacción de la sustancia con la célula Treg,
- (d) medir si la célula Treg se ha activado, en el que la medición de si una célula Treg se ha activado se determina midiendo si una célula T CD8+ o CD4+ ha sido reprimida, en el que una célula T CD8+ o CD4+ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, identifica la sustancia como un activador de células Treg.

Todos los demás aspectos de la invención descritos en la presente se ofrecen solo con fines ilustrativos.

La presente invención se basa en el nuevo descubrimiento de que un epitopo específico de CD4 desencadena la activación de células Treg. Dicho epitopo se solapa con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 conocido, pero, sorprendentemente, la unión a este sitio provoca la activación de las células Treg. Este descubrimiento resulta totalmente inesperado por las siguientes razones: hasta la fecha, la activación de las células Treg a través de CD4 se ha atribuido a un epitopo diferente al que se une el anticuerpo monoclonal BF5 (documento WO04083247). Carriere *et al.*, 1995, han investigado si el sitio de unión de BF5 sobre CD4 es completamente independiente del sitio de unión a gp120 de VIH-1. De modo inesperado, a pesar de los informes en la bibliografía sobre la anergización directa y el bloqueo de CD4 de la función de las células T por la gp120 de VIH-1 (Diamond *et al.*, 1988), los inventores han descubierto una propiedad activadora de la gp120 de VIH-1 en CD4 de las células Treg.

La presente invención describe un epitopo CD4 fisiológicamente activo sobre una célula Treg que desencadena una actividad supresora de una célula Treg. El epitopo de la presente invención se ha identificado como una región sobre la proteína de CD4 humana (SEC ID NO:2) que abarca las posiciones de aminoácidos n.ºs 54 a 84 de SEC ID NO:2. Estos 31 aminoácidos se indican explícitamente en SEC ID NO:1.

Un péptido preferido que es un fragmento de CD4 según la presente invención se selecciona de un grupo que consiste en un péptido aislado que abarca los aminoácidos n.ºs 1-31 of SEC ID NO:1, n.ºs 26 a 458 de SEC ID NO:2, n.ºs 26 a 419 of SEC ID NO:2, n.ºs 26 a 207 de SEC ID NO:2, n.ºs 26 a 131 de SEC ID NO:2, y n.ºs 46 a 89 de SEC ID NO:2. Todos estos péptidos se caracterizan además porque todos portan el aminoácido crítico fenilalanina en el resto 68 de SEC ID NO:2.

El descubrimiento de que el epitopo que aparece en SEC ID NO:1 es clave para activar una célula Treg proporciona la base para varios usos, por ejemplo:

Métodos para la identificación de una sustancia que puede activar una célula T reguladora (célula Treg).

Dicha sustancia se denomina un "activador de células Treg" de la presente invención, y es útil para el tratamiento de una enfermedad de la invención, que es una enfermedad en la que el aumento de células T reguladoras (células Treg) activadas puede mejorar el cuadro clínico, en la que dicha enfermedad es (i) una enfermedad inflamatoria no autoinmune: asma alérgico, dermatitis atópica, alergia alimentaria, enfermedad del injerto contra el receptor; (ii) una enfermedad inflamatoria autoinmune: artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamatoria autoinmune, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, penfigoide; (iii) una enfermedad inflamatoria debido al trasplante de un órgano; (iv) un trasplante de médula ósea.

Una "sustancia" de la presente invención puede emplearse en un método según la presente invención. El significado del término sustancia, según la presente invención, incluye, pero no se limita a un péptido, un péptido de andamiaje, un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, una molécula de ácido nucleico, una ribozima, un compuesto orgánico o un compuesto inorgánico.

En un segundo aspecto, el nuevo epitopo actúa como base para la síntesis de una nueva herramienta que puede emplearse, por ejemplo, en un ensayo de competición o un ensayo de selección según la presente invención para determinar si una sustancia puede activar una célula T reguladora (célula Treg) a través de la interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1. Esta herramienta es un péptido que es un péptido aislado que abarca los aminoácidos n.ºs 1-31 de SEC ID NO:1, o n.ºs 26 a 458 de SEC ID NO:2, o n.ºs 26 a 419 de SEC ID NO:2, o n.ºs 26 a 207 de SEC ID NO:2, o n.ºs 26 a 131 de SEC ID NO:2, o n.ºs 46 a 89 de SEC ID NO:2., o es un péptido aislado que abarca los aminoácidos n.ºs 1 a 31 de SEC ID NO:1 y que tiene aminoácidos adicionales cadena arriba y/o cadena abajo, con el prerrequisito de que los aminoácidos adicionales no impidan la unión de una sustancia al tramo de

aminoácidos indicado en SEC ID NO:1.

Un péptido preferido según la presente invención consiste en el péptido indicado en SEC ID NO:1 y además consiste en un aminoácido o un tramo de aminoácidos adicional cadena arriba que se selecciona de un grupo que consiste en el aminoácido o el tramo de aminoácidos indicado en SEC ID NO:2 en la posición 53, en la posición 52-53, en la posición 51-53, en la posición 50-53, en la posición 49-53, en la posición 48-53, en la posición 47-53, en la posición 46-53, en la posición 45-53, en la posición 44-53, en la posición 43-53, en la posición 42-53, en la posición 41-53, en la posición 40-53, en la posición 39-53, en la posición 38-53, en la posición 37-53, en la posición 36-53, en la posición 35-53, en la posición 34-53, en la posición 33-53, en la posición 32-53, en la posición 31-53, en la posición 30-53, en la posición 29-53, en la posición 28-53, en la posición 27-53, en la posición 26-53, en la posición 25-53, en la posición 24-53, en la posición 23-53, en la posición 22-53, en la posición 21-53, en la posición 20-53, en la posición 19-53, en la posición 18-53, en la posición 17-53, en la posición 16-53, en la posición 15-53, en la posición 14-53, en la posición 13-53, en la posición 12-53, en la posición 11-53, en la posición 10-53, en la posición 9-53, en la posición 8-53, en la posición 7-53, en la posición 6-53, en la posición 5-53, en la posición 4-53, en la posición 3-53, en la posición 2-53, y en la posición 1-53.

Otro péptido preferido según la presente invención consiste en el péptido que se menciona como "péptido preferido" en el anterior párrafo y que consiste además en al menos un aminoácido adicional cadena abajo como se muestra en SEC ID NO:2 en la posición 85, o que consiste además en los aminoácidos que aparecen en la SEC ID NO:2 en la posición 85 a n, siendo n un número entero entre 86-458, es decir, la posición 85 a 86, 85 a 87, 85 a 88, 85 a 89, 85 a 90, 85 a 91, 85 a 92, 85 a 93, 85 a 94, 85 a 95, 85 a 96, 85 a 97, 85 a 98, 85 a 99, 85 a 100, 85 a 101, 85 a 102, 85 a 103, 85 a 104, 85 a 105, 85 a 106, 85 a 107, 85 a 108, 85 a 109, 85 a 110, 85 a 111, 85 a 112, 85 a 113, 85 a 114, 85 a 115, 85 a 116, 85 a 117, 85 a 118, 85 a 119, 85 a 120, 85 a 121, 85 a 122, 85 a 123, 85 a 124, 85 a 125, 85 a 126, 85 a 127, 85 a 128, 85 a 129, 85 a 130, 85 a 131, 85 a 132, 85 a 133, 85 a 134, 85 a 135, 85 a 136, 85 a 137, 85 a 138, 85 a 139, 85 a 140, 85 a 141, 85 a 142, 85 a 143, 85 a 144, 85 a 145, 85 a 146, 85 a 147, 85 a 148, 85 a 149, 85 a 150, 85 a 151, 85 a 152, 85 a 153, 85 a 154, 85 a 155, 85 a 156, 85 a 157, 85 a 158, 85 a 159, 85 a 160, 85 a 161, 85 a 162, 85 a 163, 85 a 164, 85 a 165, 85 a 166, 85 a 167, 85 a 168, 85 a 169, 85 a 170, 85 a 171, 85 a 172, 85 a 173, 85 a 174, 85 a 175, 85 a 176, 85 a 177, 85 a 178, 85 a 179, 85 a 180, 85 a 181, 85 a 182, 85 a 183, 85 a 184, 85 a 185, 85 a 186, 85 a 187, 85 a 188, 85 a 189, 85 a 190, 85 a 191, 85 a 192, 85 a 193, 85 a 194, 85 a 195, 85 a 196, 85 a 197, 85 a 198, 85 a 199, 85 a 200, 85 a 201, 85 a 202, 85 a 203, 85 a 204, 85 a 205, 85 a 206, 85 a 207, 85 a 208, 85 a 209, 85 a 210, 85 a 211, 85 a 212, 85 a 213, 85 a 214, 85 a 215, 85 a 216, 85 a 217, 85 a 218, 85 a 219, 85 a 220, 85 a 221, 85 a 222, 85 a 223, 85 a 224, 85 a 225, 85 a 226, 85 a 227, 85 a 228, 85 a 229, 85 a 230, 85 a 231, 85 a 232, 85 a 233, 85 a 234, 85 a 235, 85 a 236, 85 a 237, 85 a 238, 85 a 239, 85 a 240, 85 a 241, 85 a 242, 85 a 243, 85 a 244, 85 a 245, 85 a 246, 85 a 247, 85 a 248, 85 a 249, 85 a 250, 85 a 251, 85 a 252, 85 a 253, 85 a 254, 85 a 255, 85 a 256, 85 a 257, 85 a 258, 85 a 259, 85 a 260, 85 a 261, 85 a 262, 85 a 263, 85 a 264, 85 a 265, 85 a 266, 85 a 267, 85 a 268, 85 a 269, 85 a 270, 85 a 271, 85 a 272, 85 a 273, 85 a 274, 85 a 275, 85 a 276, 85 a 277, 85 a 278, 85 a 279, 85 a 280, 85 a 281, 85 a 282, 85 a 283, 85 a 284, 85 a 285, 85 a 286, 85 a 287, 85 a 288, 85 a 289, 85 a 290, 85 a 291, 85 a 292, 85 a 293, 85 a 294, 85 a 295, 85 a 296, 85 a 297, 85 a 298, 85 a 299, 85 a 300, 85 a 301, 85 a 302, 85 a 303, 85 a 304, 85 a 305, 85 a 306, 85 a 307, 85 a 308, 85 a 309, 85 a 310, 85 a 311, 85 a 312, 85 a 313, 85 a 314, 85 a 315, 85 a 316, 85 a 317, 85 a 318, 85 a 319, 85 a 320, 85 a 321, 85 a 322, 85 a 323, 85 a 324, 85 a 325, 85 a 326, 85 a 327, 85 a 328, 85 a 329, 85 a 330, 85 a 331, 85 a 332, 85 a 333, 85 a 334, 85 a 335, 85 a 336, 85 a 337, 85 a 338, 85 a 339, 85 a 340, 85 a 341, 85 a 342, 85 a 343, 85 a 344, 85 a 345, 85 a 346, 85 a 347, 85 a 348, 85 a 349, 85 a 350, 85 a 351, 85 a 352, 85 a 353, 85 a 354, 85 a 355, 85 a 356, 85 a 357, 85 a 358, 85 a 359, 85 a 360, 85 a 361, 85 a 362, 85 a 363, 85 a 364, 85 a 365, 85 a 366, 85 a 367, 85 a 368, 85 a 369, 85 a 370, 85 a 371, 85 a 372, 85 a 373, 85 a 374, 85 a 375, 85 a 376, 85 a 377, 85 a 378, 85 a 379, 85 a 380, 85 a 381, 85 a 382, 85 a 383, 85 a 384, 85 a 385, 85 a 386, 85 a 387, 85 a 388, 85 a 389, 85 a 390, 85 a 391, 85 a 392, 85 a 393, 85 a 394, 85 a 395, 85 a 396, 85 a 397, 85 a 398, 85 a 399, 85 a 400, 85 a 401, 85 a 402, 85 a 403, 85 a 404, 85 a 405, 85 a 406, 85 a 407, 85 a 408, 85 a 409, 85 a 410, 85 a 411, 85 a 412, 85 a 413, 85 a 414, 85 a 415, 85 a 416, 85 a 417, 85 a 418, 85 a 419, 85 a 420, 85 a 421, 85 a 422, 85 a 423, 85 a 424, 85 a 425, 85 a 426, 85 a 427, 85 a 428, 85 a 429, 85 a 430, 85 a 431, 85 a 432, 85 a 433, 85 a 434, 85 a 435, 85 a 436, 85 a 437, 85 a 438, 85 a 439, 85 a 440, 85 a 441, 85 a 442, 85 a 443, 85 a 444, 85 a 445, 85 a 446, 85 a 447, 85 a 448, 85 a 449, 85 a 450, 85 a 451, 85 a 452, 85 a 453, 85 a 454, 85 a 455, 85 a 456, 85 a 457, o 85 a 458.

Además, el descubrimiento de que el epitopo indicado en SEC ID NO:1 es clave para activar una célula Treg es una conexión entre dos campos técnicos diferentes, hasta ahora no relacionados, concretamente el campo de (a) las enfermedades relacionadas con el VIH-1, con (b) las enfermedades descritas en la presente invención, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, alergia, asma, rechazo de injertos y enfermedades debidas a carecer de inmunotolerancia provocada por el transplantado de órganos o por la administración terapéutica de una entidad biológica propia o extraña a un ser humano que lo necesite y, con ello, permite una gran cantidad de nuevos usos, tal como se explica a continuación:

El epitopo que aparece en SEC ID NO:1 no solo es otro epitopo que puede utilizarse para activar células Treg. La gp120 de VIH-1 gp120 interacciona con CD4 de células T y con ello permite la entrada del virus en una célula CD4⁺ (Klatzmann *et al.*, 1984). El descubrimiento de que el epitopo que aparece en SEC ID NO:1 porta el sitio de alta afinidad de unión en CD4 con el que se une la glicoproteína gp120 de virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) (Jameson *et al.*, 1988; Arthos *et al.*, 1989) ofrece otra ventaja. Proporciona la base para juntar los

descubrimientos de dos campos técnicos diferentes no relacionados, es decir, las enfermedades relacionadas con el VIH-1 con las enfermedades descritas en la presente invención.

5 Para aliviar el problema mundial del VIH-1 se ha realizado un gran esfuerzo por identificar una sustancia que sea capaz de inhibir la entrada del VIH-1 en una célula CD4⁺. Como resultado, en la técnica se conocen los denominados inhibidores de la entrada o la unión del VIH-1. La llave que permite al VIH-1 entrar en la célula puede emplearse como llave para activar las células Treg. Por tanto, las sustancias conocidas en la técnica por interferir con la unión y entrada del VIH-1 en las células (Markovic y Clouse; 2004; Castagna *et al.*, 2005), como, por ejemplo, la propia gp120 de VIH-1, sus derivados, peptidomiméticos, anticuerpos, aptámeros o cualquier compuesto de bajo peso molecular (BPM) dirigidos contra el sitio de unión de la gp120 de VIH-1 en CD4 probablemente pueden ser útiles para activar una célula Treg y, así, pueden ser útiles para el tratamiento de una enfermedad descrita en la presente invención (la gp120 de VIH-1 es muy conocida en la técnica y su secuencia de aminoácidos, así como el gen respectivo, ha sido publicada hace años (Muesing *et al.*, 1985; Starcich *et al.*, 1986; Jeffs *et al.*, 1996). Además se conocen métodos para producir la gp120 de VIH-1 (Lasky *et al.*, 1986; Leonard *et al.*, 1990; Culp *et al.*, 1991; Jeffs *et al.*, 1996).

20 Una sustancia que puede interferir con la unión y/o la entrada en las células del VIH-1 se denomina habitualmente un inhibidor de la unión o la entrada del VIH-1. Esta sustancia se une al (i) VIH-1, o (ii) CD4, o (iii) VIH-1 y CD4, o (iv) un correceptor, por ejemplo, CCR5 o CXCR4. Este inhibidor puede ser útil para el tratamiento de enfermedades tales como, por ejemplo, una enfermedad autoinmune, una alergia, asma o GVHD si ejerce la propiedad (ii) o (iii) y activa una célula Treg. Para determinar si dicho inhibidor puede ser útil para dicha enfermedad, la presente invención describe varios ensayos que permiten determinar si una sustancia que el campo técnico de la investigación del VIH-1 ha identificado que interfiere con la unión y/o la entrada en las células de VIH-1 puede ser útil en los otros campos técnicos mencionados anteriormente, como los de las enfermedades autoinmunes, las alergias, el asma o el trasplante de órganos. Por tanto, la presente invención describe un atajo para identificar una sustancia que puede ser útil para el tratamiento de una enfermedad según la presente invención.

30 La identificación de una sustancia que puede utilizarse como un medicamento en una enfermedad específica habitualmente depende de ensayos de selección de alta capacidad de procesamiento (HTS) que consumen muchos recursos. La determinación de si una sustancia puede activar una célula Treg actualmente depende de un ensayo celular que comprende una célula Treg. Puesto que las células Treg solo pueden proporcionarse en pequeñas cantidades, hoy en día no son factibles grandes campañas de selección o incluso un HTS. Las indicaciones de la presente invención permiten eludir estos obstáculos, puesto que la presente invención permite preseleccionar sustancias que probablemente pueden activar una célula Treg. Según la presente invención, una sustancia preseleccionada apropiada (i) se demuestra que interacciona al menos con un epitopo (SEC ID NO:1) y/o (ii) se conoce, a partir de la investigación del VIH-1, como un inhibidor de la unión o un inhibidor de la entrada de VIH-1 o un mimético sintético del sitio de unión en CD4 de la gp120 de VIH-1.

40 Forma parte de la técnica determinar si una sustancia puede interaccionar con un péptido concreto y, con ello, con un epitopo concreto incluso en un formato de HTS. Con respecto a la presente invención, esto puede realizarse, por ejemplo, en un ensayo de tipo de competición *in vitro* que comprende un péptido que abarca al menos los aminoácidos indicados en SEC ID NO:1, mezclado con una sustancia sin marcar que se va a ensayar y posteriormente con una sustancia marcada que se sabe que se une al péptido (por ejemplo, la gp120 de VIH-1) bajo condiciones que permiten la unión del péptido a la sustancia marcada. Una sustancia que interacciona con el péptido competirá con la sustancia marcada y puede ser identificada con una lectura emitida, que puede realizarse, por ejemplo, midiendo la sustancia marcada unida o libre. Este tipo de ensayo para determinar si una sustancia puede interaccionar con un péptido específico, es decir, un epitopo, no se limita a ensayos *in vitro*, puesto que en la técnica se conocen ensayos celulares para conseguir esta información sobre un sustancia u otros formatos *in vitro* que se emplean mucho.

50 La presente invención describe un método para determinar si una sustancia que puede interferir con la interacción de la gp120 de VIH-1 con CD4 puede ser útil para influir de modo positivo en una enfermedad en la que el aumento de las células T reguladoras (células Treg) activadas puede mejorar el cuadro clínico, que comprende:

- 55 (a) proporcionar una disolución que comprende una célula Treg, en la que una célula Treg es preferiblemente una célula Treg CD4⁺CD25⁺ o una célula Tr1 o una célula Th3. Dicha disolución más preferiblemente comprende además PBMC con merma de CD3 singénicas inactivadas (células mononucleares de sangre periférica que preferiblemente han sido inactivadas mediante irradiación o mediante mitomicina C) o una célula dendrítica (DC) y una célula T CD8⁺ alogeneica o una célula T CD4⁺ alogeneica,
- 60 (b) añadir una sustancia que se va a ensayar bajo condiciones que permiten la interacción de la sustancia con una célula Treg,
- (c) medir si una célula Treg ha sido activada, en el que una célula Treg activada identifica la sustancia como un activador de células Treg.

65 Dicha medición puede realizarse empleando un sistema de lectura adecuado, tal como:

(i) medir si una célula T CD8⁺ ha sido reprimida - que preferiblemente puede determinarse midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD8⁺ o midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD8⁺, o midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD8⁺, en la que una citoquina adecuada es IFN γ o IL2, o TNF α - en la que una célula T CD8⁺ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg, o

(ii) medir si una célula T CD4⁺ ha sido reprimida - que preferiblemente puede determinarse midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD4⁺ o midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD4⁺, o midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD4⁺, en la que una citoquina adecuada es IFN γ o IL2, o TNF α - en la que una célula T CD4⁺ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg, o

(iii) medir la cantidad de AMPc intracelular (es decir, AMPc citosólico), y en la que un aumento en la cantidad de AMPc intracelular es indicativo de una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg.

Una enfermedad según el anterior método en el que el aumento de las células T reguladoras (células Treg) activadas puede mejorar el cuadro clínico es (i) una enfermedad inflamatoria no autoinmune: asma alérgico, dermatitis atópica, alergia alimentaria, enfermedad del injerto contra el receptor; (ii) una enfermedad inflamatoria autoinmune: artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamatoria autoinmune, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, penfigoide; (iii) una enfermedad inflamatoria debido al trasplante de un órgano; (iv) un trasplante de médula ósea.

Como los sistemas de lectura mencionados en los anteriores (i) y (ii) son métodos en los que deben realizarse varias etapas, se ha inventado un nuevo sistema de ensayo específico para determinar, en tan solo una etapa, si una célula Treg ha sido activada, lo cual es mencionado en el anterior (iii). Basándose en el sorprendente descubrimiento de que el estado de activación de una célula Treg se correlaciona en gran medida con la cantidad de AMPc intracelular, la presente invención proporciona un método específico para determinar si una célula Treg ha sido activada, que comprende:

- (a) proporcionar una primera disolución que comprende una célula Treg,
- (b) añadir una sustancia que se va a ensayar bajo condiciones que permiten la interacción de la sustancia con una célula Treg,
- (c) medir si una célula Treg de la primera disolución se ha activado,
- (d) proporcionar una segunda disolución que comprende una célula Treg,
- (e) añadir la sustancia que se va a ensayar y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:1 bajo las condiciones de (b),
- (f) medir si una célula Treg de la segunda disolución se ha activado,
- (g) comparar los resultados obtenidos en (c) con los obtenidos en (f), en el que una menor activación de (f) indica que la sustancia es un activador de células Treg que activa una célula Treg por medio de la interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1.

En un método más preferido, la disolución de (a) no solo contiene una célula Treg, sino también una PBMC con merma de CD3 singénica inactivada (una célula mononuclear de sangre periférica) o una célula dendrítica (DC) y una célula T CD8⁺ alogénea o una célula T CD4⁺ alogénea. Estas células, cuando se combinan en una disolución con una célula Treg activada, aumentan aún más la cantidad de AMPc intracelular y, con ello, conducen a un sistema de lectura más sensible.

La presente invención se basa en un método para determinar si una sustancia puede activar una célula Treg a través de la interacción del sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4, que comprende:

- (a) preseleccionar una sustancia que puede interaccionar con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4 (para un método de preselección, véase a continuación),
- (b) proporcionar una disolución que comprende una célula Treg, en la que una célula Treg es preferiblemente una célula Treg CD4⁺CD25⁺ o una célula Tr1 o una célula Th3. Dicha disolución preferiblemente comprende además una PBMC con merma de CD3 singénica inactivada (una célula mononuclear de sangre periférica que preferiblemente ha sido inactivada mediante irradiación o mediante mitomicina C) o una célula dendrítica (DC) y una célula T CD8⁺ alogénea o una célula T CD4⁺ alogénea,
- (c) añadir una sustancia preseleccionada según (a) bajo condiciones que permiten la interacción de la sustancia con una célula Treg,
- (d) medir si una célula Treg ha sido activada, en la que una célula Treg activada identifica la sustancia como un activador de células Treg. Dicha medición puede realizarse empleando un sistema de lectura adecuado, tal como:

- (i) medir si una célula T CD8⁺ ha sido reprimida - que preferiblemente puede determinarse midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD8⁺ o midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD8⁺, o midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD8⁺ en la que una citoquina

adecuada es IFN γ o IL2, o TNF α - en la que una célula T CD8 $^{+}$ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg, o

(ii) medir si una célula T CD4 $^{+}$ ha sido reprimida - que preferiblemente puede determinarse midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD4 $^{+}$ midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD4 $^{+}$, o midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD4 $^{+}$ en la que una citoquina adecuada es IFN γ o IL2, o TNF α - en la que una célula T CD4 $^{+}$ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg, o

(iii) medir la cantidad de AMPc intracelular y en la que un aumento en la cantidad de AMPc intracelular es indicativo de una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg.

La presente invención también se describe un método que permite identificar una sustancia que puede interactuar con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4 y, con ello, puede emplearse para preseleccionar una sustancia que puede interactuar con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4. El método comprende:

- (a) proporcionar una primera disolución que comprende CD4,
- (b) proporcionar una segunda disolución que comprende CD4,
- (c) añadir a la primera disolución una sustancia que se va a ensayar y gp120 de VIH-1 bajo condiciones que permiten la unión de la gp120 de VIH-1 con CD4,
- (d) añadir a la segunda disolución la gp120 de VIH-1 bajo las condiciones de (c) que permiten la unión de la gp120 de VIH-1 con CD4,
- (e) medir en la primera y en la segunda disolución si la gp120 de VIH-1 se ha unido a CD4, en el que una cantidad reducida de gp120 de VIH-1 unida en la primera disolución indica que la sustancia puede interactuar con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4.

Este método de preselección puede realizarse también si en lugar de CD4 se emplea un péptido que comprende el tramo de aminoácidos indicado en SEC ID NO:1, o en lugar de CD4 se emplea un péptido indicado en SEC ID NO:1. En un método más preferido según la presente invención, en lugar de la gp120 de VIH-1 se emplea un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, y SEC ID NO:10, o se emplea un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, y SEC ID NO:10.

La presente invención también describe un método para determinar si una sustancia puede activar una célula T reguladora (Treg) a través de la interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1, que comprende:

(a) proporcionar una primera disolución que comprende una célula Treg, en la que una célula Treg es preferiblemente una célula Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ o una célula Tr1 o una célula Th3. Dicha disolución más preferiblemente comprende además una PBMC con merma de CD3 singénica inactivada (una célula mononuclear de sangre periférica que preferiblemente ha sido inactivada mediante irradiación o mediante mitomicina C) o una célula dendrítica (DC) y una célula T CD8 $^{+}$ alogénea o una célula T CD4 $^{+}$ alogénea,

(b) añadir una sustancia que se va a ensayar bajo condiciones que permiten la interacción de la sustancia con una célula Treg,

(c) medir si una célula Treg de la primera disolución ha sido activada,

(d) proporcionar una segunda disolución que comprende una célula Treg, en la que una célula Treg es preferiblemente una célula Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ o una célula Tr1 o una célula Th3. Dicha disolución más preferiblemente comprende además una PBMC con merma de CD3 singénica inactivada (una célula mononuclear de sangre periférica que preferiblemente ha sido inactivada mediante irradiación o mediante mitomicina C) o una célula dendrítica (DC) y una célula T CD8 $^{+}$ alogénea o una célula T CD4 $^{+}$ alogénea,

(e) añadir la sustancia que se va a ensayar y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:1 bajo las condiciones de (b),

(f) medir si una célula Treg de la segunda disolución ha sido activada,

Dicha medición puede realizarse empleando un sistema de lectura adecuado, tal como:

(i) medir si una célula T CD8 $^{+}$ ha sido reprimida - que preferiblemente puede determinarse midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD8 $^{+}$ o midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD8 $^{+}$, o midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD8 $^{+}$, en la que una citoquina adecuada es IFN γ o IL2, o TNF α - en la que una célula T CD8 $^{+}$ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg, o

(ii) medir si una célula T CD4 $^{+}$ ha sido reprimida - que preferiblemente puede determinarse midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD4 $^{+}$ o midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD4 $^{+}$, o midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD4 $^{+}$, en la que una citoquina adecuada es IFN γ o IL2, o TNF α - en la que una célula T CD4 $^{+}$ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, se

identifica la sustancia como un activador de células Treg, o
 (iii) medir la cantidad de AMPc intracelular, y en la que un aumento en la cantidad de AMPc intracelular es
 indicativo de una célula Treg activada y, con ello, se identifica la sustancia como un activador de células Treg,
 (g) comparar los resultados obtenidos en (c) con los obtenidos en (f), en el que una activación reducida de (f)
 5 identifica la sustancia como un activador de células Treg que activa una célula Treg a través de la interacción
 con el epitopo indicado en SEC ID NO:1.

En un método más preferido en la etapa (e) del método mencionado anteriormente, el péptido empleado se
 selecciona de un grupo que consiste en un péptido aislado que abarca los aminoácidos n.ºs 1-31 de SEC ID NO:1,
 10 n.ºs 26 a 458 de SEC ID NO:2, n.ºs 26 a 419 de SEC ID NO:2, n.ºs 26 a 207 de SEC ID NO:2, n.ºs 26 a 131 de SEC
 ID NO:2, y n.ºs 46 a 89 de SEC ID NO:2., o el péptido empleado es un péptido aislado que abarca los aminoácidos
 n.ºs 1 a 31 de SEC ID NO:1 y que tiene aminoácidos adicionales cadena arriba y/o cadena abajo, con el prerrequisito
 de que los aminoácidos adicionales no impidan la unión de una sustancia al tramo de aminoácidos indicado en SEC
 15 ID NO:1. Dicho aminoácido o tramo de aminoácido cadena arriba adicional se selecciona preferiblemente de un
 grupo que consiste en el aminoácido o el tramo de aminoácidos indicado en SEC ID NO:2 en la posición 53, en la
 posición 52-53, en la posición 51-53, en la posición 50-53, en la posición 49-53, en la posición 48-53, en la posición
 47-53, en la posición 46-53, en la posición 45-53, en la posición 44-53, en la posición 43-53, en la posición 42-53, en
 la posición 41-53, en la posición 40-53, en la posición 39-53, en la posición 38-53, en la posición 37-53, en la
 20 posición 36-53, en la posición 35-53, en la posición 34-53, en la posición 33-53, en la posición 32-53, en la posición
 31-53, en la posición 30-53, en la posición 29-53, en la posición 28-53, en la posición 27-53, en la posición 26-53, en
 la posición 25-53, en la posición 24-53, en la posición 23-53, en la posición 22-53, en la posición 21-53, en la posición
 20-53, en la posición 19-53, en la posición 18-53, en la posición 17-53, en la posición 16-53, en la posición
 15-53, en la posición 14-53, en la posición 13-53, en la posición 12-53, en la posición 11-53, en la posición 10-53, en
 la posición 9-53, en la posición 8-53, en la posición 7-53, en la posición 6-53, en la posición 5-53, en la posición 4-
 25 53, en la posición 3-53, en la posición 2-53, y en la posición 1-53. Un péptido más preferido comprende además uno
 o más aminoácidos cadena abajo, tal como se indica en SEC ID NO:2 en la posición 85, o en la posición 85 a n,
 siendo n un número entero entre 86-458, es decir, la posición 85 a 86, 85 a 87, 85 a 88, 85 a 89, 85 a 90, 85 a 91,
 85 a 92, 85 a 93, 85 a 94, 85 a 95, 85 a 96, 85 a 97, 85 a 98, 85 a 99, 85 a 100, 85 a 101, 85 a 102, 85 a 103, 85 a
 104, 85 a 105, 85 a 106, 85 a 107, 85 a 108, 85 a 109, 85 a 110, 85 a 111, 85 a 112, 85 a 113, 85 a 114, 85
 30 10 115, 85 a 116, 85 a 117, 85 a 118, 85 a 119, 85 a 120, 85 a 121, 85 a 122, 85 a 123, 85 a 124, 85 a 125, 85 a
 126, 85 a 127, 85 a 128, 85 a 129, 85 a 130, 85 a 131, 85 a 132, 85 a 133, 85 a 134, 85 a 135, 85 a 136, 85 a 137,
 85 a 138, 85 a 139, 85 a 140, 85 a 141, 85 a 142, 85 a 143, 85 a 144, 85 a 145, 85 a 146, 85 a 147, 85 a 148, 85 a
 149, 85 a 150, 85 a 151, 85 a 152, 85 a 153, 85 a 154, 85 a 155, 85 a 156, 85 a 157, 85 a 158, 85 a 159, 85 a 160,
 85 a 161, 85 a 162, 85 a 163, 85 a 164, 85 a 165, 85 a 166, 85 a 167, 85 a 168, 85 a 169, 85 a 170, 85 a 171, 85 a
 35 172, 85 a 173, 85 a 174, 85 a 175, 85 a 176, 85 a 177, 85 a 178, 85 a 179, 85 a 180, 85 a 181, 85 a 182, 85 a 183,
 85 a 184, 85 a 185, 85 a 186, 85 a 187, 85 a 188, 85 a 189, 85 a 190, 85 a 191, 85 a 192, 85 a 193, 85 a 194, 85 a
 195, 85 a 196, 85 a 197, 85 a 198, 85 a 199, 85 a 200, 85 a 201, 85 a 202, 85 a 203, 85 a 204, 85 a 205, 85 a 206,
 85 a 207, 85 a 208, 85 a 209, 85 a 210, 85 a 211, 85 a 212, 85 a 213, 85 a 214, 85 a 215, 85 a 216, 85 a 217, 85 a
 218, 85 a 219, 85 a 220, 85 a 221, 85 a 222, 85 a 223, 85 a 224, 85 a 225, 85 a 226, 85 a 227, 85 a 228, 85 a 229,
 40 85 a 230, 85 a 231, 85 a 232, 85 a 233, 85 a 234, 85 a 235, 85 a 236, 85 a 237, 85 a 238, 85 a 239, 85 a 240, 85 a
 241, 85 a 242, 85 a 243, 85 a 244, 85 a 245, 85 a 246, 85 a 247, 85 a 248, 85 a 249, 85 a 250, 85 a 251, 85 a 252,
 85 a 253, 85 a 254, 85 a 255, 85 a 256, 85 a 257, 85 a 258, 85 a 259, 85 a 260, 85 a 261, 85 a 262, 85 a 263, 85 a
 264, 85 a 265, 85 a 266, 85 a 267, 85 a 268, 85 a 269, 85 a 270, 85 a 271, 85 a 272, 85 a 273, 85 a 274, 85 a 275,
 85 a 276, 85 a 277, 85 a 278, 85 a 279, 85 a 280, 85 a 281, 85 a 282, 85 a 283, 85 a 284, 85 a 285, 85 a 286, 85 a
 45 287, 85 a 288, 85 a 289, 85 a 290, 85 a 291, 85 a 292, 85 a 293, 85 a 294, 85 a 295, 85 a 296, 85 a 297, 85 a 298,
 85 a 299, 85 a 300, 85 a 301, 85 a 302, 85 a 303, 85 a 304, 85 a 305, 85 a 306, 85 a 307, 85 a 308, 85 a 309, 85 a
 310, 85 a 311, 85 a 312, 85 a 313, 85 a 314, 85 a 315, 85 a 316, 85 a 317, 85 a 318, 85 a 319, 85 a 320, 85 a 321,
 85 a 322, 85 a 323, 85 a 324, 85 a 325, 85 a 326, 85 a 327, 85 a 328, 85 a 329, 85 a 330, 85 a 331, 85 a 332, 85 a
 333, 85 a 334, 85 a 335, 85 a 336, 85 a 337, 85 a 338, 85 a 339, 85 a 340, 85 a 341, 85 a 342, 85 a 343, 85 a 344,
 50 85 a 345, 85 a 346, 85 a 347, 85 a 348, 85 a 349, 85 a 350, 85 a 351, 85 a 352, 85 a 353, 85 a 354, 85 a 355, 85 a
 356, 85 a 357, 85 a 358, 85 a 359, 85 a 360, 85 a 361, 85 a 362, 85 a 363, 85 a 364, 85 a 365, 85 a 366, 85 a 367,
 85 a 368, 85 a 369, 85 a 370, 85 a 371, 85 a 372, 85 a 373, 85 a 374, 85 a 375, 85 a 376, 85 a 377, 85 a 378, 85 a
 379, 85 a 380, 85 a 381, 85 a 382, 85 a 383, 85 a 384, 85 a 385, 85 a 386, 85 a 387, 85 a 388, 85 a 389, 85 a 390,
 85 a 391, 85 a 392, 85 a 393, 85 a 394, 85 a 395, 85 a 396, 85 a 397, 85 a 398, 85 a 399, 85 a 400, 85 a 401, 85 a
 55 402, 85 a 403, 85 a 404, 85 a 405, 85 a 406, 85 a 407, 85 a 408, 85 a 409, 85 a 410, 85 a 411, 85 a 412, 85 a 413,
 85 a 414, 85 a 415, 85 a 416, 85 a 417, 85 a 418, 85 a 419, 85 a 420, 85 a 421, 85 a 422, 85 a 423, 85 a 424, 85 a
 425, 85 a 426, 85 a 427, 85 a 428, 85 a 429, 85 a 430, 85 a 431, 85 a 432, 85 a 433, 85 a 434, 85 a 435, 85 a 436,
 85 a 437, 85 a 438, 85 a 439, 85 a 440, 85 a 441, 85 a 442, 85 a 443, 85 a 444, 85 a 445, 85 a 446, 85 a 447, 85 a
 448, 85 a 449, 85 a 450, 85 a 451, 85 a 452, 85 a 453, 85 a 454, 85 a 455, 85 a 456, 85 a 457, o 85 a 458.

En el contexto de la presente invención, se han estudiado sustancias nuevas y conocidas en los ensayos según la
 presente invención. Como resultado se han podido identificar sustancias que pueden actuar como activador de
 células Treg de la presente invención, es decir, estas sustancias son capaces de activar una célula Treg a través de
 la interacción con un epitopo de células Treg, según se indica en SEC ID NO:1, que pueda ser demostrada *in vivo*.

Por tanto, la presente invención proporciona activadores de células Treg.

Se describen activadores de células Treg según la invención que son estructuralmente un péptido o un polipéptido, preferiblemente un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión o un péptido de andamiaje.

La presente invención se refiere además a un nuevo anticuerpo, o a uno de sus fragmentos de unión, que es capaz de unirse al péptido indicado en SEC ID NO:1, con la condición de que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no es OKT4A, OKT4D4, OKTcdr4a y no es Leu3. Estos anticuerpos rechazados se relacionan con un campo técnico totalmente diferente, concretamente la investigación del VIH-1, que no está relacionado con la activación de las células Treg y las enfermedades según la presente invención. Aun así, la presente invención combina, por primera vez, el campo técnico de (a) las enfermedades relacionadas con el VIH-1, con (b) las enfermedades según la presente invención, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, alergia, asma, rechazo de injertos y enfermedades debidas a carecer de inmunotolerancia provocada por el trasplante de órganos o por la administración terapéutica de una entidad biológica propia o extraña a un ser humano que lo necesite.

Otro péptido activador de células Treg preferido es un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, y SEC ID NO:10, o es un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, y SEC ID NO:10.

Un polipéptido activador de células Treg más preferido se selecciona de un grupo que consiste en : la gp120 de VIH-1, NSC 13778, cuya estructura química se describe en Yang *et al.*, 2005, en la página 6124 en la figura 1, el péptido 2 que presenta tres fragmentos de gp120 de VIH-1 unidos entre sí a través de andamiajes conformacionalmente flexibles, cuya estructura química se describe en Franke *et al.*, 2007, en la página 4 al final de la columna derecha, el anticuerpo monoclonal OKT4A que se une a la región de unión a la gp120 de VIH-1 de CD4, según se describe en Mizukami *et al.*, 1988, en la página 9273, columna derecha, línea 19, el anticuerpo monoclonal OKT4D que se une a la región de unión a la gp120 de VIH-1 de CD4, según se describe en Mizukami *et al.*, 1988, en la página 9273, columna derecha, línea 19, el anticuerpo monoclonal OKTcdr4a que se deriva del OKT4a murino, según se describe en Moreland *et al.*, 1998, en la página 222, columna derecha, línea 1, el anticuerpo monoclonal Leu3 que se une a un epitopo que se solapa con la región de unión a la gp120 de VIH-1 de CD4, según se describe en Lohmann *et al.*, 1992, en la página 3248, columna izquierda, línea 7, y el anticuerpo monoclonal MAX.12H5 que se une a la región similar a CDR2 de CD4, según se describe en Repke *et al.*, 1992, en la página 1809, línea de resumen 11, y en la página 1812, columna izquierda, línea 37.

Cada uno de los activadores de células Treg mencionados anteriormente según la presente invención puede utilizarse como medicamento y para la preparación de medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en (i) una enfermedad inflamatoria no autoinmune: asma alérgico, dermatitis atópica, alergia alimentaria, enfermedad del injerto contra el receptor; (ii) una enfermedad inflamatoria autoinmune: artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamatoria autoinmune, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, penfigoide; (iii) una enfermedad inflamatoria debido al trasplante de un órgano; (iv) un trasplante de médula ósea.

Otra realización de la presente invención describe una composición farmacéutica que comprende al menos un activador de células Treg, preferiblemente la gp120 de VIH-1, como ingrediente activo, y que puede formularse de una manera convencional. Los métodos para preparar dichas formulaciones pueden encontrarse en manuales, por ejemplo, "Remington Pharmaceutical Science". Los ejemplos de ingredientes que son útiles para formular al menos una sustancia según la presente invención también se encuentran en el documento WO99/18193. La composición puede fabricarse de una manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, levitación, preparación de polvos, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

En otro aspecto, la invención indica el uso de un activador de células Treg para tratar una enfermedad que se caracteriza porque su cuadro clínico puede ser influido de modo positivo por un aumento en las células Treg activadas, y dicho método comprende administrar a un ser, preferiblemente un ser humano, que necesite dicho tratamiento una cantidad adecuada de una composición farmacéutica que comprende al menos un activador de células Treg según la presente invención, preferiblemente gp120 de VIH-1 o péptidos o fragmentos derivados de la gp120 de VIH-1. Por tanto, la presente invención proporciona activadores de células Treg para su uso en un método para tratar (i) una enfermedad inflamatoria no autoinmune: asma alérgico, dermatitis atópica, alergia alimentaria, enfermedad del injerto contra el receptor; (ii) una enfermedad inflamatoria autoinmune: artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamatoria autoinmune, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, penfigoide; (iii) una enfermedad inflamatoria debido al trasplante de un órgano; (iv) un trasplante de médula ósea.

La presente invención proporciona además el uso de un activador de células Treg según la presente invención para reducir y/o prevenir una reacción inmunológica no deseada debida a la autoadministración exógena o la administración exógena de un péptido recombinante no autólogo, y proporciona un método para reducir o prevenir

una reacción inmunológica no deseada, que comprende: (a) añadir una cantidad suficiente de al menos un activador de células Treg según la presente invención a un animal no humano, preferiblemente un primate no humano.

5 La invención describe también un sistema de ensayo para determinar si una sustancia es un activador de células Treg según la presente invención, que comprende al menos:

- a) una célula Treg, y
- b) un péptido que abarca al menos el epitopo indicado en SEC ID NO:1.

10 En este sistema de ensayo, un péptido de b) se selecciona de un grupo que consiste en un péptido aislado que abarca los aminoácidos n.ºs 26 a 458 de SEC ID NO:2, los aminoácidos n.ºs 26 a 419 of SEC ID NO:2, los aminoácidos n.ºs 26 a 207 de SEC ID NO:2, los aminoácidos n.ºs 26 a 131 de SEC ID NO:2, y los aminoácidos n.ºs 46 a 89 de SEC ID NO:2, o el péptido empleado es un péptido aislado que abarca los aminoácidos n.ºs 1-31 de SEC ID NO:1, y que tiene aminoácidos adicionales cadena arriba y/o cadena abajo, con el prerequisite de que los aminoácidos adicionales no impidan la unión de una sustancia al tramo de aminoácidos indicado en SEC ID NO:1.

15 Dicho aminoácido o tramo de aminoácido cadena arriba adicional se selecciona preferiblemente de un grupo que consiste en el aminoácido o el tramo de aminoácidos indicado en SEC ID NO:2 en la posición 53, en la posición 52-53, en la posición 51-53, en la posición 50-53, en la posición 49-53, en la posición 48-53, en la posición 47-53, en la posición 46-53, en la posición 45-53, en la posición 44-53, en la posición 43-53, en la posición 42-53, en la posición 41-53, en la posición 40-53, en la posición 39-53, en la posición 38-53, en la posición 37-53, en la posición 36-53, en la posición 35-53, en la posición 34-53, en la posición 33-53, en la posición 32-53, en la posición 31-53, en la posición 30-53, en la posición 29-53, en la posición 28-53, en la posición 27-53, en la posición 26-53, en la posición 25-53, en la posición 24-53, en la posición 23-53, en la posición 22-53, en la posición 21-53, en la posición 20-53, en la posición 19-53, en la posición 18-53, en la posición 17-53, en la posición 16-53, en la posición 15-53, en la posición 14-53, en la posición 13-53, en la posición 12-53, en la posición 11-53, en la posición 10-53, en la posición 9-53, en la posición 8-53, en la posición 7-53, en la posición 6-53, en la posición 5-53, en la posición 4-53, en la posición 3-53, en la posición 2-53, y en la posición 1-53. Un péptido más preferido comprende además uno o más aminoácidos cadena abajo según SEC ID NO:2 en la posición 85, o en la posición 85 a n, siendo n un número entero entre 86-458, es decir, la posición 85 a 86, 85 a 87, 85 a 88, 85 a 89, 85 a 90, 85 a 91, 85 a 92, 85 a 93, 85 a 94, 85 a 95, 85 a 96, 85 a 97, 85 a 98, 85 a 99, 85 a 100, 85 a 101, 85 a 102, 85 a 103, 85 a 104, 85 a 105, 85 a 106, 85 a 107, 85 a 108, 85 a 109, 85 a 110, 85 a 111, 85 a 112, 85 a 113, 85 a 114, 85 a 115, 85 a 116, 85 a 117, 85 a 118, 85 a 119, 85 a 120, 85 a 121, 85 a 122, 85 a 123, 85 a 124, 85 a 125, 85 a 126, 85 a 127, 85 a 128, 85 a 129, 85 a 130, 85 a 131, 85 a 132, 85 a 133, 85 a 134, 85 a 135, 85 a 136, 85 a 137, 85 a 138, 85 a 139, 85 a 140, 85 a 141, 85 a 142, 85 a 143, 85 a 144, 85 a 145, 85 a 146, 85 a 147, 85 a 148, 85 a 149, 85 a 150, 85 a 151, 85 a 152, 85 a 153, 85 a 154, 85 a 155, 85 a 156, 85 a 157, 85 a 158, 85 a 159, 85 a 160, 85 a 161, 85 a 162, 85 a 163, 85 a 164, 85 a 165, 85 a 166, 85 a 167, 85 a 168, 85 a 169, 85 a 170, 85 a 171, 85 a 172, 85 a 173, 85 a 174, 85 a 175, 85 a 176, 85 a 177, 85 a 178, 85 a 179, 85 a 180, 85 a 181, 85 a 182, 85 a 183, 85 a 184, 85 a 185, 85 a 186, 85 a 187, 85 a 188, 85 a 189, 85 a 190, 85 a 191, 85 a 192, 85 a 193, 85 a 194, 85 a 195, 85 a 196, 85 a 197, 85 a 198, 85 a 199, 85 a 200, 85 a 201, 85 a 202, 85 a 203, 85 a 204, 85 a 205, 85 a 206, 85 a 207, 85 a 208, 85 a 209, 85 a 210, 85 a 211, 85 a 212, 85 a 213, 85 a 214, 85 a 215, 85 a 216, 85 a 217, 85 a 218, 85 a 219, 85 a 220, 85 a 221, 85 a 222, 85 a 223, 85 a 224, 85 a 225, 85 a 226, 85 a 227, 85 a 228, 85 a 229, 85 a 230, 85 a 231, 85 a 232, 85 a 233, 85 a 234, 85 a 235, 85 a 236, 85 a 237, 85 a 238, 85 a 239, 85 a 240, 85 a 241, 85 a 242, 85 a 243, 85 a 244, 85 a 245, 85 a 246, 85 a 247, 85 a 248, 85 a 249, 85 a 250, 85 a 251, 85 a 252, 85 a 253, 85 a 254, 85 a 255, 85 a 256, 85 a 257, 85 a 258, 85 a 259, 85 a 260, 85 a 261, 85 a 262, 85 a 263, 85 a 264, 85 a 265, 85 a 266, 85 a 267, 85 a 268, 85 a 269, 85 a 270, 85 a 271, 85 a 272, 85 a 273, 85 a 274, 85 a 275, 85 a 276, 85 a 277, 85 a 278, 85 a 279, 85 a 280, 85 a 281, 85 a 282, 85 a 283, 85 a 284, 85 a 285, 85 a 286, 85 a 287, 85 a 288, 85 a 289, 85 a 290, 85 a 291, 85 a 292, 85 a 293, 85 a 294, 85 a 295, 85 a 296, 85 a 297, 85 a 298, 85 a 299, 85 a 300, 85 a 301, 85 a 302, 85 a 303, 85 a 304, 85 a 305, 85 a 306, 85 a 307, 85 a 308, 85 a 309, 85 a 310, 85 a 311, 85 a 312, 85 a 313, 85 a 314, 85 a 315, 85 a 316, 85 a 317, 85 a 318, 85 a 319, 85 a 320, 85 a 321, 85 a 322, 85 a 323, 85 a 324, 85 a 325, 85 a 326, 85 a 327, 85 a 328, 85 a 329, 85 a 330, 85 a 331, 85 a 332, 85 a 333, 85 a 334, 85 a 335, 85 a 336, 85 a 337, 85 a 338, 85 a 339, 85 a 340, 85 a 341, 85 a 342, 85 a 343, 85 a 344, 85 a 345, 85 a 346, 85 a 347, 85 a 348, 85 a 349, 85 a 350, 85 a 351, 85 a 352, 85 a 353, 85 a 354, 85 a 355, 85 a 356, 85 a 357, 85 a 358, 85 a 359, 85 a 360, 85 a 361, 85 a 362, 85 a 363, 85 a 364, 85 a 365, 85 a 366, 85 a 367, 85 a 368, 85 a 369, 85 a 370, 85 a 371, 85 a 372, 85 a 373, 85 a 374, 85 a 375, 85 a 376, 85 a 377, 85 a 378, 85 a 379, 85 a 380, 85 a 381, 85 a 382, 85 a 383, 85 a 384, 85 a 385, 85 a 386, 85 a 387, 85 a 388, 85 a 389, 85 a 390, 85 a 391, 85 a 392, 85 a 393, 85 a 394, 85 a 395, 85 a 396, 85 a 397, 85 a 398, 85 a 399, 85 a 400, 85 a 401, 85 a 402, 85 a 403, 85 a 404, 85 a 405, 85 a 406, 85 a 407, 85 a 408, 85 a 409, 85 a 410, 85 a 411, 85 a 412, 85 a 413, 85 a 414, 85 a 415, 85 a 416, 85 a 417, 85 a 418, 85 a 419, 85 a 420, 85 a 421, 85 a 422, 85 a 423, 85 a 424, 85 a 425, 85 a 426, 85 a 427, 85 a 428, 85 a 429, 85 a 430, 85 a 431, 85 a 432, 85 a 433, 85 a 434, 85 a 435, 85 a 436, 85 a 437, 85 a 438, 85 a 439, 85 a 440, 85 a 441, 85 a 442, 85 a 443, 85 a 444, 85 a 445, 85 a 446, 85 a 447, 85 a 448, 85 a 449, 85 a 450, 85 a 451, 85 a 452, 85 a 453, 85 a 454, 85 a 455, 85 a 456, 85 a 457, or 85 a 458.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención e incluyen realizaciones reivindicadas y no reivindicadas de la presente invención. Sin embargo, los ejemplos describen las realizaciones más preferidas de la invención.

EJEMPLOS:

(1) Ensayo de competición de CD4/gp120 de VIH-1 para determinar si una sustancia puede unirse al menos a un péptido que abarca el epitopo indicado en SEC ID NO:1

Placas de ensayo de 96 pocillos (Nunc, Alemania) se revisten durante la noche a 4 °C con CD4 (sCD4, Immunodiagnosics, EEUU) a 100 ng por pocillo en PBS, pH 7,4. Las placas revestidas se saturan con PBS/tampón BSA al 3% y se lavan tres veces. Para determinar la unión de una sustancia de ensayo se añade una muestra durante 1 hora en diferentes concentraciones. No se añade sustancia de ensayo a los pocillos control. Después de lavar tres veces se añade un conjugado de gp120 de VIH-1-peroxidasa (Immunodiagnosics, EEUU) a la placa durante 1 h. El conjugado de gp120 de VIH-1-peroxidasa no unido se retira lavando tres veces. Después de lavar se añade el sustrato cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Pierce, EEUU) para la peroxidasa y se lee la densidad óptica a 450 nm. Una sustancia que interacciona con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4 bloqueará la unión de la gp120 de VIH-1 marcada y puede identificarse por la reducción en la señal, comparado con controles.

(2) Ensayo para determinar, por ejemplo, si gp120 de VIH-1 o una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 a una Treg CD4⁺CD25⁺ puede activar una Treg CD4⁺CD25⁺ y, con ello, ser útil para el tratamiento de una enfermedad autoinmune (por ejemplo, enfermedad del intestino inflamatoria, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes de tipo I, lupus eritematoso, pénfigo vulgar, tiroiditis), otras enfermedades con aspectos autoinmunes en su patogénesis, tales como vitiligo, dermatitis atópica, una alergia (por ejemplo, rinitis alérgica), asma (por ejemplo, asma alérgico), GVHD (enfermedad del injerto contra el receptor), rechazo de injertos

(2.1) Método para el aislamiento de células

(2.1.1) Aislamiento de PBMC

El procedimiento de aislamiento comienza con el aislamiento de las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante una centrifugación en gradiente de densidad convencional a partir de preparaciones de la capa leucocítica de voluntarios sanos. Como alternativa, pueden emplearse PBMC aisladas a partir de sangre periférica completa o productos de la leucaféresis.

La sangre procedente de la capa leucocítica se diluye 1:1 con PBS (disolución salina tamponada con fosfato) que contiene liquemina al 0,2% (sodio-heparina) y EDTA 2 mM a temperatura ambiente. La sangre diluida se pipetea a fondo sobre capas de Ficoll preparadas (30 ml de sangre diluida por 15 ml de capa de Ficoll por tubo de 50 ml) y se centrifuga durante 15 min (minuto) a 200 x g (con el freno accionado) a temperatura ambiente. Se retiran cuidadosamente 8-10 ml del fluido superior y los tubos se centrifugan a 450 x g durante 15 min a temperatura ambiente (con el freno quitado). Las PBMC se recogen de la interfase de cada gradiente, se lavan tres veces con 50 ml de PBS/EDTA 1 mM por separado, después se reúnen y se lavan dos veces más. Por último, las PBMC se vuelven a diluir en X-VIVO-15 (Cambrex, Verviers, Bélgica) en medio de cultivo celular y se cuentan.

(2.1.2) Aislamiento de células T auxiliares CD4⁺

Para determinar la actividad represora de las células Treg se necesitan poblaciones celulares muy purificadas. Por tanto, se emplean esferas magnéticas revestidas con anticuerpos (Miltenyi, Alemania, o Dynal, Noruega). Las esferas magnéticas en este contexto son partículas paramagnéticas que están acopladas a anticuerpos monoclonales específicos. Se emplean para marcar magnéticamente a la población de células diana. Las esferas magnéticas revestidas con anticuerpos se unen a las células diana. Esta fracción de células marcada queda retenida por la fuerza magnética y puede recuperarse posteriormente muy purificada (selección positiva). Antes del aislamiento positivo de las células T auxiliares CD4⁺CD25⁺, las PBMC se lavan dos veces con 50 ml de tampón de lavado según las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Alemania). Para el aislamiento de las células T CD4⁺, se emplean microesferas de CD4 (Miltenyi, Alemania, 2-4 µl de microesferas/10⁷ PBMC) según las instrucciones del fabricante. La fracción de CD4⁺ se aísla empleando un separador MACS (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. El separador MACS retiene las células marcadas con esferas magnéticas por medio de la fuerza magnética. Las células Treg CD4⁺CD25⁺ contaminantes se eliminan en una segunda etapa empleando CD25 Dynabeads, (Dynal, Noruega) según las instrucciones del fabricante (para los detalles, véase 2.1.4) empleando 0,5 esferas/célula. Este procedimiento de eliminación produce células T auxiliares CD4⁺CD25⁻ muy purificadas (selección negativa).

Para eludir los anticuerpos de CD4 que se unen a las células CD4⁺ (para evitar la preactivación dependiente de CD4) en el procedimiento de aislamiento las células T CD4⁺, se generan células T auxiliares CD4⁺ intactas empleando el kit de aislamiento negativo (Miltenyi, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Antes del aislamiento negativo de las células T auxiliares CD4⁺, las PBMC se lavan dos veces con 50 ml de tampón de lavado según las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Alemania). Para el aislamiento de las células T auxiliares CD4⁺, las PBMC se incuban con un cóctel de anticuerpos CD45RO, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD36, CD123, anti-TCRγ/δ, y CD235a biotinilados. Estas células después se marcan de modo magnético con microesferas antibiotina para la eliminación.

La fracción de CD4⁺ se aísla empleando un separador MACS (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. El separador MACS retiene las células marcadas con esferas magnéticas por medio de la fuerza magnética. Las células Treg CD4⁺CD25⁺ contaminantes se eliminan en una segunda etapa empleando CD25 Dynabeads, (Dynal, Noruega) según las instrucciones del fabricante (para los detalles, véase 2.1.4) empleando 0,5 esferas/célula.

(2.1.3) Aislamiento de células T efectoras CD8⁺

Antes del aislamiento positivo de las células T efectoras CD8⁺, las PBMC se lavan dos veces con 50 ml de tampón de lavado según las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Alemania). Para el aislamiento de las células T CD8⁺CD25⁻ se emplean microesferas CD8 (Miltenyi, Alemania, 2-4 µl de microesfera/10⁷ PBMC) según las instrucciones del fabricante. La fracción de CD8⁺ se aísla empleando un separador MACS (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. Las células T CD8⁺CD25⁺ contaminantes se eliminan en una segunda etapa empleando CD25 Dynabeads, (Dyna, Noruega) según las instrucciones del fabricante (para los detalles, véase 2.1.4) empleando 0,5 esferas/célula. Este procedimiento de eliminación produce células T efectoras CD8⁺CD25⁻ T muy purificadas (selección negativa).

(2.1.4) Aislamiento de células Treg CD4⁺CD25⁺

Para el aislamiento de las células Treg CD4⁺CD25⁺ se combina la selección positiva y negativa. Las PBMC se lavan con tampón de lavado según las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Alemania) y después se incuban con microesferas CD25 (2 µl de microesferas/10⁷ PBMC) durante 20 min a 4 °C en tampón de aislamiento (1 x 10⁸/ml) según las instrucciones del fabricante. Después las células se lavan dos veces en PBS. La fracción de CD25⁺ se aísla empleando un separador MACS (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. La fracción de CD25⁺ seleccionada positivamente contiene 65-80% de células T CD4⁺ y 20-35% de células B CD19⁺ contaminantes, células T CD8⁺, y unos pocos monocitos CD14⁺. Las células contaminantes se eliminan con Dynabeads (Dyna, Noruega). Se emplean las siguientes cantidades de esferas: CD19 Dynabeads: 2 esferas/célula, CD8 Dynabeads: 3 esferas/célula, CD14 Dynabeads: 1 esfera/célula. Las Dynabeads recogidas se lavan dos veces en tubos de 15 ml con tampón de eliminación empleando un concentrador de partículas magnéticas (Dyna) según las instrucciones del fabricante. La fracción de PBMC CD25⁺ (5 x 10⁷/ml) se añade en el tampón de eliminación y se incuba durante 20 min a 4 °C en un agitador (mezclador de muestras, Dyna). Las células contaminantes se eliminan según las instrucciones del fabricante mediante el uso del concentrador de partículas magnéticas. Para una mayor pureza de las células Treg CD4⁺CD25⁺, la eliminación con Dynabeads se repite una vez (>98% después de dos rondas de eliminación).

(2.1.5) Generación de células dendríticas derivadas de monocitos

Se generan células dendríticas (DC) a partir de la capa leucocítica de voluntarios sanos. Se cultivan PBMC (2.1.6) en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad de 15 x 10⁶ células/pocillo en 3 ml de X-VIVO-15 (Cambrex, Verviers, Bélgica) más plasma autólogo termoinactivado al 1,5% que contiene GM-CSF 800 U/ml (Leukomax; Novartis, Basilea, Suiza) e IL-4 1.000 U/ml (Strathmann Biotec, Hamburgo, Alemania). Los cultivos se alimentan en días alternos (días 2, 4 y 6) retirando 1 ml del medio y volviendo a añadir 1 ml de medio fresco con citoquinas. En el día 7, las células no adherentes se recolectan y se trasladan a nuevas placas de 6 pocillos y se cultivan en presencia de IL-1β 10 ng/ml, TNF-α 10 ng/ml, IL-6 1.000 U/ml (todos de Strathmann, Biotec, Alemania) y PGE₂ 1 µg/ml (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Suecia). Las DC CD83⁺ maduras se recolectan en el día 9 del cultivo.

(2.1.6) Aislamiento de PMBC con merma de CD3

Las células T se retiran de las PBMC con CD3 Dynabeads (Dyna, Noruega) empleando 0,5 esferas/célula. Las Dynabeads recogidas se lavan dos veces en tubos de 15 ml con tampón de eliminación empleando un concentrador de partículas magnéticas (Dyna) según las instrucciones del fabricante. Las PBMC (5 x 10⁷/ml) se añaden en tampón de eliminación y se incuban durante min a 4 °C en un agitador (mezclador de muestras, Dyna). Las células CD3⁺ se eliminan según las instrucciones del fabricante mediante el uso del concentrador de partículas magnéticas, que produce una pureza de >98% PBMC CD3⁻.

(2.1.7) Aislamiento de PMBC con merma de CD25 humanas

Las PBMC se aíslan según (2.1.1). Las células T reguladoras que expresan CD25 en la preparación de PBMC se retiran con CD25 Dynabeads, (Dyna, Noruega) según las instrucciones del fabricante (para los detalles, véase 2.1.4) empleando 0,5 esferas/célula. Las Dynabeads recogidas se lavan dos veces en tubos de 15 ml con tampón de eliminación empleando un concentrador de partículas magnéticas (Dyna) según las instrucciones del fabricante. Las PBMC (5 x 10⁷/ml) se añaden en tampón de eliminación y se incuban durante 20 min a 4 °C en un agitador (mezclador de muestras, Dyna). Las células CD25⁺ se eliminan según las instrucciones del fabricante mediante el uso del concentrador de partículas magnéticas, que produce una pureza de >99% PBMC negativas a CD25.

(2.2) Método para ensayar la actividad represora de células Treg CD4⁺CD25⁺

(2.2.1) Ensayo de represión de cocultivo A: Reacción de leucocitos mixta (MLR)

Deben realizarse cocultivos de células T auxiliares CD4⁺ o células T efectoras CD8⁺ con células Treg CD4⁺CD25⁺ y DC alogeneicas para analizar la actividad represora de las células Treg CD4⁺CD25⁺ sobre las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺. Por tanto, se cocultivan 1 x 10⁵/pocillo de células T auxiliares CD4⁺ (2.1.2) o células T efectoras CD8⁺ (2.1.3) con diferente número de células Treg CD4⁺CD25⁺ (2.1.4; proporción 1:1 a 1:4) y 1 x 10⁴/pocillo de DC en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillo en X-VIVO 15 (Cambrex, Verviers, Bélgica) en presencia o en ausencia de un compuesto de unión a CD4, por ejemplo, gp120 de VIH-1 (0,1-10 µg/ml). Las células dendríticas maduras (DC) generadas como se describió en (2.1.5) que proceden del mismo donante que las células Treg CD4⁺CD25⁺ (singénicas), pero son alogeneicas para las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras

CD8⁺ que se emplean para la estimulación de células T. En este ensayo, solo las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ son activadas por las DC alogeneicas (MLR), lo cual produce una gran proliferación del subconjunto de células T. Las células Treg CD4⁺CD25⁺ no activadas no reprimen esta proliferación en ausencia de un compuesto activador de células Treg. Una activación funcional de las células Treg CD4⁺CD25⁺ por el compuesto de unión a CD4 produce una menor proliferación de células T auxiliares CD4⁺ o células T efectoras CD8⁺. La proliferación se determina después de 4 días de cultivo añadiendo 3H-timidina (3H-Tdr) 37 kBq durante 16 h adicionales.

(2.2.2) Ensayo de represión de cocultivo B: Estimulación de células T efectoras CD8⁺ con PBMC alogeneicas y células Treg CD4⁺CD25⁺ procedentes del mismo voluntario sano

Para estudiar exclusivamente la influencia de una sustancia, por ejemplo, gp120 de VIH-1, que puede unirse al menos al epitopo que aparece en SEC ID NO:1 sobre la función represora de las células Treg CD4⁺CD25⁺, se desarrolló un ensayo de cocultivo que contenía células T CD8⁺ para excluir cualquier influencia de esta sustancia sobre estas (las células T CD8⁺ no expresan CD4). En este escenario, la activación de células T efectoras CD8⁺ alorreactivas solo es reprimida por las células Treg CD4⁺CD25⁺ activadas, tal como después de una estimulación adicional con mAb anti-CD3 (control positivo). Para evaluar la influencia, por ejemplo, de la gp120 de VIH-1 sobre la función de las células Treg CD4⁺CD25⁺, se cocultivan células Treg CD4⁺CD25⁺ aisladas (2.1.4) con PBMC singénicas, con merma de células T e irradiadas (50 Gy) (2.1.6) y células T efectoras CD8⁺ alogeneicas (2.1.3) en presencia de concentraciones variables (0,1-10 µg/ml) de diferentes preparaciones de gp120 de VIH-1. Brevemente, 1 x 10⁵ células Treg CD4⁺CD25⁺ se incuban con 3 x 10⁵ PBMC con merma de células T singénicas en presencia o en ausencia de cantidades variables de gp120 de VIH-1. La estimulación con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 0,5 µg/ml (OKT-3, ebioscience, EEUU) actúa como control positivo. El control negativo se logra sin una estimulación adicional. Inmediatamente después o 24 h después se añaden 1 x 10⁵ células T efectoras CD8⁺ alogeneicas a los cultivos y se determina la proliferación después de 72 h más mediante la incorporación de ³H-Tdr (37 kBq/pocillo). La activación funcional de las células Treg CD4⁺CD25⁺ a través de la interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1 produce una proliferación reprimida de las células T efectoras CD8⁺ y, con ello, se identifica una sustancia como activador de células Treg (para los datos, véase la figura 1).

Para demostrar en paralelo si una sustancia puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 a un epitopo de CD4 de una célula Treg CD4⁺CD25⁺, se añade CD4 en diferentes concentraciones (0,1-10 µg/ml) para aislar las células Treg CD4⁺CD25⁺ (2.1.4) cocultivadas con PBMC con merma de células T singénicas (2.1.6) y células T efectoras CD8⁺ alogeneicas (2.1.3) en presencia de concentraciones variables de la sustancia. La mayor proliferación de células efectoras CD8⁺ se parece a la unión competitiva a CD4 y bloquea la activación de las células Treg a través de la interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1. Todos los cultivos se realizaron en X-VIVO-15 sin suero (Cambrex, Verviers, Bélgica).

Como alternativa a la inactivación inducida por irradiación y el bloqueo de la proliferación, las PBMC pueden tratarse con mitomicina C (Sigma, Alemania). Brevemente, 3 x 10⁷ PBMC se incuban en 3 ml de MEM/FCS al 10%/180 µg de mitomicina C durante 30 min a 37 °C. Después, las células se lavan 5 x empleando MEM/FCS al 10%. Posteriormente las células se someten al ensayo.

(2.2.3) Ensayo de represión de cocultivo C: Estimulación de células T en presencia de células Treg CD4⁺CD25⁺ preactivadas y PBMC alogeneicas

Para evaluar el potencial activador directo de células Treg de un compuesto en ausencia de células presentadoras de antígenos, tales como PBMC, se precultivaron células Treg CD4⁺CD25⁺ aisladas (según 2.1.4) en X-VIVO-15 durante 16-48 h solas, en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 0,5 µg/ml (OKT-3) como control positivo, o en presencia de diferentes concentraciones de gp120 de VIH-1. Después, las células se lavan a fondo y se añaden a cocultivos de PBMC singénicas irradiadas (50 Gy) y células T auxiliares CD4⁺ o células T efectoras CD8⁺ alogeneicas. La proliferación se determina después de 72 h más mediante la incorporación de ³H-Tdr (37 kBq/pocillo). La activación funcional de las células Treg CD4⁺CD25⁺ a través de su interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1 produce una proliferación reprimida de las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ y, con ello, se identifica una sustancia como un activador de células Treg.

Una menor radiactividad incorporada se parece a la proliferación reprimida e identifica la inhibición de CD8⁺ y, con ello, se identifica una sustancia que activa una célula Treg a través de la interacción con el epitopo indicado en SEC ID NO:1.

(2.3.) Método para la lectura de la actividad represora de células Treg CD4⁺CD25⁺

(2.3.1) Análisis de la proliferación

Después de 3-4 días de incubación de las células en los ensayos proporcionados en (2.2.1), (2.2.2) y (2.2.3) se mide la proliferación de células T. Durante 16 h más, las células se pulsan con ³H-Tdr (37 kBq/pocillo, MB Biomedicals), y se mide la radiactividad incorporada empleando un contador de centelleo líquido (Betaplate, Wallac/PerkinElmer). En ausencia de un compuesto activador de células Treg, las células Treg en reposo no pueden inhibir la proliferación de las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ (control negativo). Por contraste, en presencia de un compuesto de unión a CD4 activador o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (control positivo), la proliferación de las

células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ es reprimida por las células Treg CD4⁺CD25⁺. Una menor radiactividad incorporada se parece a la proliferación reprimida e identifica la inhibición de las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ y, con ello, se identifica que una célula Treg CD4⁺CD25⁺ ha sido activada.

5 Para algunos experimentos, la proliferación de células Treg CD4⁺CD25⁺, células T auxiliares CD4⁺ o células T efectoras CD8⁺ se sigue selectivamente mediante una citometría de flujo después de marcar estas poblaciones con el kit Vibrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogen Life Technologies, San Diego, EEUU) según el protocolo del fabricante. Para el marcaje de CFDA, se incuban células T (1 x 10⁷ células/ml) en PBS con el kit CFDA Vibrant CFDA SE Cell Tracer Kit 1 μM (Invitrogen Life Technologies, San Diego, EEUU) a 37 °C durante 30 min. Después, las células se lavan con X-VIVO-15 y se incuban durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Después de un lavado adicional, las células se cuentan y se añaden a los cocultivos. Además se mide la proliferación de las células mediante citometría de flujo después de 4-6 días de cultivo.

(2.3.2) Análisis de la producción de citoquinas

15 Las células Treg activadas no solo inhiben la proliferación de células T auxiliares CD4⁺ o células T efectoras CD8⁺ cocultivadas, sino que también reprimen la síntesis de citoquinas de estas células T. Por tanto, la detección de las citoquinas producidas por células T cocultivadas es un método alternativo para analizar el potencial activador de células Treg de un reactivo. En este ensayo, se cocultivan células Treg CD4⁺CD25⁺ aisladas (según 2.1.4), PBMC con merma de células T singénicas (según 2.1.6) y células T efectoras CD8⁺ alogeneicas (según 2.1.3) como se describió en (2.2) anterior. Después de 7 días, las células T efectoras CD8⁺ alorreactivas se reestiman de modo policlonal con fitohemaglutinina 2,4 μg/ml (PHA, Sigma, Alemania) y PMA 1 ng/ml durante 5 h en presencia de monensina (BD GolgiStop™, BD Biosciences Pharmingen, 1,3 μM). Después las células se recogen, se lavan con PBS, se fijan y se permeabilizan según las instrucciones del fabricante (disolución perm/fix, BD PharMingen, Alemania) y se tiñen con 0,5 μg/ensayo de un anticuerpo monoclonal específico de citoquina (anti-IFN-γ, anti-IL-2, anti-TNF-α, todos de BD PharMingen). Posteriormente se analiza la producción de citoquina por las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ mediante citometría de flujo. En ausencia de un compuesto activador de células Treg, las células Treg no pueden inhibir la producción de citoquinas de las células T auxiliares CD4⁺ o de las células T efectoras CD8⁺ (control negativo). Por contraste, en presencia de un compuesto de unión a CD4 activador o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (control positivo), la producción de citoquinas de las células T auxiliares CD4⁺ o las células T efectoras CD8⁺ es reprimida por las células Treg activadas funcionales. Una menor producción de citoquinas identifica una inhibición y, con ello, se identifica que una célula Treg CD4⁺CD25⁺ ha sido activada.

(2.3.3) Análisis de la expresión de CD25

35 Las células Treg activadas inhiben la capacidad de las células T efectoras CD8⁺ y las células T auxiliares CD4⁺ para expresar la cadena α del receptor de IL-2, CD25. Por tanto, el análisis de la expresión de CD25 mediante citometría de flujo es otro método para evaluar el potencial activador de células Treg de un reactivo. En este ensayo, se cocultivan células Treg CD4⁺CD25⁺ aisladas (según 2.1.4), PBMC con merma de células T singénicas (según 2.1.6) con células T efectoras CD8⁺ alogeneicas o células T auxiliares CD4⁺ alogeneicas (según to 2.1.3, 2.1.2 y 2.2.1, 2.2.2 y 2.2.3). Después de 7 días, las células T efectoras CD8⁺ alorreactivas o las células T auxiliares CD4⁺ alogeneicas se estimulan con PBMC alogeneicas procedentes del mismo donante o DC, según se emplean en el cultivo primario, y se analiza la expresión de CD25 en células T efectoras CD8⁺ alorreactivas o células T auxiliares CD4⁺ alogeneicas 24 h después mediante citometría de flujo. Una activación de las células Treg por el compuesto de ensayo directamente produce una expresión inhibida de CD25 en las células T efectoras CD8⁺ o las células T auxiliares CD4⁺ reestimuladas. En ausencia de un compuesto activador de células Treg, las células Treg no pueden inhibir la expresión de CD25 en las células T efectoras CD8⁺ o las células T auxiliares CD4⁺ reestimuladas (control negativo). Por contraste, en presencia de un reactivo activador o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (control positivo), la expresión de CD25 en las células T efectoras CD8⁺ o en las células T auxiliares CD4⁺ es reprimida por las células Treg. Una menor expresión de CD25 identifica una inhibición y, con ello, se identifica que una célula Treg CD4⁺CD25⁺ ha sido activada.

(2.3.4) Análisis de la producción de AMP cíclico

La estimulación de las células Treg produce un fuerte aumento en el AMPc citosólico (es decir, intracelular). Por tanto, el análisis del AMPc en células Treg es otro método para determinar si una sustancia que puede interferir con la unión de gp120 de VIH-1 al epitopo de CD4 de una célula CD4-positiva puede activar una célula Treg. En este ensayo, células Treg CD4⁺CD25⁺ recién aisladas (según 2.1.4) (1 x 10⁵-1 x 10⁶/pocillo) se incuban con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT-3; 0,5 μg/ml) o gp120 de VIH-1 (0,1-10 μg/ml; Protein Science Corp., Meriden, CT, EEUU) o se dejan sin tratar durante 16 horas. Para evaluar las concentraciones de AMPc citosólico se aplica un ELISA específico de AMPc (ensayo de AMP cíclico Parameter™, n.º de catálogo KGE002; R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). Las células Treg se lavan tres veces en PBS enfriado en hielo y después se lisan (1 x 10⁷/ml) empleando el tampón de lisis suministrado por el fabricante y aplicado al ELISA según las recomendaciones del fabricante.

La activación de las células Treg por el compuesto de ensayo produce directamente un aumento en el AMPc citosólico. En ausencia de un compuesto activador de células Treg no se detecta un aumento en el AMPc en las células Treg CD4⁺CD25⁺ (control negativo). Por contraste, en presencia de un compuesto de unión a CD4 activador

o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (control positivo), las células Treg CD4⁺CD25⁺ muestran un fuerte aumento en el AMPc citosólico. Un aumento en el AMPc citosólico indica que una célula Treg CD4⁺CD25⁺ se ha activado. Para los datos, véase la figura 2.

- 5 Como alternativa, otros análisis de la concentración de AMPc en el sobrenadante del ensayo y el uso de inhibidores de fosfodiesterasa, por ejemplo, roflumilast (1-50 µM) potencian la señal de AMPc en el ensayo.

(3) Ensayo *in vivo* para determinar si gp120 de VIH-1 o una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 a una Treg CD4⁺CD25⁺ puede activar una Treg CD4⁺CD25⁺ Treg en un modelo relacionado con una enfermedad y, con ello, puede ser útil para el tratamiento de una enfermedad autoinmune (por ejemplo, enfermedad del intestino inflamatoria, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes de tipo I, lupus eritematoso, pénfigo vulgar, tiroiditis), otras enfermedades con aspectos autoinmunes en su patogénesis, tales como vitíligo, dermatitis atópica, una alergia (por ejemplo, rinitis alérgica), asma (por ejemplo, asma alérgico), GVHD (enfermedad del injerto contra el receptor), rechazo de injertos

15 (3.1) Método para la inducción de GVHD mediante transferencia de PBMC humanas a ratones NOD-Scid y medición de la gravedad de la enfermedad

Se emplean ratones NOD-Scid, inmunodeficientes graves/diabéticos no obesos combinados (alelo mutante: *Prkdc*^{scid}, raza: NOD.CB17- *Prkdc*^{scid} (Shultz *et al.*, 1995)) de the Central Laboratory Animal Facility of the University of Mainz (también pueden adquirirse en The Jackson Laboratory a través de Charles River Laboratories, Alemania) como modelo animal para la transferencia de células inmunológicas humanas periféricas y, así, para el análisis *in vivo* de interacciones inmunorreguladoras (Hesselton *et al.*, 1995). Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) transferidas ratones NOD-Scid inducen la enfermedad del injerto contra el receptor dependiente de la edad acelerante (GVHD). Aunque el número de células transferidas determina la aparición de esta enfermedad, la cotransferencia de células Treg humanas puede retrasar gradualmente o prevenir la enfermedad. Este sistema de modelo también permite el estudio de la función de Treg humanas. Para inducir una GVHD, ratones NOD-Scid de tres a seis días después del nacimiento fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1×10^7 a 3×10^7 PBMC humanas (el aislamiento de las PBMC humanas se realizó según 2.1.1). La GVHD se induce mediante activación inmunológica (xenogénica) de células T efectoras humanas en la fracción de PBMC inyectadas en los ratones. Sin embargo, los ratones NOD-Scid no son capaces de reaccionar frente a las PBMC humanas injertadas. La enfermedad inducida por PBMC humanas se caracteriza por la falta de aumento de peso y la pérdida de peso, una menor movilidad, una postura encorvada, pelo revuelto e inflamación de órganos en los animales tratados (Kizilisik y Al-Sebayel, 1997). La transferencia de PBMC humanas provoca la detención del crecimiento o la pérdida de peso dentro de 30 a 40 días (dependiendo del número de células transferidas) después de la transferencia, comparado con los ratones sin tratar. La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. Los ratones control no recibieron PBMC. Para los datos, véase la figura 3.

40 (3.2) Método para la inducción de GVHD mediante transferencia de PBMC humanas a ratones NOD-Scid y prevención de la enfermedad por la transferencia adicional de células T reguladoras y medición de la gravedad de la enfermedad

Para evitar una enfermedad de GVHD en ratones NOD-Scid de tres a seis días después del nacimiento inducidos por una inyección intraperitoneal de 1×10^7 a 3×10^7 PBMC humanas (el aislamiento de las PBMC humanas se realizó según 2.1.1), se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células T reguladoras humanas más (el aislamiento de las células T reguladoras humanas se realizó según 2.1.4) por vía intraperitoneal (proporción de Treg a PBMC 1:4). La cotransferencia de células T reguladoras humanas, junto con PBMC humanas (potenciación de la proporción de Treg) da como resultado un desarrollo similar en la prevención del desarrollo de GVHD y la pérdida de peso que en los ratones no tratados. La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. Los ratones control no recibieron PBMC. Para los datos, véase la figura 3.

50 (3.3) Método para la inducción de GVHD mediante transferencia de PBMC humanas a ratones NOD-Scid y prevención de la enfermedad mediante la administración adicional de gp120 de VIH-1 o una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 y medición de la gravedad de la enfermedad

Para evitar una enfermedad de GVHD en ratones NOD-Scid de tres a seis días después del nacimiento inducidos por una inyección intraperitoneal de 1×10^7 a 3×10^7 PBMC humanas (el aislamiento de las PBMC humanas se realizó según 2.1.1), se administra la gp120 de VIH-1 o una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1, además de la inyección de las PBMC humanas. La administración de la gp120 de VIH-1 o de una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 induce la activación de células T reguladoras humanas en la fracción de PBMC que resulta en la prevención de la inflamación de órganos y la prevención de la detención del crecimiento/pérdida de peso similar a los ratones tratados con PBMC humanas y más células T reguladoras humanas o los ratones sin tratar. La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. Los ratones control no recibieron PBMC. Para los datos, véase la figura 4.

65 (3.4) Método para la inducción de GVHD mediante transferencia de PBMC humanas a ratones NOD-Scid y para demostrar que la prevención de la enfermedad mediante la administración de gp120 de VIH-1 o una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 está mediada por las células T reguladoras humanas en la

fracción de PBMC inyectadas en los ratones NOD-Scid y medición de la gravedad de la enfermedad. Ratones NOD-Scid de tres a seis días después del nacimiento fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1×10^7 PBMC con merma de CD25 humanas (el aislamiento de las PBMC humanas con merma de CD25 humanas se realizó según 2.1.7). La GVHD es inducida mediante 1×10^7 PBMC con merma de CD25 humanas en la misma magnitud que mediante la transferencia de 1×10^7 PBMC sin merma de CD25 humanas en ratones NOD-Scid (para los datos, véanse las figuras 5, 3 y 4). Los ratones que recibieron PBMC con merma de CD25 y una administración adicional de gp120 de VIH no resultaron protegidos frente al desarrollo de la GVHD y la pérdida de peso. La prevención de la GVHD por el gp120 de VIH o una sustancia que puede interferir con la unión de la gp120 de VIH-1 depende de las células T reguladoras. La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. Para los datos, véase la figura 5.

Descripción de las figuras:

La Figura 1: El tratamiento con gp120 de VIH-1 activa a las células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas

Para estudiar la influencia de la gp120 de VIH-1 exclusivamente sobre la función de las células Treg CD4⁺CD25⁺, se desarrolló un ensayo de cocultivo que contenía células T CD8⁺ como efectores para excluir cualquier influencia de la gp120 de VIH-1 sobre estas. Por tanto, se cocultivan células Treg CD4⁺CD25⁺ aisladas con PBMC con merma de células T singénicas y células T efectoras CD8⁺ alogeneicas. En este escenario, la proliferación de células T efectoras CD8⁺ alorreactivas solo es reprimida por las células Treg CD4⁺CD25⁺ activadas, tal como después de una estimulación adicional con mAb anti-CD3 o una señal mediada por la gp120 de VIH-1 activadora (todas las proteínas de gp120 de VIH-1: Protein Sciences Corp., Meriden, EEUU).

Se incubaron 1×10^5 células Treg CD25⁺ aisladas con 3×10^5 PBMC con merma de células T singénicas irradiadas (50 Gy) y 1×10^5 de células T efectoras CD8⁺ alogeneicas en presencia/ausencia de diferentes preparaciones de gp120 de VIH-1, y la adición de anti-CD3 (OKT-3) 0,5 µg/ml actuó como control positivo. La proliferación se determinó mediante la incorporación de ³H-Tdr 4 días después.

Las barras grises representan la proliferación de células T CD8⁺ y las PBMC con merma de CD3 singénicas inactivadas, las barras blancas representan la proliferación de células Treg CD4⁺CD25⁺, y las barras negras representan la proliferación de células T CD8⁺ cocultivadas con células Treg CD4⁺CD25⁺ y las PBMC con merma de CD3 singénicas inactivadas. Debido a la inactivación, las PBMC no contribuyen a la proliferación de las muestras.

Tal como puede observarse por las barras blancas cortas, las células Treg no muestran una proliferación significativa bajo todas las condiciones (sin estímulos adicionales, o anti-CD3, o gp120 de VIH-1 MN, o gp120 de VIH-1 LAV, o gp120 de VIH-1 CM). Las células T CD8⁺ (barras grises) y las células T CD8⁺ cocultivadas con células Treg (barras negras) muestran la misma magnitud de proliferación bajo la condición sin estímulos adicionales, que representa los controles. Tras la estimulación con anti-CD3, las células T CD8⁺ (barras grises) muestran un fuerte aumento en la proliferación, pero las células T CD8⁺ cocultivadas con células Treg (barras negras) muestran una proliferación reducida, lo cual indica la represión de la proliferación de las células T CD8⁺ por el anti-CD3 activado y, por tanto, células Treg represoras. El efecto del anti-CD3 es dependiente de la dosis. Tras la estimulación con gp120 de VIH-1 MN, o gp120 de VIH-1 LAV, o gp120 de VIH-1 CM, las células T CD8⁺ cocultivadas con células Treg (barras negras), en contraste con las células T CD8⁺ sin Treg (barras grises), reducen la proliferación, lo cual indica células Treg activadas por gp120 de VIH-1. Esto demuestra claramente que la gp120 de VIH-1 activa las células Treg, que posteriormente ejercen una actividad represora sobre las células T CD8⁺ reduciendo su proliferación. La actividad represora de las células Treg y, por tanto, la proliferación reducida depende de la dosis de la gp120 de VIH-1.

La Figura 2: Medición del AMP cíclico en células Treg CD4⁺CD25⁺ - El tratamiento con gp120 de VIH-1 aumenta el AMPc citosólico en células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas

Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (CD25) se dejan sin tratar (∅) o se estimulan con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT-3; 1 µg/ml) o gp120 de VIH-1 (1 µg/ml). Tras 16 horas de estimulación, las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se lisan (1×10^7 /ml) y se evalúa la concentración de AMPc citosólico de 1×10^6 células T empleando un ELISA específico de AMPc.

Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (CD25) se dejan sin tratar (∅) o se estimulan con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT-3; 1 µg/ml) o gp120 de VIH-1 (1 µg/ml). Tras 16 horas de estimulación, las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se lisan (1×10^7 /ml) y se evalúa la concentración de AMPc citosólico de 1×10^6 células T empleando un ELISA específico de AMPc.

Las barras representan la cantidad de AMP cíclico (AMPc) citosólico (intracelular) en células Treg sin tratar o células Treg tratadas con diferentes estímulos. La barra superior representa células Treg sin tratar (∅) y muestra el nivel basal del AMPc intracelular. Tras la estimulación con anti-CD3 (OKT-3), las células Treg se activan y muestran un aumento en el AMPc intracelular, comparado con el control sin tratar (barra superior), tal como se demuestra con la segunda barra. El tratamiento de las células Treg con gp120 de VIH-1 también induce un aumento en el AMPc intracelular, tal como se demuestra con la barra inferior. Esta demostración de que la activación de las células Treg por diferentes estímulos induce un aumento en el AMPc citosólico puede utilizarse como lectura para la activación.

La Figura 3: Inducción de GVHD mediante transferencia de PBMC a ratones NOD-Scid y prevención de GVHD por la transferencia adicional de células T reguladoras (Treg)

Ratones NOD-Scid de tres a seis días reciben una inyección intraperitoneal de 1×10^7 PBMC humana sin (círculos) o con $2,5 \times 10^6$ células T reguladoras humanas (triángulos). Los ratones control (rombos) no

reciben PBMC. Los ratones que reciben PBMC desarrollan una GVHD mortal, no crecen y mueren. Los animales que recibieron además células T reguladoras están protegidos frente al desarrollo de GVHD y se desarrollan con normalidad (3 ratones por grupo). La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. El diagrama muestra el peso corporal relativo en diferentes momentos después de la transferencia.

La Figura 4: Inducción de GVHD mediante transferencia de PBMC a ratones NOD-Scid y prevención de GVHD por la inyección adicional de gp120 de VIH

Ratones NOD-Scid de tres a seis días reciben una inyección intraperitoneal de 1×10^7 PBMC humana sin (círculos) o con 5 μg de gp120 de VIH (triángulos). Los ratones control (rombos) no reciben PBMC. Los ratones que reciben PBMC desarrollan una GVHD mortal, no crecen y mueren. Los animales que recibieron además gp120 de VIH están protegidos frente al desarrollo de GVHD y se desarrollan con normalidad (3 ratones por grupo). La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. El diagrama muestra el peso corporal relativo en diferentes momentos después de la transferencia.

La Figura 5: La prevención de GVHD en ratones NOD-Scid transferidos con PBMC mediante una inyección adicional de gp120 de VIH depende de la presencia de células T reguladoras

Ratones NOD-Scid de tres a seis días reciben una inyección intraperitoneal de 1×10^7 PBMC con merma de CD25 humanas sin (círculos) o con 5 μg de gp120 de VIH (triángulos). Los ratones control (rombos) no reciben PBMC (3 ratones por grupo). Los ratones que reciben PBMC con merma de CD25 desarrollan una GVHD mortal, no crecen y mueren. Los animales que reciben 1×10^7 PBMC con merma de CD25 humanas y también gp120 de VIH no están protegidos frente al desarrollo de GVHD, tampoco crecen y mueren. La falta de aumento de peso/pérdida de peso se emplea como un parámetro para puntuar la gravedad de la GVHD. El diagrama muestra el peso corporal relativo en diferentes momentos después de la transferencia.

Bibliografía:

Arthos J., Deen K.C., Chaikin M.A., Fornwald J.A., Sathe G., Sattentau Q.J., Clapham P.R., Weiss R.A., McDougal J.S., Pietropaolo C., *et al.*, Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of VIH, *Cell*, 1989, 57:469-481.

Bluestone J.A., Tang Q., Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen-specific regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, supl. 2:14622-14626.

Carriere, D., Vendrell, J. P., Fontaine, C., Reynes, J., Atoui, N., y Pau, B., CD4 V₁ domain masking on lymphocytes from VIH-1-infected patients, en: *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, volumen 1, pp. 475-476, Oxford University Press. 1995, editor: S. F. Schlossman *et al.*

Castagna A., Biswas P., Beretta A., Lazzahn A., The appealing story of VIH entry inhibitors: from discovery of biological mechanisms to drug development, *Drugs*, 2005, 65:879-904.

Culp J.S., Johansen H., Hellmig B., Beck J., Matthews T.J., Delers A., Rosenberg M., Regulated expression allows high level production and secretion of VIH-1 gp120 envelope glycoprotein in *Drosophila* Schneider cells, *Biotechnology (N Y)*, 1991, 9:173-177.

Diamond D.C., Sleckman B.P., Gregory T., Lasky L.A., Greenstein J.L., Burakoff S.J., Inhibition of CD4+ T cell function by the VIH envelope protein, gp120, *J. Immunol.*, 1988, 141:3715-3717.

Fontenot J.D., Rudensky A.Y., A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3, *Nat. Immunol.*, 2005, 6:331-337.

Franke R., Hirsch T., Overwin H., Eichler J., Synthetic Mimetics of the CD4 Binding Site of VIH-1 gp120 for the Design of Immunogens, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, 9 de enero [Epub antes de impresión].

Hesselton R.M., Greiner D.L., Mordes J.P., Rajan T.V., Sullivan J.L., Shultz L.D., High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type I infection in NOD/LtSz-scid/scid mice, *J. Infect. Dis.*, 1995, 172:974-982.

Hoffmann P., Eder R., Kunz-Schughart L.A., Andreesen R., Edinger M., Large-scale *in vitro* expansion of polyclonal human CD4(+)/CD25high regulatory T cells, *Blood*, 2004, 104:895-903.

Horwitz D.A., Zheng S.G., Gray J.D., Wang J.H., Ohtsuka K., Yamagiwa S., Regulatory T cells generated *ex vivo* as an approach for the therapy of autoimmune disease, *Semin. Immunol.*, 2004, 16:135-143.

Hunig T., Dennehy K., CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential, *Immunol. Lett.*, 2005, 100:21-28.

Jeffs S.A., McKeating J., Lewis S., Craft H., Biram D., Stephens P.E., Brady R.L., Antigenicity of truncated forms of

- the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, *J. Gen. Virol.*, 1996, julio, 77 (pt. 7):1403-1410.
- Jameson B.A., Rao P.E., Kong L.I., Hahn B.H., Shaw G.M., Hood L.E., Kent S.B., Location and chemical synthesis of a binding site for VIH-1 on the CD4 protein, *Science*, 1988, 240:1335-1339.
- 5 Kizilisik T.A., al-Sebayel M., Diagnosis and classification of the severity of graft versus host disease after experimental small-bowel transplantation in small animal models, *Transplant Proc.*, 1997, 29:3030-3033.
- 10 Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S., Gruet J., Guetard D., Hercend T., Gluckman J.C., Montagnier L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV, *Nature*, 1984. 312:767-768.
- 15 Lasky L.A., Gropman J.E., Fennie C.W., Benz P.M., Capon D.J., Dowbenko D.J., Nakamura G.R., Nunes W.M., Renz M.E., Berman P.W., Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein, *Science*, 1986, 233:209-212.
- 20 Leonard C.K., Spellman M.W., Riddle L., Harris R.J., Thomas J.N., Gregory T.J., Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:10373-10382.
- 25 Lohman K.L., Attanasio R., Buck D., Carrillo M.A., Allan J.S., Kennedy R.C., Characteristics of murine monoclonal anti-CD4. Epitope recognition, idiotype expression, and variable region gene sequence, *J. Immunol.*, 1992, 149:3247-3253.
- 30 Markovic I., Clouse K.A., Recent advances in understanding the molecular mechanisms of VIH-1 entry and fusion: revisiting current targets and considering new options for therapeutic intervention, *Curr. VIH Res.*, 2004, 2:223-234.
- Mizukami T., Fuerst T.R., Berger E.A., Moss B., Binding region for human immunodeficiency virus (VIH) and epitopes for VIH- blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85:9273.
- 35 Moreland L.W., Haverty T.P., Wacholtz M.C., Knowles R.W., Bucy R.P., Heck L.W. Jr., Koopman W.J., Nondepleting humanized anti-CD4 monoclonal antibody in patients with refractory rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.*, 1998, 25:221-228.
- 40 Muesing M.A., Smith D.H., Cabradilla C.D., Benton C.V., Lasky L.A., Capon D.J., Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus, *Nature*, 1985, 313:450-458.
- 45 Repke H., Gabuzda D., Palu G., Emmrich F., Sodroski J., Effects of CD4 synthetic peptides on VIH type I envelope glycoprotein function, *J. Immunol.*, 1992, 149:1809-1816.
- 50 Robinson D.S., Regulation: the art of control? Regulatory T cells and asthma and allergy, *Thorax.*, 2004, 59:640-643.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon C., Narula, S., Levings, M.K., Type 1 T regulatory cells, *Immunol. Rev.*, 2001, 182:68-79.
- 55 Sakaguchi, S., Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self, *Nature*, 2005, 6:345-352.
- 60 Shevach E.M., CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers, *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, 2:389-400.
- Shultz L.D., Schweitzer L., Christianson S.W., Gott B., Schweitzer I.B., Tennent B., McKenna S., Mobraaten L., Rajan T.V., Greiner D.L., Leiter E.H., Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice, *J. Immunol.*, 1995, 154:180-191.
- 65 Starcich B.R., Hahn B.H., Shaw G.M., McNeely P.D., Modrow S., Wolf H., Parks E.S., Parks W.P., Josephs S.F., Gallo R.C., *et al.*, Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS, *Cell*, 1986, 6 de junio, 45(5):637-648.
- Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K., Tooley A.J., Ye J., Subudhi S.K., Zheng X.X., Strom T.B., Bluestone J.A., Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells, *J. Immunol.*, 2003, 171:3348-3352.
- Thornton A.M., Shevach E.M., CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production, *J. Exp. Med.*, 1998, 188:287-296.
- 70 Watanabe, Tomoko, *et al.*, CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells, *Clinical*

Immunology (Orlando, FLA), septiembre de 2006, vol. 120, n.º 3, septiembre de 2006.

Weiner, H.L., Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells, Immunol. Rev., 2001, 182:207-214.

5 Witvrouw, Myriam, *et al.*, Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: Structure-activity relationship and mechanism of action, Journal of Medicinal Chemistry, vol. 43, n.º 5, 9 de marzo, 2000.

10 Yang Q.E., Stephen A.G., Adelsberger J.W., Roberts P.E., Zhu W., Currens M.J., Feng Y., Crise B.J., Gorelick R.J., Rein A.R., Fisher R.J., Shoemaker R.H., Sei S., Discovery of small-molecule human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that target the gp120-binding domain of CD4, J. Virol., 2005, 79:6122-6133.

15 Zheng S.G., Wang J.H., Gray J.D., Soucier H., Horwitz D.A., CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells generated *ex vivo* with IL-2 and TGF-beta suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome, J. Immunol., 2004, 172:5213-5221.

ES 2 825 718 T3

Lista de secuencias

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Activación específica de una célula T reguladora y su uso para el tratamiento del asma, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos y para la inducción de tolerancia

5 <130> p01-2127

<150> Documento EP 07101604.2

<151> 02-01-2007 (SEC ID NO:1 a 10)

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> humano

<400> 1

```
Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu
1           5           10           15
Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg
           20           25           30
```

15 <210> 2

<211> 458

<212> PRT

<213> humano

<400> 2

20

```
Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
1           5           10           15
Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys
           20           25           30
```

ES 2 825 718 T3

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser
 35 40 45
 Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn
 50 55 60

 Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile
 85 90 95
 Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu
 100 105 110
 Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn
 115 120 125
 Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu
 130 135 140
 Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu
 165 170 175
 Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
 180 185 190
 Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
 195 200 205
 Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro
 210 215 220
 Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp
 225 230 235 240
 Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
 245 250 255
 Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
 260 265 270
 Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
 275 280 285
 Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys
 290 295 300
 Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr

ES 2 825 718 T3

305					310						315					320
Gln	Leu	Gln	Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Trp	Gly	Pro	Thr	Ser	Pro	
				325					330					335		
Lys	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Lys	Glu	Ala	Lys	Val	Ser	
			340					345						350		
Lys	Arg	Glu	Lys	Ala	Val	Trp	Val	Leu	Asn	Pro	Glu	Ala	Gly	Met	Trp	
		355					360						365			
Gln	Cys	Leu	Leu	Ser	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Ser	Asn	Ile	
	370					375					380					
Lys	Val	Leu	Pro	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	Val	Gln	Pro	Met	Ala	Leu	Ile	
385					390					395					400	
Val	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	Ile	
				405					410					415		
Phe	Phe	Cys	Val	Arg	Cys	Arg	His	Arg	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Arg	Met	
			420					425					430			
Ser	Gln	Ile	Lys	Arg	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Thr	Cys	Gln	Cys	Pro	
		435					440					445				
His	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Cys	Ser	Pro	Ile							
	450					455										

<210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> VIH-1

- 5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- 15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- 20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

- 25 <220>
 <221> característica_misc

ES 2 825 718 T3

<222 > (16)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misc

5 <222 > (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misc

10 <222 > (26)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misc

15 <222 > (30)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 3

```

  Trp Gln Xaa Xaa Gly Xaa Ala Xaa Tyr Ala Xaa Pro Ile Xaa Gly Xaa
  1           5           10           15
  Xaa Xaa Cys Xaa Ser Asn Ile Thr Gly Xaa Xaa Leu Thr Xaa Asp
           20           25           30
  
```

<210> 4
 <211> 31
 <212 > PRT
 <213> VIH-1

20 <400> 4

```

  Trp Gln Gly Ala Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Lys
  1           5           10           15
  Ile Asn Cys Val Ser Asn Ile Thr Gly Ile Leu Leu Thr Arg Asp
           20           25           30
  
```

<210> 5
 <211> 31
 <212 > PRT
 <213> VIH-1

```

  Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln
  1           5           10           15
  Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp
           20           25           30
  
```

25 <400> 5

<210> 6
 <211> 31
 <212 > PRT
 <213> VIH-1

30 <400> 6

ES 2 825 718 T3

```

Trp Gln Xaa Xaa Gly Xaa Ala Xaa Tyr Ala Xaa Pro Ile Xaa Gly Xaa
1           5           10           15
Xaa Xaa Cys Xaa Ser Lys Ile Thr Gly Xaa Xaa Leu Thr Xaa Asp
           20           25           30

```

<210> 8
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> VIH-1

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> > (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (16)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (26)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> > (30)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 8

REIVINDICACIONES

1. Un activador de células Treg para la activación de células T reguladoras (Treg) por medio de la interacción con un epitopo de células Treg indicado en SEC ID NO:1, comprendiendo dicho activador de células Treg un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, o SEC ID NO:10, para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, **que se caracteriza porque** su cuadro clínico se ve influido positivamente por un aumento en las células Treg activadas en respuesta al activador de epitopo células Treg, seleccionada del grupo que consiste en asma alérgico, dermatitis atópica, alergia alimentaria, enfermedad del receptor frente al injerto, artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitológica, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, penfigoide, una enfermedad inflamatoria debida a un trasplante de órganos o un trasplante de médula ósea.
2. El activador de células Treg según la reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, o SEC ID NO:10.
3. El uso *ex vivo* de un epitopo de una proteína de CD4 humana, que comprende los aminoácidos n.^{os} 1-31 de SEC ID NO:1 para la activación de células Treg por medio de la interacción con un activador de células Treg que se une a dicho epitopo.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que el epitopo se identifica como la región de la proteína de CD4 humana que abarca las posiciones de aminoácidos n.^o 54 a 84 de SEC ID NO:2.
5. El uso según la reivindicación 3, en el que el epitopo se selecciona del grupo que consiste en un péptido aislado que comprende los aminoácidos n.^{os} 1-31 de SEC ID NO:1, n.^{os} 26 a 458 de SEC ID NO:2, n.^{os} 26 a 419 de SEC ID NO:2, n.^{os} 26 a 207 de SEC ID NO:2, n.^{os} 26 a 131 de SEC ID NO:2, y n.^{os} 46 a 89 de SEC ID NO:2.
6. El uso de un sistema de ensayo para determinar si una sustancia es un activador de células Treg para la activación de células T reguladoras (Treg) por medio de la interacción con un epitopo de células Treg indicado en SEC ID NO:1, comprendiendo dicho sistema de ensayo al menos:
- (a) una célula Treg, y
 - (b) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEC ID NO:1, en el que el sistema de ensayo comprende una PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) con merma de CD3 singénica inactivada o una célula dendrítica (DC) y
 - (c) una célula T CD8+ alogeneica o una célula T CD4+ alogeneica, para determinar si una sustancia es un activador de células reguladoras (Treg).
7. El uso según la reivindicación 6, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en un péptido aislado que comprende los aminoácidos n.^{os} 26 a 458 de SEC ID NO:2, los aminoácidos n.^{os} 26 a 419 de SEC ID NO:2, los aminoácidos n.^{os} 26 a 207 de SEC ID NO:2, los aminoácidos n.^{os} 26 a 131 de SEC ID NO:2, y los aminoácidos n.^{os} 46 a 89 de SEC ID NO:2, o el péptido usado es un péptido aislado que comprende los aminoácidos n.^{os} 1 a 31 de SEC ID NO:1 y que tiene aminoácidos adicionales cadena arriba y/o cadena abajo, con el prerrequisito de que los aminoácidos adicionales no impidan la unión de una sustancia al tramo de aminoácidos indicado en SEC ID NO:1, en el que dichos aminoácidos adicionales cadena arriba o tramo de aminoácidos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en el aminoácido o tramo de aminoácidos indicados en SEC ID NO:2 en la posición 53, en la posición 52-53, en la posición 51-53, en la posición 50-53, en la posición 49-53, en la posición 48-53, en la posición 47-53, en la posición 46-53, en la posición 45-53, en la posición 44-53, en la posición 43-53, en la posición 42-53, en la posición 41-53, en la posición 40-53, en la posición 39-53, en la posición 38-53, en la posición 37-53, en la posición 36-53, en la posición 35-53, en la posición 34-53, en la posición 33-53, en la posición 32-53, en la posición 31-53, en la posición 30-53, en la posición 29-53, en la posición 28-53, en la posición 27-53, en la posición 26-53, en la posición 25-53, en la posición 24-53, en la posición 23-53, en la posición 22-53, en la posición 21-53, en la posición 20-53, en la posición 19-53, en la posición 18-53, en la posición 17-53, en la posición 16-53, en la posición 15-53, en la posición 14-53, en la posición 13-53, en la posición 12-53, en la posición 11-53, en la posición 10-53, en la posición 9-53, en la posición 8-53, en la posición 7-53, en la posición 6-53, en la posición 5-53, en la posición 4-53, en la posición 3-53, en la posición 2-53, y en la posición 1-53.
8. El uso según la reivindicación 7, en el que el péptido comprende además cadena abajo uno o más aminoácidos como se indica en SEC ID NO:2 en la posición 85, o en la posición 85 hasta n, en el que n es un número entero entre 86-458.
9. Un método para determinar si una sustancia es un activador de células Treg para la activación de células T reguladoras (Treg) por medio de la interacción con un epitopo de células Treg como se indica en SEC ID NO:1, que comprende:

- 5 (a) preseleccionar una sustancia que puede interaccionar con el sitio de unión a gp120 de VIH-1 de CD4,
(b) proporcionar una disolución que comprende (i) una célula Treg, y preferiblemente además (ii) una PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) con merma de CD3 singénica inactivada o una célula dendrítica (DC), y (iii) una célula T CD8⁺ alogénea o una célula T CD4⁺ alogénea,
(c) añadir la sustancia preseleccionada a (a) bajo condiciones que permiten la interacción de la sustancia con la célula Treg,
10 (d) medir si la célula Treg se ha activado, en el que la medición de si una célula Treg se ha activado se determina midiendo si una célula T CD8⁺ o CD4⁺ ha sido reprimida, en el que una célula T CD8⁺ o CD4⁺ reprimida identifica una célula Treg activada y, con ello, identifica la sustancia como un activador de células Treg.

15 10. El método según la reivindicación 9, en el que la medición de si una célula T CD8⁺ o CD4⁺ ha sido reprimida se determina (i) midiendo la proliferación inhibida de la célula T CD8⁺ o CD4⁺, o (ii) midiendo la expresión reducida de CD25 de la célula T CD8⁺ o CD4⁺, o (iii) midiendo la producción inhibida de citoquinas de la célula T CD8⁺ o CD4⁺.

Fig. 1 /5

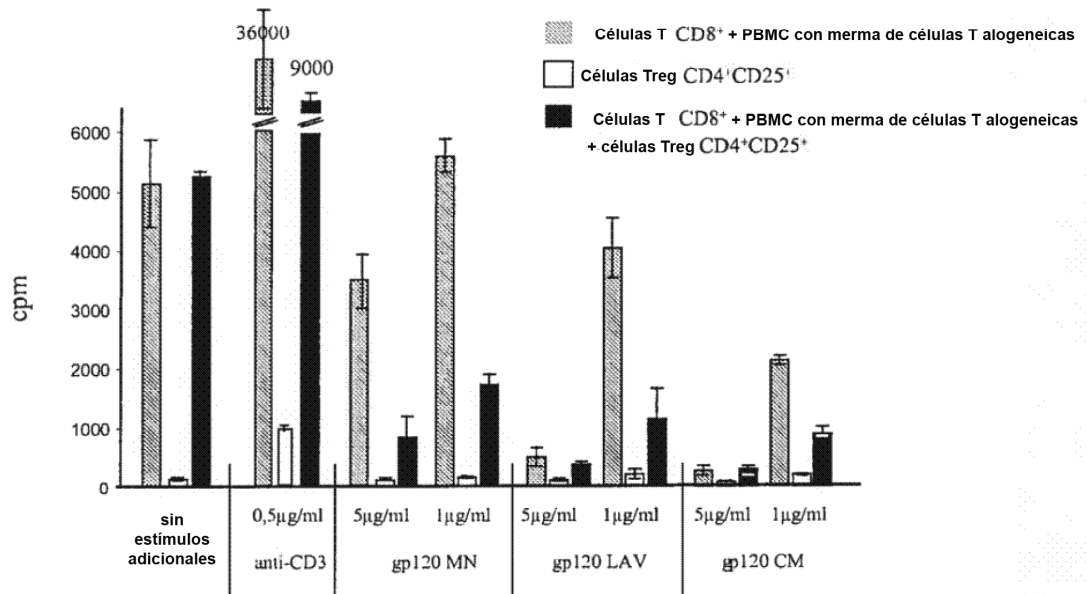


Fig. 2 /5

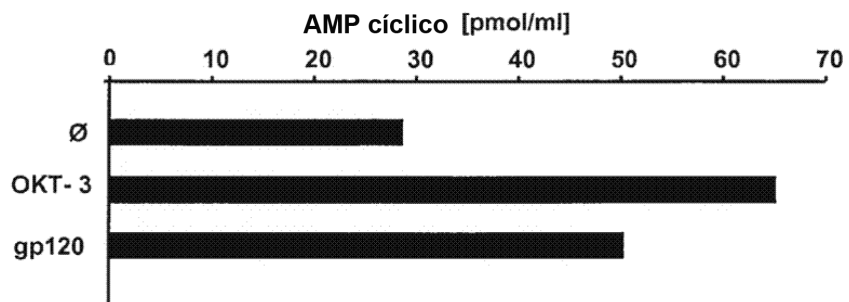


Fig. 3 /5

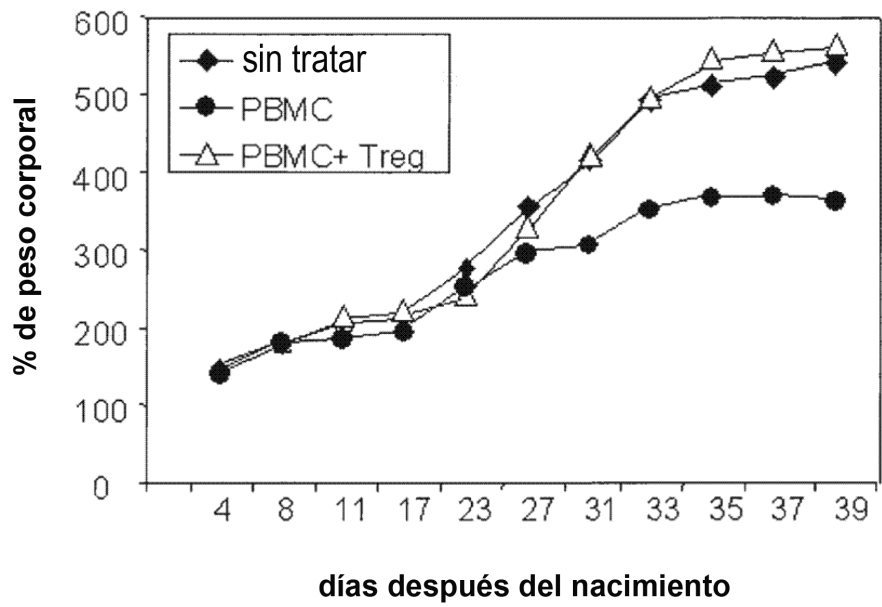


Fig. 4 /5

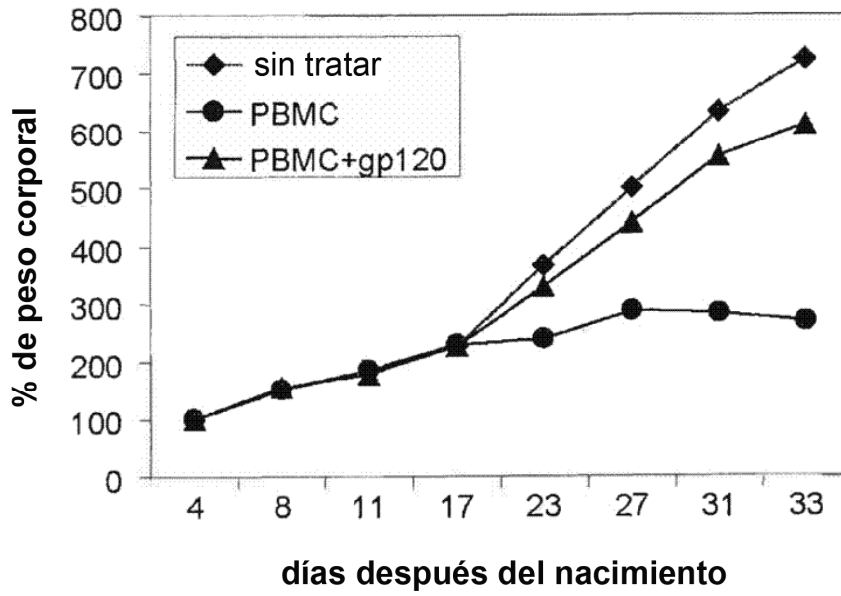


Fig. 5 /5

