



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 789**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05800554 .7**
96 Fecha de presentación : **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1796713**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Utilización de la proteína GILZ para modular la respuesta inmunespecífica de un antígeno.**

30 Prioridad: **10.09.2004 FR 04 09620**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2011

73 Titular/es: **Assistance Publique-Hôpitaux de Paris**
3 avenue Victoria
75004 Paris, FR

72 Inventor/es: **Emilie, Dominique;**
Cohen, Nicolas y
Lemoine, François

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 362 789 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

Utilización de la proteína GILZ para modular la respuesta inmunespecífica de un antígeno

5

La presente invención se relaciona con la utilización de la proteína GILZ o de agentes que modulan los efectos de dicha proteína GILZ expresada en las células dendríticas con el fin, respectivamente, de inducir linfocitos T reguladores/supresores para generar una tolerancia inmunitaria, particularmente en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, inflamatorias, alergias, rechazo de injertos y enfermedad de rechazo de órganos en el huésped, o al contrario de inhibir los linfocitos T reguladores/supresores presentes para romper un estado de tolerancia, particularmente en el tratamiento del cáncer o de infecciones crónicas o para inducir una respuesta inmune eficaz contra un antígeno de vacuna.

10

Las células dendríticas (CD) se describen clásicamente como las mejores células que presentan antígenos a los linfocitos T. En efecto, las células dendríticas son capaces de presentar antígenos péptidicos a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y de clase II (CMH I y CMH II) respectivamente a los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ y de inducir después de la activación una respuesta inmune efectiva. Los datos más recientes indican que bajo el efecto de diferentes factores fisiológicos y/o de agentes farmacológicos, las células dendríticas son, por el contrario, capaces de inhibir la activación de los linfocitos T y así inducir un estado de tolerancia. La tolerancia inmune resulta de dos procesos: la inducción de energía o de la apoptosis de las células de respuesta y la generación de linfocitos T que poseen funciones supresoras (T reguladores/supresores).

15

20

Los linfocitos T reguladores/supresores juegan un papel principal, tanto fisiológicamente como en situaciones patológicas tales como enfermedades autoinmunes, alergias, rechazo de órganos, infecciones crónicas y proliferaciones malignas (Hisaeda et al., Nat. Med. 2004, 10, 29-; Lundgren et al., Infect. Immun., 2003, 71, 1755-; Hasenkrug, Novartis Found. Symp., 2003, 252, 194-; Boyer et al., Blood, 2004, 103, 3428 – 3430; Woo et al., Cancer Res., 2001, 61, 4766-; Sasada et al., Cancer, 2003, 98, 1089-; Wolf et al., Clin. Cancer Res., 2003, 9, 606-; Ichihara et al., Clin. Cancer Res., 2003, 9, 4404; Salomon et al., Immunity, 2000, 12, 431; Takahashi, Curr. Top. Med. Chem., 2003, 3, 693-; Xu et al., J. Immunol; 2003, 170, 394-).

25

30

Hasta ahora se han descrito tres poblaciones de linfocitos T reguladores/supresores: i) las células Th3 que son CD4⁺CD25⁻, producen el *Transforming Growth Factor* beta (TGFβ), de la interleucina (IL)-10 e IL-4 que tiene una acción supresora por un mecanismo que depende del TGFβ (Weiner et al., Immunol. Rev., 2001, 182, 207-); ii) las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) que representan igualmente una baja población CD4⁺, producen el IL-10 y el TGFβ pero utilizan el IL-10 para su diferenciación y su función supresora (Groux, Transplantation, 2003, 75, 85-; Levings et al., J. Exp. Med., 2002, 196, 133) iii) las células CD4⁺CD25^{high} (Treg) cuya acción supresora, se inicia después de una activación específica del antígeno a través del receptor de células T (TCR), se ejerce de manera independiente del antígeno inhibiendo la producción de IL-2, y favoreciendo la detención del ciclo celular de las células CD4⁺ y CD8⁺ por un mecanismo que implica el contacto celular y parcialmente el TGFβ pero no el IL-10 (Sakaguchi et al., Immunol. Rev. 2001, 182, 18-; Shevach, Nat. Rev. Immunol. 2002, 2, 389-).

35

40

Aunque el fenotipo, el perfil de expresión citoquímico y los mecanismos supresores de los linfocitos Th3, Tr1 y Treg hayan sido caracterizados, la interacción de los linfocitos reguladores/supresores con la células dendríticas y el papel de esta interacción en la inducción/inhibición de los linfocitos reguladores/supresores no es bien conocida. Se ha demostrado que el tratamiento de las células dendríticas por corticoides o el IL-10 inducen los linfocitos T para que posean funciones supresoras (Hackstein et al., *précité*; Steinman et al., Ann. Rev. Immunol. 2003, 21, 685 – 711; Ashworth et al., Eur. J. Immunol. 2000, 30, 1233 – 1242; Muller et al., J. Invest. Dermatol., 2002, 119, 836 – 841; Steinbrink et al., Blood., 2002, 99, 2468 – 2476; Akbari et al., Nat. Immunol. 2001, 2, 725 – 731). Sin embargo, no se han identificado los genes capaces de inducir o, al contrario, de inhibir los linfocitos T reguladores específicos del antígeno, que representan objetivos terapéuticos para modular los linfocitos T reguladores/supresores.

45

50

La mejora del conocimiento humano que se relaciona con la inducción y la inhibición de los linfocitos T reguladores/supresores permitirá considerar su utilización terapéutica, bien sea para favorecer o inducir un estado

de tolerancia con miras al tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias o alergias o control de la enfermedad de rechazo de órganos en el huésped o de rechazo de injertos en el marco de trasplantes alogénicos, bien sea al contrario para inducir una mejor respuesta inmune contra un antígeno tumoral, un antígeno responsable de infección crónica o un antígeno para vacunas, inhibiéndolos.

5

El gen que codifica para la proteína GILZ (*Glucocorticoid-Induced Leucina Zipper*) se ha clonado a partir de linfocitos T y de linfocitos murínicos cultivados en presencia de glucocorticoides. La proteína GILZ murina y su homólogo humano corresponden respectivamente a las secuencias SWISSPROT Q9Z2S7 y Q99576 y los ADNc que codifican las dichas proteínas en las secuencias GenBank AF024519 y AF228339. En estas células, la GILZ
 10 inhibe la muerte celular (apoptosis) inducida por la activación del receptor T para el antígeno (D'Adamio et al., *Immunity*, 1997, 7, 803). La GILZ se induce igualmente por los glucocorticoides en los linfocitos B y los macrófagos humanos (Berrebi et al., *BLOOD*, 2003, 101, 729 – 738). En los linfocitos B, la GILZ inhibe la activación por el receptor B para el antígeno (Glynne et al., *Immunol. Rev.*, 2000, 176 -216-). En los macrófagos, la GILZ actúa al menos en parte bloqueando la activación monocitaria inducida por extractos bacterianos (LPS) o activadores de origen linfocitario T (CD40L, IFN-gamma) e inhibe la producción de quimioquinas proinflamatorias y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Berrebi et al., *precitados*). Además, se observa una desregulación de la expresión de GILZ en los macrófagos en los procesos inflamatorios ligados a las reacciones de hipersensibilidad retardada (represión de GILZ durante la enfermedad de Crohn, o de la tuberculosis) y en los tumores (persistencia de la expresión de GILZ en el transcurso de los linfomas de Burkitt). La expresión de GILZ puede ser inducida igualmente
 20 en otros tipos de células, por parte de diferentes estimulantes: aldosterona y vasopresina en células tubulares renales murinas (Robert-Nicoud et al., *P.N.A.S.*, 2001, 98, 2712-), o células mesenquimatosas (Shi et al., *EMBO Rep.*, 2003, 4, 374-).

La regulación de la producción de GILZ incluye sitios de fijación del receptor de glucocorticoides sobre su promotor,
 25 y la presencia de cofactores de la familia de Sonic Hedgehog (Ingram et al., *Oncogene*, 2002, 21, 8196-) o de la familia Forkhead (Asselin-Labat et al., *Blood*, 2004, 104, 215 – 223). Los efectos de GILZ parecen ejercerse sobre varias vías de activación celular: la vía NF-kB (Riccardi et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001, 495, 31-), la vía AP-1 (Mittelstadt et Ashwell, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 29603-), la vía de las MAP quinasas (Ayroldi et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, 7929-).

30

Se ha demostrado particularmente que la proteína GILZ era un inhibidor de la vía de las MAP quinasas capaz de bloquear la transducción de señales mediadas por Raf/Ras, útiles para inhibir la proliferación celular asociada al cáncer, a enfermedades autoinmunes, a patologías inflamatorias y al rechazo de injertos (Solicitud Internacional PCT WO 03/054193).

35

Los inventores han puesto en evidencia nuevas propiedades de la proteína GILZ, ligadas a su expresión en células diferentes a las células precitadas, permitiendo considerar nuevas utilidades de la proteína GILZ.

Los inventores han demostrado que la expresión de GILZ se alcanza en el transcurso de la diferenciación de los
 40 precursores de células dendríticas (CD34+ o monocitos) en células dendríticas inmaduras (iMDDC) y que la activación de las células dendríticas por el CD40L, que permite su maduración no restaura esta producción. Sin embargo, la inducción de la expresión de GILZ en las células dendríticas inmaduras (iMDDC) o maduras (MDDC) privilegia las funciones de tolerancia de las células dendríticas e inhibe sus funciones inmunoestimulantes. La acción de tolerancia de GILZ se ejerce mediante la inducción de linfocitos T supresores específicos de antígeno y la
 45 producción de GILZ por las células dendríticas es indispensable para que sus células generen linfocitos T supresores.

Así, la modulación de la producción o de la función de la proteína GILZ en las células dendríticas durante la presentación del antígeno, por sus efectos en la génesis de los linfocitos T supresores, permite dictaminar la calidad
 50 de la respuesta a este antígeno.

La manifestación de la acción de la proteína GILZ en las células que presentan antígenos y de su efecto en la inducción de linfocitos T reguladores/supresores, permite considerar la utilización de la GILZ (proteína, fragmento

péptido funcional o ADNc que corresponden incluso con un vector recombinante de expresión) o de un modulador de GILZ (activador o inhibidor), para modular la respuesta inmune específica de un antígeno. La utilización de la GILZ y/o de un activador de GILZ aislados o expresados en células dendríticas modificadas por el ADNc o la proteína correspondiente, permite inducir una tolerancia a este antígeno, con miras al tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, de alergias o de control de la enfermedad de rechazo de órganos en el huésped en el marco de trasplantes alogénicos. La utilización de un inhibidor de GILZ, aislado o expresado en células dendríticas modificadas por el ADNc o la proteína correspondiente, permite por el contrario inhibir los linfocitos T reguladores/supresores presentes para romper un estado de tolerancia, particularmente en el tratamiento de cáncer o de infecciones crónicas o de inducir una respuesta inmune eficaz contra un antígeno tumoral o un antígeno de un patógeno, en el marco de una vacunación antitumoral o antiinfecciosa.

La presente invención tiene por objeto, en consecuencia, la utilización de al menos: a) una proteína GILZ o un vector recombinante de expresión de la dicha proteína, aislados o expresados en células dendríticas modificadas, y b) un antígeno seleccionado del grupo constituido por: un autoantígeno, un alérgeno, un antígeno implicado en una enfermedad inflamatoria crónica o un antígeno de trasplante, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, alergias, rechazos de injerto y de la enfermedad de rechazo de órganos en el huésped.

Definiciones

Se entiende por "proteína GILZ", una proteína GILZ de cualquier mamífero. La proteína GILZ humana y su homólogo murínico corresponden respectivamente a las secuencias SWISSPROT Q99576 y Q9Z2S7 y los ADNc que codifican las dichas proteínas en las secuencias GenBank AF228339 y AF024519. La secuencia de la proteína GILZ de otros mamíferos puede ser determinada por clonación del ADNc correspondiente, con la ayuda de cebadores escogidos a partir de secuencias humanas y murínicas, según técnicas clásicas de biología molecular, conocidas por el experto en la técnica.

Se entiende por "gen GILZ", el gen que codifica para la proteína GILZ.

Se entiende por "proteína GILZ funcional o fragmento funcional de la proteína GILZ", una proteína o un péptido de al menos 5 aminoácidos consecutivos de GILZ que, cuando se expresa en células que presentan el antígeno, es capaz de generar células T reguladoras/supresoras específicas del antígeno. En la Solicitud WO 03/054193 se describen particularmente fragmentos de la proteína GILZ. La funcionalidad de una proteína o de un péptido GILZ tal como se definió anteriormente puede evaluarse por la manifestación de la inhibición de la proliferación de células T CD4⁺ y/o T CD8⁺ específicas del antígeno en presencia de células que presentan antígenos autólogos.

Se entiende por "modulador de GILZ", un activador o un inhibidor de GILZ.

Se entiende por "activador de GILZ", un inductor o un activador de la expresión del gen GILZ o un activador de la función de la proteína GILZ. El dicho inductor o activador de la expresión del gen GILZ puede tratarse, ya sea directamente estimulando la expresión de GILZ, ya sea indirectamente bloqueando la acción de inhibidores de esta expresión. El dicho activador de la función de la proteína GILZ es particularmente un cofactor de GILZ, una sustancia que actúa en la fosforilación, glicosilación o acilación de GILZ, o bien una sustancia que interfiere con la síntesis o la función de un cofactor de GILZ.

Se entiende por "inhibidor de GILZ", un inhibidor de la expresión del gen GILZ o un inhibidor de la función de la proteína GILZ; el dicho inhibidor de la expresión del gen GILZ puede tratarse, ya sea directamente, ya sea indirectamente bloqueando la acción de inductores o de activadores de esta expresión.

Se entiende por "transcrito GILZ", el ARNm que codifica para la proteína GILZ.

Se entiende por "células dendríticas modificadas" las células dendríticas, preferiblemente autólogas, en las cuales una proteína GILZ exógena, un fragmento funcional de al menos 5 aminoácidos consecutivos de la dicha proteína,

un modulador de GILZ o un vector recombinante de expresión de la dicha proteína, del dicho fragmento o del dicho modulador de GILZ, se han introducido por cualquier medio, conocido por sí mismo, que permite introducir una sustancia en una célula objetivo.

- 5 Se entiende por molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas, cualquier molécula conocida en sí misma, que permite introducir específicamente una sustancia en las células dendríticas. A título de ejemplo no limitativo se pueden citar particularmente los péptidos de la membrana, lípidos, ligandos de un receptor de la membrana o de un antígeno de superficie de las células dendríticas, particularmente de los péptidos, y de los anticuerpos dirigidos contra : DC-SIGN, CD40, DEC-205, langerina, el receptor para la manosa o los “receptores consumidores” (o receptores de depuración). El receptor de la membrana DEC-205 se describe particularmente en Bonifaz et al., J. Exp. Med. 2004, 199, 815 – 824.

15 La invención describe proteínas GILZ modificadas, particularmente las variantes de GILZ y los fragmentos de al menos cinco aminoácidos consecutivos de las dichas proteínas que corresponden a una proteína o a un péptido GILZ funcionales tales como se definió anteriormente. Las modificaciones que se introducen en la proteína o el péptido GILZ por las técnicas clásicas conocidas por el experto en la técnica incluyen de manera no limitativa: mutación (inserción, eliminación, sustitución) de al menos un aminoácido en la secuencia de GILZ (obtención de variantes de GILZ), adición de una secuencia de fusión (obtención de una proteína de fusión), sustitución de residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos no naturales (aminoácidos D o análogos de aminoácidos), modificación de la unión péptidica, ciclización, adición de grupos químicos al nivel de las cadenas laterales de los aminoácidos, acoplamiento con una molécula de interés, particularmente una molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas tal como se definió anteriormente; el dicho acoplamiento se realiza por intermedio de una unión covalente o no covalente tal como una unión péptidica, particularmente cuando la proteína GILZ, un fragmento de la dicha proteína o un modulador de GILZ, de naturaleza proteica, se utilizan con un ligando péptidico de un receptor de la membrana o de un antígeno de superficie de las células dendríticas (obtención de una proteína o de un péptido GILZ químicos).

30 Los moduladores de GILZ comprenden particularmente: hormonas gluco- o mineralo-corticoides (o sus derivados); hormonas sexuales (estrógeno, progesterona, andrógeno o sus derivados); citoquinas como el IL-10, IL-4, IL-13, el TGF beta o sus derivados que actúan sobre su receptor; la vitamina D y sus análogos; las quimioquinas naturales y sus variantes, ligandos de receptores tales como el receptor CCR5; proteínas recombinantes, derivadas por ejemplo de CTLA4 de LAG-3; inmunoglobulinas, policlonales no específicas o monoclonales; HLA-G y sus formas solubles, naturales o recombinantes; sustancias que actúan sobre los receptores para los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas; sustancias que interfieren con la función de los receptores similares a Toll (TLR), de CD36, de CD46, de los receptores del complemento, de los “receptores consumidores” (o receptores de depuración, como Lox-1 y MARCO), del receptor de manosa, de DC-SIGN, y del receptor para la fosfatidil serina. Puede tratarse igualmente de sustancias que interfieren con la producción o la función de mediadores intracelulares, y en particular las quinasas akt, PI3K, y las fosfatasas PTEN, SHP y SHIP, las proteínas de la familia Forkhead, de la familia Smad, de la familia STAT (y en particular STAT 3). Puede incluso tratarse de fármacos inmunosupresores como ciclosporina, KF506, rapamicina, metotrexato, micopenaloato, azatioprina. Puede tratarse de sustancias derivadas de agentes infecciosos, en particular de *Plasmodium falciparum*, *Leishmania*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Toxoplasma dondii*, de *Tripanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Porphyromonas gingivalis*, de proteínas virales provenientes de VIH (como vpr, gp 41, gp120 y gp 160), virus de hepatitis B o virus de hepatitis C, virus del herpes y virus de la viruela.

45 El antígeno que se utiliza está particularmente bajo la forma de una preparación antigénica, preparada particularmente a partir de células de un antígeno aislado (proteína, péptido o derivado u otro) o bien de un vector recombinante de expresión del dicho antígeno.

- 50 El antígeno que se utiliza para inducir una tolerancia inmune se escoge entre los antígenos que se han identificado como responsables de la patología que se va a tratar, a saber, de manera no limitativa:
- autoantígenos implicados en enfermedades autoinmunes tales como: tiroiditis, diabetes, esclerosis múltiple, neuropatía periférica, enfermedad celíaca, síndrome de Goodpasture, polimiocito y

dermatomiocito, policondrito atrofiante, síndrome de antifosfolípidos, vascularitis, gastritis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombopénica autoinmune, hepatitis autoinmune, fenfigos y fenfigoides, vitiligo, miastenia, hemofilia, edema angioneurótico autoinmune. Se trata particularmente de los siguientes autoantígenos: membrana basal, receptores de la TSH, de acetilcolina, beta2-glicoprotina 1, C1-inactivador, desmosomas y hemidesmosomas, factor intrínseco, gangliósidos, insulina y proinsulina, glutamato descarboxilasa (GAD), *antígeno islote 2* (IA2), glicoproteína asociada con la mielina (MAG) y proteína básica de la mielina, tirosinasa, protrombina, canales cálcicos o potásicos, tiroperoxidasa, tireoglobulina y gliadina.

- alérgenos: polen (pólenes de hierbas y de cereales (*Phleum pratense*, *Zea mays*, *Secale cereale*, *Avena sativa*, *Anthoxanthum odoratum*, *Poa pratensis*, *Phragmites australis*, *Trilicum sativum*, *Lolium perenne*)), veneno de himenóptero (Api m1 y m2; Fosfolipasa A2 y hialuronidasa de *Apis mellifera*; Ves v 1, ves m 1, Pol a 1, Ves v 2, Ves m 2, Pol a 2 (fosfolipasa A1 e hialuronidasa *devespula vulgaris*, *ger manica* o *yellow jacket*)), ácaros (*Der p 1*, *Der p 2*, *Der f 1*), pelo de gato (*Fel d 1*) cacahuete (*Ara h 1*, 2 y 3), agentes infecciosos como *Aspergillus fumigatus*, abedul, olivo, harina, látex (*Hev b1* a 11), bacalao (*gad c 1*), crustáceos y gambas (*Pen a 1*), huevo, leche de vaca, y las proteínas recombinantes correspondientes a estos alérgenos.

- antígenos implicados en enfermedades inflamatorias crónicas tales como: psoriasis, poliartritis reumatoide y enfermedades inflamatorias del tubo digestivo.

- antígenos de trasplante implicados en el rechazo de injertos y la enfermedad de rechazo de órganos en huésped tales como, particularmente, los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CMH o HLA en el hombre) y los antígenos menores de histocompatibilidad.

El antígeno que se utiliza para inducir una inmunoestimulación se escoge entre cualquier antígeno de interés para vacunas. Se trata en particular de un antígeno tumoral o un antígeno de un agente patógeno responsable de infección aguda o crónica, conocido en sí mismo. De manera no limitativa, se pueden citar en particular los antígenos de melanoma (Melan-A, Marti, tirosinasa), tumor epitelial (Her2neu), virus (VIH, VIS, virus de la hepatitis B y C), *Plasmodium*, de micobacterias.

Los vectores en los cuales se puede insertar una secuencia de interés en un casete de expresión que contiene los elementos reguladores de transcripción y de traducción apropiados son conocidos por el experto en la técnica. Estos vectores son construidos por los métodos clásicos de ADN recombinante y de índole genética, que son conocidos en sí mismos. Numerosos vectores en los cuales se puede insertar una molécula de ácido nucleico de interés con el fin de introducir y de mantener en una célula huésped eucariota son conocidos en sí mismos; la selección de un vector apropiado depende de la utilización considerada para este vector (por ejemplo replicación de la secuencia de interés, expresión de esta secuencia, mantenimiento de la secuencia bajo forma extracromosómica o bien integración en el material cromosómico del huésped). Se pueden utilizar entre otros los ácidos nucleicos desnudos (ADN, ARN, lineal o circular), particularmente los plásmidos, y los vectores virales tales como los adenovirus, los retrovirus, los lentivirus y los AAV (Virus Adeno-Asociados-), los virus de viruela, y en particular la viruela del canario, los virus de herpes y el virus West-Nile.

Se describe igualmente una utilización, en la cual a) es un inhibidor de GILZ o un vector recombinante de expresión del precedente, aislado o expresado en células dendríticas modificadas, y el dicho antígeno definido en b) es un antígeno de interés para vacunas tal como un antígeno tumoral o un antígeno de un microorganismo patógeno tal como se definió anteriormente.

Se obtiene así una vacuna destinada a la prevención y/o tratamiento de las patologías tumorales de infecciones, que es particularmente eficaz en la medida en que la respuesta contra el antígeno para vacunas se potencie debido a las propiedades inmunoestimulantes del dicho inhibidor de GILZ, que son específicas del antígeno para vacunas. En efecto, el dicho inhibidor induce una respuesta inmune eficaz contra el antígeno que inhibe la producción a la función de linfocitos T reguladores/supresores específicos del antígeno.

Una respuesta inmune eficaz, que no genera linfocitos T supresores o inhibe su función, puede ser inducida en terapia con vacunas, preventiva o curativa, con el fin de mejorar la inmunogenicidad de las preparaciones

antigénicas, por ejemplo para las vacunaciones antiinfecciosas ya existentes (hepatitis B) o por identificar (hepatitis C, VIH). Esta posibilidad de acrecentar la inmunogenicidad de las vacunas es particularmente interesante en caso de baja inmunogenicidad de la preparación para vacunas o en caso de déficit inmunitario del sujeto que se va a vacunar (déficit inmunitario congénito, insuficiencia renal crónica, sujeto envejecido, infección por VIH, paludismo, rubeola).

La mejora de la inmunogenicidad es igualmente un objetivo importante en el marco de las vacunas antitumorales, en asociación con aproximaciones de terapia celular (vacunación por células dendríticas presentes en antígenos tumorales, generación ex-vivo de linfocitos citotóxicos antitumorales) o de vacunación por inyección de extractos tumorales o de antígenos tumorales caracterizados.

Otra aplicación se refiere a la activación directa del sistema inmunitario del sujeto en el caso en el cual es insuficiente su respuesta espontánea contra uno o varios antígenos, explicándose esta insuficiencia de respuesta por un exceso de linfocitos T supresores o no. Por ejemplo, en el caso de una respuesta antitumoral, de una infección crónica como la hepatitis viral crónica, infección por el VIH, infecciones por virus herpes, lepra, leishmaniasis y paludismo.

Según una disposición ventajosa de este modo de realización, el dicho inhibidor es un ARN pequeño interferente (siARN) que direcciona el transcrito GILZ o un oligodesoxinucleótido antisentido complementario del dicho transcrito. Preferiblemente, se trata de un siARN. A título de ejemplo no limitativo, se puede citar el siARN que corresponde a la secuencia SEQ ID NO : 1.

Los vectores particularmente bien adaptados a la expresión estable de los siARN, son particularmente aquellos descritos en T.R. Brummelkamp et al., Science, 2002, 296, 550 – 553.

Según otra disposición ventajosa de este modo de realización, el dicho inhibidor es un antagonista de GILZ seleccionado del grupo constituido por: un antagonista de la quinasa akt o un activador de la dicha quinasa tal como la quimioquina RANTES.

Los antagonistas de la quinasa akt se describen particularmente en Asselin – Labat et al., precitado.

Mediante el uso de la invención, se obtiene un medicamento destinado para la prevención y/o al tratamiento de las enfermedades autoinmunes, inflamatorias, alergias, rechazo a injertos y de la enfermedad del rechazo de órganos en el huésped.

Un tal medicamento induce la expresión de GILZ *in vivo* en las células dendríticas y genera linfocitos T reguladores/supresores específicos del antígeno inductor de una tolerancia inmuno-específica del antígeno. Estos linfocitos T supresores específicos del antígeno tienen un interés terapéutico en el curso de las patologías caracterizadas por un exceso de respuesta inmune, y para las cuales se identifica el antígeno iniciador. Es este el caso por ejemplo del trasplante alogénico o xenogénico de órganos o de células madre, de enfermedades autoinmunes (tiroiditis, diabetes, esclerosis múltiple, neuropatía periférica, enfermedad celíaca), enfermedades inflamatorias crónicas (psoriasis, poliartritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del tubo digestivo) o de alergia. Este efecto terapéutico puede ser preventivo o curativo. Por ejemplo, en trasplante de órganos, los linfocitos T derivados del receptor y supresores de una respuesta contra el donante pueden prevenir o curar el rechazo del órgano. Los linfocitos T derivados del donador y supresores de una respuesta contra el receptor pueden prevenir o curar una reacción de rechazo del órgano en el huésped. En el caso de alergias, particularmente a los venenos de himenóptero, a los cacahuets, asma u otras enfermedades alérgicas, los linfocitos T supresores de la alergia pueden prevenir las manifestaciones alérgicas, correspondiendo la generación de tales linfocitos T supresores a nueva aproximación de desensibilización contra la alergia. Esta estrategia puede adaptarse en función del descubrimiento de nuevos antígenos, particularmente de nuevos autoantígenos.

Según una disposición ventajosa de este modo de realización, la dicha proteína GILZ definida en a) es la proteína humana.

Se describe igualmente un activador de GILZ, que puede ser un inductor de la expresión del gen GILZ seleccionado del grupo constituido por: dexametasona, IL-10 y TGFβ.

5 Según otra disposición ventajosa de este modo de realización, el dicho antígeno definido en b) se selecciona del grupo constituido por: *Phleum pratense*, *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p 1*, *Der p 2*) y *farinae* (*Der f 1*), un antígeno de látex (*Hev b 1 a 11*), pro-insulina, MAG, tiroperoxidasa y tireoglobulina.

10 Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, la dicha molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas es un ligando de un receptor o de un antígeno de la membrana seleccionado del grupo constituido por: DC-SIGN, CD40, DEC-205, langerina, el receptor para la manosa y un receptor de depuración. El dicho ligando es particularmente un péptido.

15 Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, la dicha molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas es un anticuerpo dirigido contra un receptor o un antígeno de la membrana seleccionado del grupo constituido por: DC-SIGN, CD40, DEC-205, langerina, el receptor para la manosa y un receptor de depuración.

20 Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, el dicho vector definido en a) comprende un casete de expresión que incluye un promotor de un gen expresado de manera específica o preferencial en las células dendríticas. Preferiblemente, el dicho promotor es el de un gen que codifica para una proteína seleccionada del grupo constituido por: DC-SIGN, CD11c, una molécula del complejo principal de histocompatibilidad y la langerina.

25 Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, el dicho vector de expresión definido en a) es un lentivirus.

30 Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, la dicha proteína GILZ y el dicho fragmento están bajo la forma de una proteína o de un péptido quiméricos que incluyen la secuencia del dicho péptido que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de la células dendríticas y/o la secuencia del dicho antígeno de interés definido en b).

Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, el dicho vector recombinante de expresión definido en a) codifica para una proteína GILZ o un fragmento de GILZ quiméricos tales como se definió anteriormente.

35 Según otro modo de realización ventajoso de la dicha utilización, el dicho antígeno definido en b) se carga sobre las dichas células dendríticas modificadas o presentadas por las dichas células definidas en a).

40 La presente invención tiene igualmente por objeto un medicamento que comprende al menos células dendríticas modificadas por una molécula seleccionada del grupo constituido por: una proteína GILZ, un vector recombinante de expresión de la dicha proteína tal como se definió más arriba.

45 Según otro modo de realización ventajoso del dicho medicamento, comprende un antígeno tal como se definió más arriba, preferiblemente el dicho antígeno se carga sobre las dichas células dendríticas o es presentado por las dichas células.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de células dendríticas modificadas tal como se definió anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o el tratamiento de enfermedades tal como se definió más arriba.

50 Las células dendríticas son células dendríticas maduras o inmaduras, preferiblemente autólogas, preparadas según las técnicas de purificación y de cultivo celular conocidas por el experto en la técnica. Pueden ser aisladas a partir de monocitos sanguíneos o de células CD34⁺, derivadas de sangre de cordón umbilical, de médula ósea o de sangre periférica.

Para obtener células dendríticas modificadas, las dichas sustancias se introducen en las dichas células utilizando los métodos clásicos conocidos por sí mismos: difusión pasiva, electroporación, microinyección, asociación con todas las sustancias que permiten el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de la células dendríticas (péptidos de la membrana, transportadores como los nanotransportadores, liposomas, nanopartículas, lípidos, polímeros catiónicos, ligandos, particularmente péptidos y anticuerpos específicos de los antígenos y receptores de las membranas de superficie tales como se definió anteriormente). Además, se puede, ventajosamente, combinar métodos, utilizando por ejemplo la electroporación asociada con los liposomas.

Ventajosamente, las dichas sustancias están acopladas con una molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas, particularmente bajo la forma de una proteína o de un péptido quimérico o de un vector recombinante que codifica para la dicha proteína o el dicho péptido quimérico.

Según un modo de realización ventajoso del dicho medicamento, este comprende una proteína o un péptido GILZ quiméricos tales como se define en lo anotado anteriormente.

Según otro modo de realización ventajoso del dicho medicamento, este comprende uno o varios vectores recombinantes de expresión que codifican para la dicha proteína GILZ y el dicho antígeno y/o la dicha molécula definidos en b).

Según otro modo de realización ventajoso del dicho medicamento, este comprende un vector recombinante que codifica para una proteína o un péptido GILZ quiméricos tales como se definió más arriba.

Conforme a la invención los medicamentos tal como se definió más arriba pueden estar bajo la forma de una composición única que comprende al menos una o varias sustancias definidas en a) y uno o varios antígenos y/o moléculas de direccionamiento y/o de paso de la membrana plásmica de las células dendríticas definidas en b). Alternativamente, pueden estar bajo la forma de una preparación combinada, en la cual la o las dichas sustancias definidas en a) y el o los dichos antígenos y/o molécula de direccionamiento y/o de paso de la membrana plásmica de las células dendríticas se utilizan de manera separada o escalonada en el tiempo.

Los medicamentos tal como se definen en la presente invención (proteína GILZ, o vector recombinante aislado) pueden ser introducidos *in vivo* en las células objetivo (células dendríticas), ya sea por difusión pasiva, ya sea utilizando métodos físicos tales como la electroporación o la microinyección, ya sea asociando cualquier sustancia que permita el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de células dendríticas. Entre las sustancias que permiten el paso de la membrana plásmica, se pueden citar particularmente péptidos de la membrana, transportadores tales como los nanotransportadores, liposomas de nanopartículas, lípidos o polímeros catiónicos. Entre las sustancias que permiten el direccionamiento de la membrana plásmica de las células dendríticas se pueden citar particularmente los ligandos, particularmente los péptidos y los anticuerpos específicos de los antígenos o de los receptores de la membrana de superficie tales como los definidos anteriormente. Además, se puede, ventajosamente, combinar métodos utilizando por ejemplo la electroporación asociada a liposomas.

Los medicamentos tal como se define en la presente invención pueden ser administrados de forma particular directamente en el nivel de su sitio de acción, por ejemplo en el interior de un tumor, de un órgano linfóide, o en el sitio de administración de un antígeno para vacunas. Alternativamente, pueden ser integrados en un liposoma o una nanopartícula, recubiertos con un ligando o con un anticuerpo monoclonal específico de un antígeno o de un receptor de la membrana de superficie de células dendríticas tales como las definidas más arriba, de manera que sean capturados por una célula dendrítica.

La posología varía en función de la afección que se va a tratar, de la vía y del ritmo de administración, así como de la naturaleza y del peso de la especie que se va a tratar (humana o animal). El producto según la invención se utiliza por vía digestiva (oral, sublingual), parenteral, local o *intra-site*. Puede presentarse bajo la forma de comprimidos, simples o en forma de grageas, cápsulas, gránulos, jarabe, supositorios, preparaciones inyectables, pomadas, cremas, geles, aerosoles, los cuales se preparan según los métodos usuales. En estas formas galénicas, el producto

se incorpora a los excipientes habitualmente empleados en composiciones farmacéuticas, tales como talco, goma arábica, lactosa, almidón, estearato de magnesio, manteca de cacao, vehículos acuosos o no acuosos, cuerpos grasos de origen animal o vegetal, derivados parafínicos, glicoles, diversos agentes humectantes, dispersantes o emulsificantes y conservantes.

5 La presente invención tiene igualmente por objeto, un procedimiento de inducción de linfocitos T supresores/reguladores *in vivo*, a partir de una muestra de tejido que contiene células T CD4⁺ y/o CD8⁺, caracterizada por que comprende al menos:

10 a1) la preparación de células dendríticas autólogas que expresan la proteína GILZ, y, de manera simultánea o secuencial,
b1) la incubación de las dichas células dendríticas definidas en a1) con un antígeno tal como se define más arriba y la dicha muestra de tejido que contiene las dichas células T CD4⁺ o CD8⁺.

15 Las células dendríticas que expresan la proteína GILZ, son células dendríticas autólogas maduras o inmaduras tratadas con un activador de GILZ tal como se define anteriormente o bien modificadas por una proteína GILZ, un fragmento de esta proteína o un vector de expresión de los precedentes tal como se define más arriba; se preparan como se precisa más arriba.

20 El procedimiento según la invención es útil para preparar linfocitos T supresores/reguladores *in vitro*, a partir de una muestra de tejido que contiene células T CD4⁺ y/o CD8⁺, proveniente de un paciente que se va a tratar o de un donante en caso de trasplante.

25 La dicha muestra de tejido puede ser de sangre periférica, un tumor, de la médula ósea o cualquier otro tejido, particularmente un tejido que se va a trasplantar.

La dicha muestra de tejido puede cultivarse eventualmente, previamente a la etapa b) de incubación.

30 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de linfocitos T reguladores/supresores susceptibles de ser obtenidos por el procedimiento de inducción tal como se define más arriba, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades autoinmunes, alergias, rechazo de injertos y de la enfermedad de rechazo de órganos en el huésped.

35 La presente invención tiene igualmente por objeto, un procedimiento de inhibición de linfocitos T supresores/reguladores *in vitro*, a partir de una muestra de tejido que contiene células T CD4⁺ y/o CD8⁺, caracterizada por que comprende al menos :

40 a2) la preparación de células dendríticas autólogas en las cuales se inhibe la proteína GILZ y, de manera simultánea o secuencial,
b2) la incubación de las dichas células dendríticas definidas en a2) con un antígeno tal como se define más arriba y la dicha muestra de tejido que contiene células T CD4⁺ y/o CD8⁺.

45 Las células dendríticas en las cuales se inhibe la expresión de la proteína GILZ, son células dendríticas autólogas maduras o inmaduras tratadas o modificadas por un inhibidor de GILZ tal como se define más arriba, particularmente un ARN pequeño interferente (siARN) o un oligodesoxinucleótido antisentido complementario del transcrito GILZ como un vector de expresión de los precedentes o un antagonista de GILZ; se preparan como se precisa más arriba.

50 El procedimiento según la invención es útil para inhibir la función de linfocitos T supresores/reguladores *in vitro*, a partir de una muestra de tejido tal como se define anteriormente, que contiene las dichas células, provenientes de un paciente que se va a tratar.

La presente invención tiene igualmente por objeto, la utilización de linfocitos T reguladores/supresores susceptibles de ser obtenidos por el procedimiento de inhibición tal como se definió anteriormente, para la preparación de un

medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de las patologías tumorales y de enfermedades infecciosas.

Según un modo de empleo que favorece los dichos procedimientos, estos comprenden una etapa suplementaria de purificación de la población de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que resultan de la etapa b1) o b2) y eventualmente de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que corresponde a los linfocitos T reguladores/supresores con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie apropiados (anti-CD25 o anti-GITR, por ejemplo).

Además de las disposiciones que preceden, la invención comprende incluso otras disposiciones, que surgirán de la descripción que viene a continuación que se refiere a ejemplos de utilización del procedimiento objeto de la presente invención con referencia a los dibujos anexos en los cuales :

- la figura 1 ilustra la producción de GILZ por las células dendríticas (CD). a) Análisis por RT – PCR cuantitativo de la expresión del gen GILZ en células dendríticas tratadas – por adición en el medio de cultivo de dexametasona (Dex (◆), o de IL-10 (□) o de TGFβ (▲) al quinto día de cultivo (J5) y de CD40 ligando (CD40L), al séptimo día (J7). Los valores expresados en unidades arbitrarias (AU) que corresponden al promedio ± desviación de 3 a 6 experimentos independientes. b) Análisis por citometría de flujo de la producción de la proteína GILZ en las células dendríticas no tratadas (-) o tratadas con las dexametasona sola (DEX) o con ARN pequeño interferente (siARN) control (DEX + siARN de control) o direccionante GILZ (DEX + siARN GILZ). La curva () representa el marcaje con el anticuerpo policlonal anti-GILZ y el anticuerpo secundario (anticuerpos antiisotípicos) acoplados a la ficoeritrina. La curva (*) representa el marcaje con el anticuerpo controlado antiisotípico solo.

- la figura 2 ilustra el efecto de la inhibición de la expresión de GILZ en las células dendríticas. Las células dendríticas maduras derivadas de monocitos (MD-DC) se trataron al quinto día de cultivo (J5) con un siARN de control y un siARN direccionante GILZ (siARN GILZ) solo, o bien con, ya sea la dexametasona (DEX), ya sea el IL-10, o no fueron tratadas.

a : El CD40L se ajusta en J7 y el fenotipo de las células dendríticas se analiza en J9. Los resultados corresponden a una experimento representativo de 3 experimentos independientes.

b : El CD40L se ajusta en J7 y la producción de las quimioquinas CCL3, CCL5 y CXCL8 se analiza en J9. Los resultados correspondientes a la media ± desviación de 3 experimentos independientes, expresados bajo la forma de porcentaje con respecto a las células dendríticas controladas no tratadas. Las barras blancas corresponden a las células dendríticas transfectadas por siARN de control mientras que las barras negras corresponden a las células dendríticas transfectadas por el siARN-GILZ.

c : El antígeno de llamada PPD (proteínas estándar purificadas de *Mycobacterium tuberculosis*) se añade en J7 y los linfocitos T CD4⁺ autólogos en J9. La proliferación de los linfocitos T CD4⁺ autólogos se analiza en J14 (un experimento representativo de 3 experimentos independientes). No se observa ninguna proliferación en ausencia de PPD.

- La figura 3 ilustra los efectos de GILZ en las células dendríticas. Las células dendríticas maduras (MDDC) se transducen mediante un vector vacío (pcDNA3) o un vector recombinante que codifica para la proteína GILZ (pGILZ) y luego son estimulados por el CD40L. El fenotipo de las células dendríticas se analiza a continuación por citometría de flujo. Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes.

- La figura 4 ilustra los efectos de la expresión de GILZ en la inducción de linfocitos T reguladores.

a y b : El efecto de los linfocitos T CD4⁺ estimulado por células dendríticas cargadas con el antígeno de llamada PPD y tratadas con dexametasona y un siARN de control (◆) o anti GILZ (O) se ha probado sobre una respuesta proliferativa anti-PPD (a) o anti – CMV (b). Los valores expresados en porcentaje con respecto a los linfocitos T CD4⁺ control (simulados por células dendríticas no tratadas) corresponden a la media ± desviación de 3 experimentos independientes.

c : Las células que presentan antígenos circulantes aislados antes de o 48 horas después del inicio del tratamiento por un glucocorticoide, se tratan con un siARN de control (◆) o un anti GILZ (O), cargados

con el antígeno PPD y se utilizan para activar linfocitos T CD4⁺ autólogos. Estos linfocitos se ajustan en número creciente a los PBMC autólogos simulados por el antígeno PPD. Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes.

5 Ejemplo 1: Manifestación de la expresión de GILZ en las células dendríticas

1) Materiales y métodos

10 a) Purificación y cultivo de células dendríticas

10 Las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos (MDDCs) se preparan como se describe en Palucka et al., J. Immunol., 1998, 160, 4587 – 4595, con la exclusión de modificaciones menores. En resumen, los monocitos humanos se aíslan a partir de la fracción de células mononucleadas de sangre periférica por selección negativa, según las recomendaciones del fabricante (DYNAL). Los monocitos (1 a 2. 10⁵ células/ml) se cultivaron durante 7 días en presencia de GM-CSF y de IL-4 (100 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente, SCHERING-PLOUGH). La maduración de las células dendríticas (MDDCs) se indujo en presencia de CD40L (250 ng/ml; IMMUNEX). La dexametasona (DEX, SIGMA), el IL-10 recombinante humano (rhIL-10, DNAX) y el TGFβ (R&D) se utilizaron en las concentraciones respectivas siguientes: 10⁻⁷ M, 100 ng/ml y 20 ng/ml. Para los experimentos *in vivo*, las células que presentan el antígeno (APC) se purificaron con la ayuda de un kit de selección negativo de monocitos, según las recomendaciones del fabricante (DYNAL).

b) Análisis de la expresión de GILZ

25 La expresión del gen GILZ humano se analiza por RT-PCR en tiempo real según las recomendaciones del fabricante (LightcyclerTM, ROCHE), utilizando la pareja de cebadores descritos en Berrebi et al., BLOOD, 2003, 101, 729 – 738 y el gen humano de la β actina como control interno.

30 La expresión de la proteína GILZ humana se analizó por citometría de flujo intracelular con la ayuda de un anticuerpo policlonal anti GILZ descrito en Asselin-Labat et al., (BLOOD, 2004, 104 – 215-) y de un anticuerpo secundario acoplado a la ficoeritrina (BD PHARMINGEN).

c) siARNs y transfecciones

35 Los siARNs se sintetizaron por MWG Biotec. El siARN que direcciona GILZ (siARN GILZ) presenta la secuencia 5' – AGUCCAGGAUUUAGCCCCdTdT-3' (SEQ ID NO: 1). El siARN de control, constituido por nucleótidos escogidos al azar, corresponde a un siARN no relevante que no presenta especificidad conocida (5' – ACG GGG GGC CCU UAA AAC AdTdT3' SEQ ID NO: 2).

40 La transfección de los siARNs se realiza 48 horas antes del final del cultivo de los IMDDC, con la ayuda del kit Jetsi endo transfección kitTM (Q-BIO GENE), según las recomendaciones del fabricante.

2) Resultados

45 La expresión del gen GILZ en el transcurso de la diferenciación de las células dendríticas derivadas de los monocitos (MDDC) se analizó por RT-PCR (figura 1 a).

50 El gen GILZ se expresa en los monocitos recién aislados pero son expresiones que desaparecen después de 5 días de cultivo en presencia de GM-CSF y de IL-4 y permanece indetectable después de la inducción de la maduración de las células dendríticas por el CD40L (figura 1 a).

La adición de la dexametasona (Dex), del IL-10 o de TGFβ al quinto día del cultivo estimula la expresión de GILZ que se detecta antes y después del tratamiento por el CD40L (figura 1 a).

Se observaron resultados similares en células dendríticas derivadas de células CD34⁺.

La producción de la proteína GILZ se detectó por citometría de flujo con la ayuda de anticuerpos anti GILZ, únicamente en las células dendríticas tratadas con dexametasona pero no en las células controladas no tratadas (figura 1b, panel superior). La expresión de la proteína GILZ en las células dendríticas tratadas con dexametasona se inhibe por un siARN direccionante GILZ (figura 1b, panel inferior).

Ejemplo 2: Efecto de la expresión de GILZ inducida por dexametasona o el IL-10 en el fenotipo, la producción de quimioquinas y la actividad estimuladora de los linfocitos T de las células dendríticas.

10

1) Materiales y métodos

a) Análisis del fenotipo de las células dendríticas

El fenotipo de las células dendríticas se analizó por citometría de flujo de cuatro colores, con la ayuda de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD83 acoplado a ficoeritrina (CD83-PE, COULTER); anti-CD80 acoplado a la ficoeritrina (CD80-PE, BD BIOSCIENCES); anti B7-H1 (CLINISCIENCES) y anti-CD86 acoplado a la ficoeritrina (CD86-PE, BD PHARMINGEN). El anticuerpo anti-B7-H1 se detectó con la ayuda de un anticuerpo secundario acoplado a la ficoeritrina (BD PHARMINGEN).

20

b) Cocultivo de células dendríticas y de células T CD4⁺ y análisis de la proliferación de las T CD4⁺

Las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos (iMDDC) se trataron al quinto día de cultivo (J5) por un siARN de control o un siARN direccionante GILZ (siARN GILZ) solo, o bien con, ya sea la dexametasona (DEX), ya sea el IL-10, o no tratados, luego se añadió el antígeno de llamada PPD (proteínas estándar purificadas de *M. tuberculosis*, 1 mg/ml, STATENS SERUM INSTITUTE) en J7. Las células dendríticas (0,5 x 10⁵) así obtenidas se lavaron tres veces y cocultivaron con 10⁵ células T CD4⁺ autólogas recién purificadas (TCD4 negativas selección kit TM, DYNAL) en placas de cultivo en 96 pozos de fondo redondo, en un medio RPMI suplementado con 10% de suero humano del grupo AB. La proliferación de los linfocitos T CD4⁺ se analizó a nivel individual, al séptimo día de cocultivo (J14), con la ayuda del colorante PKH26, como se describe en Rimaniol et al., Clin. Exp. Immunol. 2003, 132, 76 – 80.

30

c) ELISA-citoquina

La producción de quimioquinas en los sobrenadantes del cultivo de las células dendríticas se analizó con la ayuda de kits ELISA (R&D SYSTEMS) según las instrucciones del fabricante.

35

2) Resultados

Se analizó el efecto de GILZ en el fenotipo de las células dendríticas y sobre la producción de quimioquinas y la estimulación de los linfocitos T por células.

40

La dexametasona y el IL-10 que modula la maduración de las células dendríticas; inhiben la expresión de CD80, CD83 y CD86 y estimulan la producción de B7-H1. Estos cambios fenotípicos de las células dendríticas inducidas por dexametasona y el IL-10 son inhibidas por el siARN direccionante GILZ (figura 2a).

45

La activación de las células dendríticas por el CD40L estimula la producción de las quimioquinas CCL3, CCL5 y CXCL8. Esta inducción se inhibe parcialmente cuando las células dendríticas son tratadas con dexametasona o el IL-10 antes de la adición del CD40L. El siARN anti GILZ invierte el efecto de la dexametasona y del IL-10 en la producción de las quimioquinas, cuando el siARN de control está sin efecto (figura 2b).

50

Para probar el efecto de GILZ en la presentación del antígeno, las células dendríticas se tratan en J5 con un siARN de control o un siARN anti GILZ, solo o en presencia de la dexametasona o del IL-10, o no tratadas. Dos días más tarde (J7), se añadió el antígeno de llamada PPD a los cultivos de células dendríticas. A continuación las células se

lavarón, mezcladas con linfocitos T CD4⁺ autólogas y se analizó la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 7 días después (J14).

5 El tratamiento de las células dendríticas por dexametasona disminuye su capacidad de estimulación de los linfocitos T CD4⁺. El siARN anti GILZ, solo o el siARN de control, solo o en presencia de la dexametasona no tienen efecto sobre la respuesta de los linfocitos T. En compensación, el siARN anti GILZ hace abolir el efecto de la dexametasona en las células dendríticas (figura 2c). Se observan resultados similares con las células tratadas con el IL-10 en lugar de la dexametasona.

10 Ejemplo 3 : Efecto de GILZ en las células dendríticas y la inducción de T reguladores

1) Materiales y métodos

a) Vector recombinante de expresión de GILZ y transfección de las células dendríticas derivadas de monocitos

15 Las células dendríticas se transfectaron mediante un vector recombinante de expresión de GILZ derivado de pcDNA3 (pGILZ; Berrebi et al., precitado) o un vector vacío (pcDNA3, IN VITROGEN), según el protocolo de transfección por nucleofección, con la ayuda del sistema AMAXA™.

20 b) Inducción de T reguladores

Para evaluar la inducción de los T reguladores (Treg), las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos tratados en el quinto día de cultivo (J5) por un siARN de control o un siARN direccional GILZ (siARN GILZ) solo, o bien con, ya sea la dexametasona (DEX), ya sea el IL-10, o no tratados, luego tratadas con el PPD en J7, se cultivaron con las células T CD4⁺, como se describe en el ejemplo 2. Las células T CD4⁺ se purifican en el séptimo día de cocultivo DC-T CD4⁺ y se añaden en cantidades crecientes al 10⁵ PBMC autólogos estimuladas por el PPD (1 µg/ml, STATENS SERUM INSTITUTE) o citomegalovirus (CMV, 25 µg/ml, BEHRING).

2) Resultados

30 Los cambios genotípicos de las células dendríticas inducidos por un vector de expresión recombinante que codifica para la proteína GILZ (pcDNA3-GILZ) se analizaron por citometría de flujo, como se describe en el ejemplo 2, con el fin de determinar si GILZ, por sí misma, era capaz de reproducir los efectos de la dexametasona y del IL-10 en las células dendríticas. Las células dendríticas transducidas por un vector de expresión de GILZ que presentan un fenotipo próximo al de las células dendríticas tratadas con el IL-10 o dexametasona, con una expresión débil de CD80, CD83 y CD86 y una expresión fuerte de B7-H1 (figura 3).

Se ha verificado experimentalmente la hipótesis según la cual las células dendríticas que expresan GILZ inhiben la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ induciendo linfocitos T reguladores durante la presentación del antígeno. Las células dendríticas se han tratado con un siARN de control o anti GILZ, solo o con dexametasona, y con el PPD, (primer cultivo). Después de los lavados, las células dendríticas se utilizaron para estimular linfocitos T CD4⁺ autólogos. Los linfocitos T CD4⁺ de este segundo cultivo (linfocitos T CD4⁺ sensibilizados) se purificaron y añadieron en cantidades crecientes a los PBMC autólogos estimulados, ya sea por el PPD, ya sea por el CMV (tercer cultivo). Los linfocitos T CD4⁺ sensibilizados por células dendríticas no tratadas o tratadas con un siARN de control no tienen efecto en la respuesta proliferativa del tercer cultivo. Los linfocitos T CD4⁺ sensibilizados por células dendríticas tratadas con dexametasona y por un siARN de control inhiben la respuesta anti-PPD del tercer cultivo, mientras que no tienen efecto en la respuesta anti-CMV. Así, las células dendríticas tratadas con dexametasona inducen linfocitos T reguladores específicos de PPD, durante la presentación del antígeno. La respuesta de este tercer cultivo es similar cuando los linfocitos T CD4⁺ son sensibilizados por células dendríticas tratadas con dexametasona y por un siARN anti GILZ o por células dendríticas sensibilizadas por un siARN de control. Estos resultados indican que la inhibición de la producción de GILZ por las células dendríticas inhibe la capacidad de las células dendríticas tratadas con dexametasona para inducir los linfocitos T reguladores (figuras 4a y 4b).

Igualmente se ha probado la capacidad de las células que presentan antígenos (APC) que expresan GILZ para inducir linfocitos T reguladores, *in vivo*.

5 La administración de glucocorticoides en individuos aumenta la expresión de GILZ para sus células que presentan antígenos circulantes (535 ± 43 unidades arbitrarias (UA) de ARNm GILZ dos días después del inicio de tratamiento *versus* 151 ± 35 UA de ARNm GILZ antes de la administración del glucocorticoide, $p < 0,05$). Se ha comprobado la capacidad de las células que presentan antígenos circulantes de individuos tratados por glucocorticoides para inducir linfocitos T reguladores, tal como se describe más arriba. Por comparación con las células que presentan antígenos tomados antes del inicio del tratamiento, las células que presentan antígenos de pacientes tratados con glucocorticoides, inducen linfocitos T CD4⁺ que poseen funciones supresoras durante una respuesta posterior anti-PPD, cuando son cargadas con la PPD. Así, los glucocorticoides administrados en el humano generan, tanto *in vivo* como *in vitro*, células que presentan antígenos que inducen linfocitos T reguladores.

15 La implicación de la GILZ en este fenómeno se probó añadiendo una etapa suplementaria al experimento precedente: las células que presenten antígenos se incubaron con un siARN de control o un siARN anti GILZ, antes de la adición de PPD. La inducción de linfocitos T reguladores es completamente abolida cuando las células que presentan antígenos se cultivan en presencia de siARN anti GILZ (figura 4c). En consecuencia, el tratamiento de los pacientes con glucocorticoides induce la producción de GILZ para sus células que presentan antígenos, y esta expresión de GILZ *in vivo* es indispensable para inducir linfocitos T reguladores durante la presentación del antígeno.

20 Como se desprende de lo anterior, la invención no se limita únicamente a estos dos modos de empleo, de realización y de aplicación que acaban de ser descritos de manera más explícita; abarca por el contrario todas las variantes que puedan ser concebidas por el experto en la materia, sin apartarse del marco ni del alcance de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS
EMILIE, Dominique
COHEN, Nicolas
LEMOINE, Francois

35 <120> Utilización de la proteína GILZ expresada en las células dendríticas para modular la respuesta inmune específica de un antígeno.

<130> 1020PCT23

40 <160> 2

<170> Patentin version 3,1

45 <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>

50 <223> cadena en sentido siARN GILZ

<400> 1

aguccaggau uauagcccct t 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

5 <220>

<223> cadena en sentido siARN de control

<400> 2

acggggggcc cuuaaacat t 21

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Utilización de al menos: a) una proteína GILZ o un vector recombinante de expresión de la dicha proteína, aislados o expresados en células dendríticas modificadas, y b) un antígeno seleccionado del grupo constituido por:
- 5 un autoantígeno, un alérgeno, un antígeno implicado en una enfermedad inflamatoria crónica, un antígeno de trasplante, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, alergias, rechazos de injertos y de la enfermedad de rechazo de órganos en el huésped.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la dicha proteína GILZ es la proteína humana.
3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada por que el dicho antígeno definido en b) se selecciona del grupo constituido por: *Phleum pratense*, *Dermatophagoides pteronyssimus* y *farinae*, un antígeno del látex tal como Hev b 1 a 11, proinsulina, MAG, tiroperoxidasa y tireoglobulina.
- 15 4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la dicha proteína GILZ o el vector recombinante de expresión de la dicha proteína, aislados, se asocian con una molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de la células dendríticas, seleccionadas del grupo constituido por péptidos de la membrana, lípidos, ligandos de un receptor de la membrana o de un antígeno de superficie de
- 20 células dendríticas y de anticuerpos dirigidos contra: DC – SIGN, CD40, DEC-205, langerina, el receptor para la manosa o receptores de depuración.
5. Utilización según la reivindicación 4 caracterizada por que el dicho receptor de membrana o antígeno de superficie de las células dendríticas, se selecciona del grupo constituido por: DC-SIGN, CD40, DEC-205, langerina, el receptor
- 25 para la manosa y un receptor de depuración.
6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que el dicho vector comprende un casete de expresión que incluye un promotor de un gen expresado de manera específica o preferiblemente en
- 30 células dendríticas.
7. Utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que el dicho promotor es el de un gen que codifica para una proteína seleccionada del grupo constituido por: DC-SIGN, CD11c, una molécula del complejo principal de histocompatibilidad de la langerina.
- 35 8. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que el dicho vector de expresión definido en a) es un lentivirus.
9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que la dicha proteína GILZ está bajo la forma de una proteína quimérica que incluye la secuencia del dicho péptido que permite el direccionamiento
- 40 y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas y/o la secuencia del dicho antígeno definido en b).
10. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que el dicho antígeno se carga en las dichas células dendríticas modificadas o es presentado por las dichas células.
- 45 11. Medicamento que comprende al menos células dendríticas modificadas por una molécula seleccionada del grupo constituido por: una proteína GILZ y un vector recombinante de expresión de la dicha proteína tales como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 10.
- 50 12. Medicamento según la reivindicación 11, caracterizado por que comprende igualmente un antígeno tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 9 y 10.

13. Utilización de células dendríticas modificadas tales como se define en la reivindicación 11 o 12, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades tales como se define en la reivindicación 1.

5 14. Medicamento que comprende al menos: a) una proteína GILZ o un vector recombinante de expresión de la dicha proteína, y b) un antígeno de interés y/o una molécula que permite el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas tales como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

10 15. Medicamento según la reivindicación 14, caracterizado por que comprende uno o varios vectores recombinantes de expresión que codifican para la dicha proteína GILZ, permitiendo el dicho antígeno y/o la dicha molécula el direccionamiento y/o el paso de la membrana plásmica de las células dendríticas, seleccionados del grupo constituido por péptidos de la membrana, lípidos, ligandos de un receptor de la membrana o de un antígeno de superficie de las células dendríticas y de los anticuerpos dirigidos contra : DC – SIGN, CD40, DEC-205, langerina, el receptor para la manosa y receptores de depuración.

15 16. Procedimiento de inducción de linfocitos T supresores/reguladores *in vitro*, a partir de una muestra de tejido que contiene células T CD4⁺ y/o CD8⁺, caracterizado por que comprende al menos:

20 a1) la preparación de células dendríticas autólogas que expresan la proteína GILZ), y, de manera simultánea o secuencial,

b1) la incubación de las dichas células dendríticas obtenidas en a1) con un antígeno tal como se define en la reivindicación 1, 3, 9 o 10, y la dicha muestra de tejido que contiene las dichas células T CD4⁺ o CD8⁺.

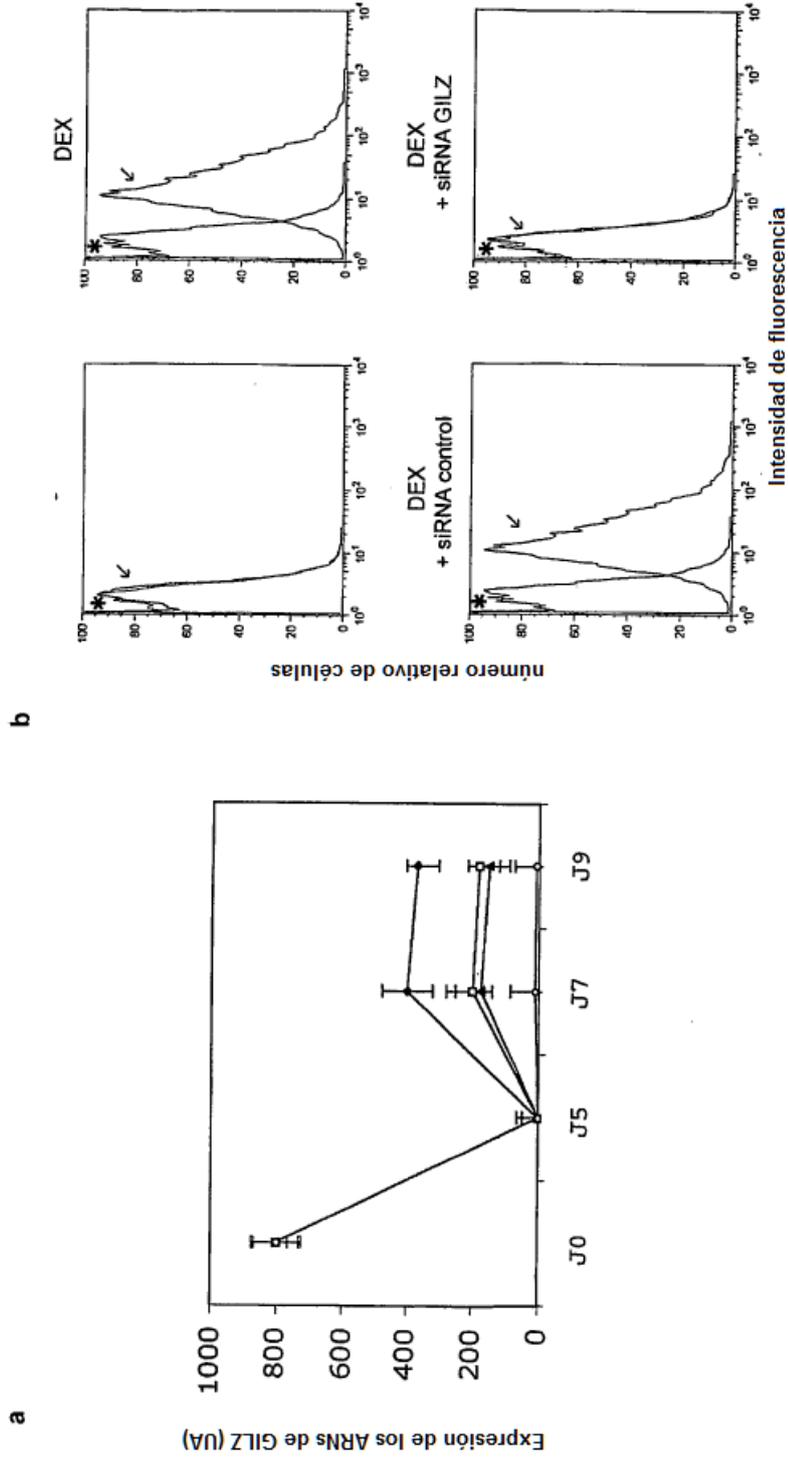


Figura 1

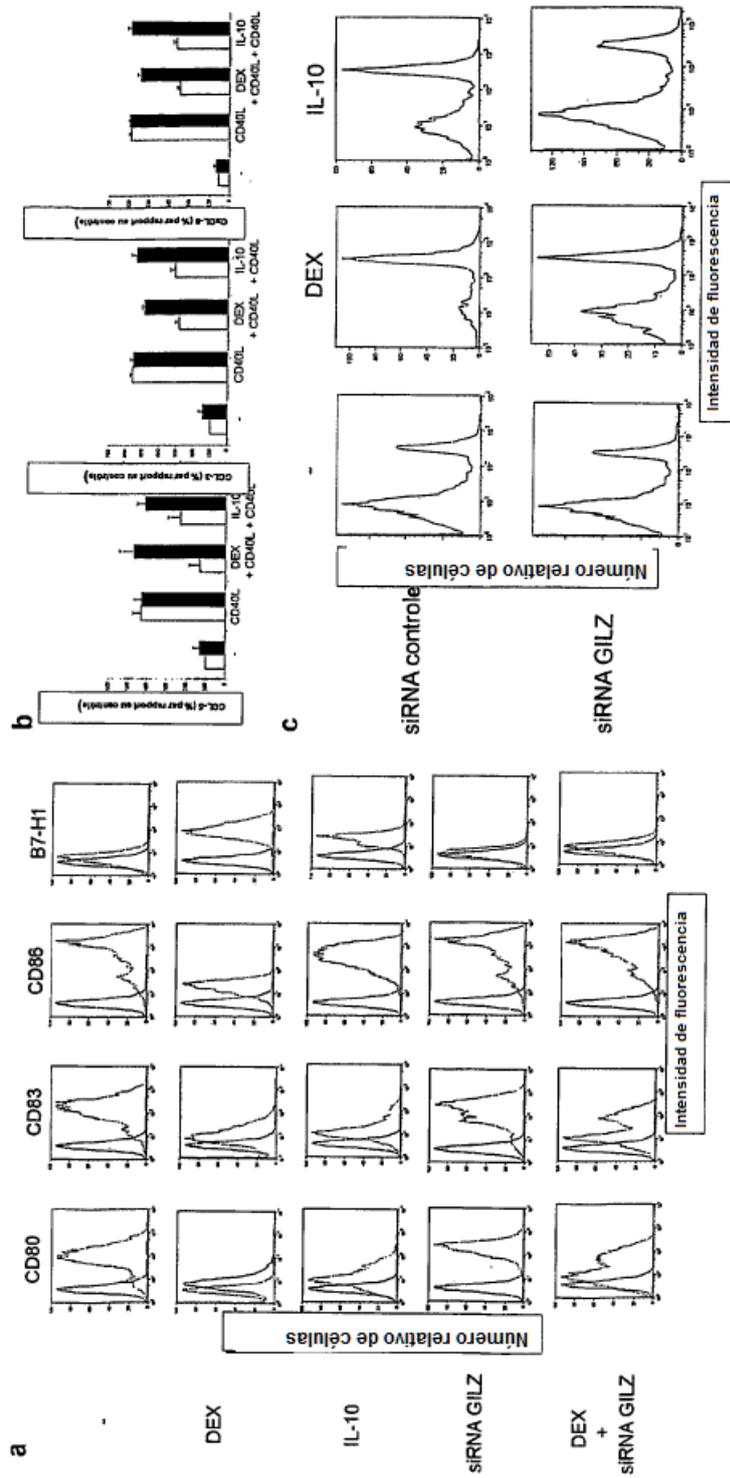


Figura 2

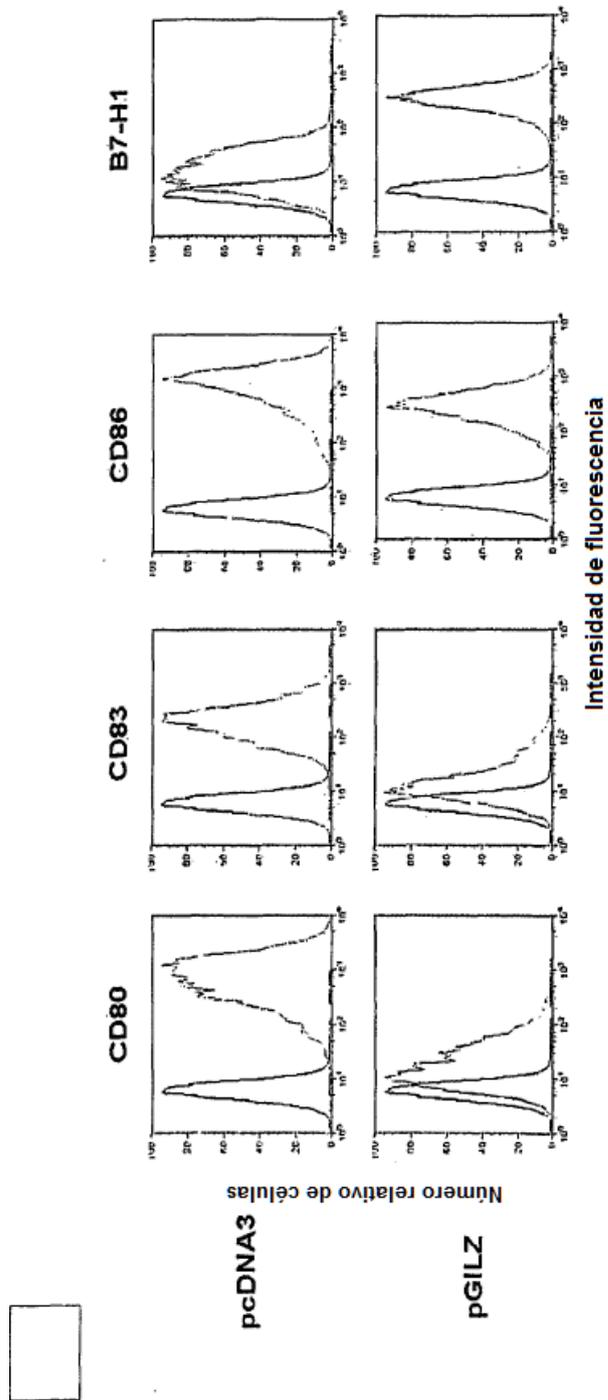


Figura 3

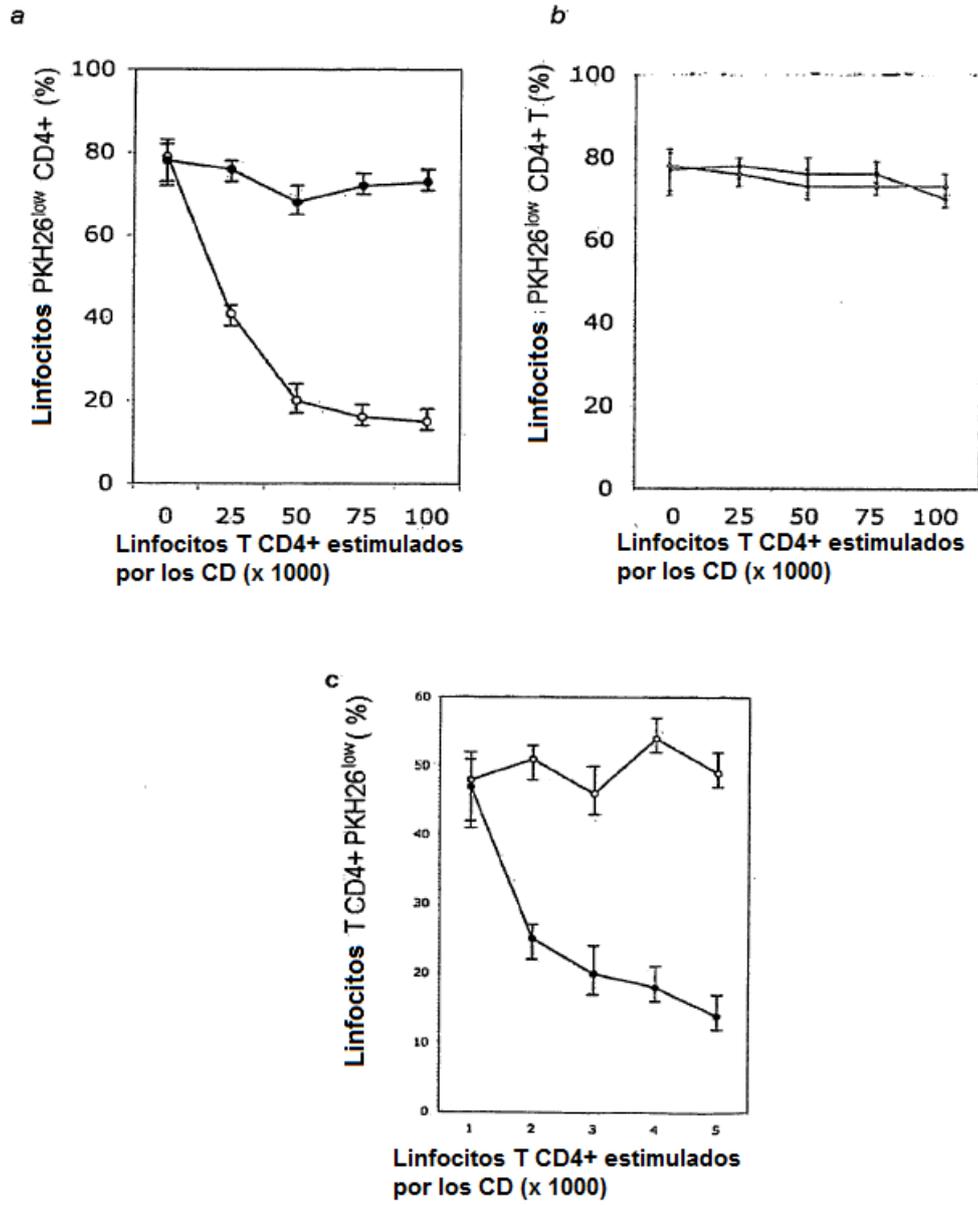


Figura 4