

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 164**

51 Int. Cl.:
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01)
C12N 5/095 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07726744 .1**
96 Fecha de presentación: **09.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1993574**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Células reguladoras CD4+CD25+ específicas para el injerto de células hematopoyéticas y la tolerancia inmunitaria**

30 Prioridad:
10.03.2006 FR 0650828

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
**GENETHON
1 BIS, RUE DE L'INTERNATIONALE
91000 EVRY, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

72 Inventor/es:
**GROSS, David Alexandre y
DAVOUST, Jean**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 378 164 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

Células reguladoras CD4+CD25+ específicas para el injerto de células hematopoyéticas y la tolerancia inmunitaria

- 5 La invención se refiere a células T reguladoras CD4+CD25+ específicas de un antígeno menor y más precisamente, a su asociación con células madre hematopoyéticas en un compuesto farmacéutico, así como su utilización como medicamento para aumentar la tolerancia inmunitaria de un huésped histocompatible, comprendiendo con respecto a transgénicos.
- 10 La terapia de sustitución de genes ha suscitado un gran interés para el tratamiento de diferentes enfermedades metabólicas y de desórdenes genéticos tales como las distrofias musculares o la hemofilia. No obstante, es muy importante evitar respuestas inmunes perjudiciales. Se han hecho esfuerzos considerables para mejorar los procedimientos de suministro de los genes buscando los vectores menos inmunógenos, promotores tejido-específicos así como vías y dosis de inyección apropiadas (1, 2). No obstante, estos sistemas se encuentran enfrentados al riesgo de crear una situación de ignorancia inmune, en el que una inflamación secundaria o las señales de patógenos de proximidad pueden inducir un rechazo inmune de los productos de gen terapéutico (3). La inducción de la tolerancia periférica utilizando co-tratamientos inmunosupresivos o el bloqueo transitorio de vías de co-estimulación, desarrollados inicialmente para el trasplante o las aplicaciones de autoinmunidad se han trasladado con éxito a la terapia génica (4,5), pero estos procedimientos vienen acompañados de una marcada toxicidad, aumentando los riesgos de enfermedad cardiovascular, infecciones oportunistas y tumores malignos en el hombre. Son necesarios sistemas de tolerancia específica con respecto a transgénicos para bloquear el rechazo inicial y para inducir una tolerancia a largo plazo con respecto a los transgénicos, sin afectar las funciones inmunes generales de los pacientes. Estos requisitos se satisfacen expresando los transgénicos de interés en un sistema hematopoyético antes de las intervenciones de terapia génica.
- 25 El quimerismo hematopoyético mixto con la tolerancia donante específica consistente asociada al mismo, puede ser utilizado en el trasplante de órganos (6) y el tratamiento de enfermedades autoinmunes (7). El quimerismo hematopoyético mixto ha sido utilizado recientemente para inducir tolerancia con respecto a proteínas específicas transfiriendo genes en células madre hematopoyéticas (CSH) autólogas para la terapia génica (8). No obstante, su inducción estable requiere una inmunodepresión de larga duración y un acondicionamiento mieloablativo para evitar el rechazo del injerto y para crear un espacio en el interior del microambiente de la médula huésped. De este modo, un trasplante de médula ósea requiere una mieloablación parcial asociada a una inmunodepresión para conseguir el quimerismo hematopoyético mixto necesario.
- 30 Dosis elevadas de células de médula ósea (MO) pueden superar la accesibilidad limitada de los nichos disponibles (9, 10). No obstante, incluso en el caso de trasplantes óptimos de MO compatibles para las moléculas de histocompatibilidad HLA, antígenos de histocompatibilidad menores (AgMH) pueden provocar un rechazo inmune (11, 12), requiriendo una inmunodepresión mantenida. Transgenes extraños expresados en las células del sistema hematopoyético (CSH) constituyen antígenos de histocompatibilidad menores que pueden comprometer la aceptación del trasplante de CSH.
- 40 Entre los grupos de linfocitos T reguladores, las células T CD4+CD25+ (Tregs), controladas por el factor de transcripción forkhead Foxp3, son particularmente prometedoras para la inducción de tolerancia en trasplantes (12, 13), puesto que pueden prevenir la enfermedad del injertante contra el huésped (14, 15) e inhibir el rechazo del aloinjerto de MO en los receptores irradiados de manera subletal (16). Si bien el reconocimiento de antígenos (17) se sospecha que está implicado en la regulación inmune por los Tregs, su forma de acción *in vivo* no se ha aclarado todavía. Las modalidades de empleo de esta población celular para las aplicaciones terapéuticas potenciales están todavía por definir.
- 50 El problema técnico que se propone resolver la presente invención es, por lo tanto, encontrar un tratamiento alternativo al tratamiento inmunodepresivo mieloablativo tradicional que se considera largo, pesado y potencialmente peligroso con respecto a riesgos de infección y riesgos tumorales que genera de manera general en el receptor.
- 55 Dentro del marco de la presente invención, la solicitante ha demostrado el potencial inmunodepresivo antígeno-específico de una clase particular de células Y reguladoras, que constituye una alternativa para el acondicionamiento del receptor a efectos de, por ejemplo, un trasplante. Por lo tanto, un acondicionamiento simple con esta población celular permite aumentar a largo plazo la tolerancia inmunitaria de un huésped histocompatible.
- 60 De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere, por lo tanto, a un compuesto farmacéutico que comprende:
- células T reguladoras CD4+ CD25+ específicas, como mínimo, de un antígeno menor de histocompatibilidad, y
 - células madre ventajosamente hematopoyéticas portadoras, como mínimo, de dicho antígeno.
- 65 En principio, se debe precisar que en la siguiente descripción, la invención se refiere a la introducción de células o

tejidos en huéspedes histocompatibles. Esto implica que el injerto y el huésped poseen un sistema de histocompatibilidad principal (HLA) idéntico y son, por lo tanto, haploidénticos. Se habla entonces de un homoinjerto.

5 En este caso, la reacción e incluso el rechazo del injerto por el huésped está relacionado con la presencia, en los CSH injertados de antígenos no HLA llamados antígenos menores de histocompatibilidad (AgMH), específicos del injerto (y por lo tanto, del donante) y divergentes o incluso ausentes en el huésped (receptor). Estos antígenos menores que proceden tanto de proteínas intracelulares como de proteínas de superficie se presentan en el contexto de moléculas del sistema HLA.

10 A título de ilustración, la transferencia de células o de tejidos macho en un huésped hembra, por lo tanto, histocompatible, es susceptible de poner en marcha una reacción inmunitaria dada la presencia de antígenos menores macho en las células o el tejido. Estos antígenos macho son codificados con el cromosoma Y y son preferentemente las proteínas DBY, UTY o SMCY. Estos antígenos específicos presentan la ventaja de ser expresados correctamente (eficaces) y bien conservados (poco polimorfismo) en los diferentes individuos, lo que
15 hace de ellos antígenos llamados universales.

El principio activo de una composición farmacéutica, según la invención, reside en las células T reguladoras CD4+ CD25+ específicas, como mínimo, de un antígeno AgMH, tal como el que se ha definido anteriormente. En otros
20 términos, células T reguladoras son capaces de reconocer específicamente este AgMH por el intermediario de su receptor T o de cualquier otro mecanismo de reconocimiento específico.

Las células T reguladoras (Treg) corresponden a una subpoblación de los linfocitos T-células de la sangre implicadas en el buen funcionamiento del sistema inmunitario, capaces de neutralizar en la periferia la acción destructora de los linfocitos T auto-reactivos. Estas células reguladoras están implicadas en la prevención de la
25 puesta en marcha de reacciones inmunes auto-reactivas que se encuentran en la base de las patologías auto-inmunes. Las células T reguladoras CD4+ CD25+ son fácilmente identificadas, aisladas y purificadas gracias a la presencia de los marcadores CD4 y CD2. Se caracterizan igualmente por el hecho de que expresan específicamente el factor de transcripción Foxp3, recientemente evidenciado en esta población celular.

30 Se comprende por "específicas de un antígeno" el hecho de que las células T expresan receptores de superficie TCR apropiados para reconocer y para interactuar con, como mínimo, un epítipo del antígeno AgMH. De manera equivalente, se dice que las células T están dirigidas contra dichos antígenos.

35 Estas células Treg son apropiadas para reconocer, como mínimo, un antígeno. Ello significa que pueden ser mono-específicas, reconociendo un epítipo de un antígeno. De manera alternativa, pueden estar dirigidas contra varios antígenos AgMH del donante. Se puede prever igualmente dirigir estas células contra varios epítipos distintos de un mismo antígeno.

40 De manera ventajosa, las células T utilizadas dentro del marco de la invención son específicas de un antígeno único AgMH, lo que demuestra la potencia de la solución técnica propuesta capaz de conferir una amplia tolerancia inmunitaria.

45 En el caso particular del reconocimiento de DBY, una población celular de este tipo ha sido producida por ratones portadores de un receptor a las células T transgénicas, específico del péptido DBY (NAGFNSNRANSSRSS) (SEQ ID 1) que forma complejo con IA^b. Estos ratones son conocidos con el nombre de ratones Marilyn (**18**).

Estas células T mono-específicas pueden ser cultivadas y multiplicadas *in vitro* gracias a un protocolo descrito por Tarbel y otros (**19**). Además, es igualmente posible generar este tipo celular *de novo* en el hombre (**20**).

50 En su momento, un compuesto farmacéutico, según la invención, contendrá los factores necesarios para la generación *de novo* en el huésped de células T, tales como las definidas anteriormente.

55 En una forma de realización ventajosa, las células T, tal como se han definido anteriormente, son autólogas, es decir, que han salido del donante, que en este caso en particular, es igualmente el receptor.

En combinación con esta primera población celular (Tregs), la composición farmacéutica comprende además un segundo tipo de células, a saber células madre. Por razones éticas, no están involucradas en la presente invención las células madre directamente salidas de embriones humanos.

60 Estas células son portadoras y expresan, como mínimo, el antígeno que difiere en el receptor pero que es apropiado para ser reconocido por las células Treg del compuesto farmacéutico de la invención.

En una primera forma de realización, estas células salen del donante histocompatible y llevan "de modo natural" (codificado en su patrimonio genético) este antígeno, que es ausente en el receptor.

65

De manera alternativa, se puede tratar de células autólogas salidas del receptor (que constituye, por lo tanto, igualmente el donante), en las que se ha introducido, como mínimo, un antígeno AgMH. Preferentemente, esto es realizado por transferencia de genes con ayuda de útiles conocidos por los técnicos en la materia, especialmente vectores virales.

5 En la práctica, se demuestra que el huésped receptor de este compuesto adquirirá una tolerancia inmune hacia el antígeno reconocido específicamente por los Treg, según la invención, y por esta razón se desarrollará igualmente un estado de tolerancia hacia el conjunto de los antígenos soportados por estas células madre, inicialmente reconocidos por las células T reguladoras específicas.

10 En este caso particular de la transferencia macho/hembra, se puede tratar de células salidas de un donante macho y, por lo tanto, portadoras de antígenos menores macho, tales como DBY, UTY y SMCY, por ejemplo células macho de la médula ósea (MO).

15 De manera alternativa, se puede tratar de células de médula ósea salidas del receptor hembra, transducidas por vectores portadores de los genes que codifican DBY y/o UTY y/o SMCY. La utilización de células autólogas presenta la ventaja evidente en términos de compatibilidad.

20 De manera general y ventajosa, se trata de células madre hematopoyéticas (CSH) que asegurarán el mantenimiento a largo plazo del estado de tolerancia, sin condicionamiento mieloablativo ni inmunosupresor en el receptor. Estas CSH de origen medular o derivada de diversas poblaciones de células progenitoras no embrionarias podrán poseer también un poder terapéutico directo por su virtud de mantenimiento del estado de tolerancia específico, con respecto a uno o varios AgMH o bien permitiendo la producción de factores metabólicos que permiten la corrección de desórdenes de origen genético.

25 En una primera forma de realización, se trata de células de la médula ósea (MO) que contienen células madre hematopoyéticas (CSH). Estas células pluripotentes están destinadas a provocar el nacimiento de los diferentes tipos de células sanguíneas en el curso de la hematopoyesis. Estas células son conseguidas de manera clásica de extracciones medulares o sanguíneas y purificadas según marcadores fenotípicos (por ejemplo, CD34) o finalmente enriquecidas, según criterios funcionales, tales como su capacidad de exclusión del marcador Hoechst. En esta segunda forma de realización, las células madre son igualmente de naturaleza hematopoyética, pero sufren una purificación inicial con la finalidad de aislar una fracción enriquecida en células progenitoras. Este método elimina un gran número de células que no poseen el poder de implantarse en el receptor y permite la modificación genética eficaz de un número limitado de células.

35 Dentro del marco de la invención, se prevé igualmente utilizar células madre modificadas genéticamente, portadoras de un transgén de interés. Estos transgenes pueden ser aportados con ayuda de un vector, preferentemente vírico. Los vectores lentivíricos son preferentes dentro del marco de las aplicaciones terapéuticas que implican CSH. El producto de estos transgenes es igualmente percibido como un antígeno menor de histocompatibilidad por parte del huésped receptor de un compuesto farmacéutico, según la invención. Este transgén puede ser expresado, por lo tanto, además del antígeno específicamente reconocido por las células Treg, según la invención, o bien puede constituir por si mismo este antígeno.

40 De forma notable, el compuesto, según la invención, permite asegurar la expresión estable del transgén.

45 A título de transgén de interés, se puede prever, por ejemplo, cualquier gen funcional apropiado para compensar un gen defectuoso en el huésped, por ejemplo, el gen de la distrofina en los pacientes afectados de DMD.

50 El compuesto al que se refiere la invención puede contener además coadyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables, conocidos por los técnicos en la materia.

55 La cantidad de células en el compuesto farmacéutico reivindicado es administrada ventajosamente con un nivel de 10^4 y 10^8 células por kg del receptor. En el marco de la invención se ha demostrado que una cantidad incluso reducida de células Treg es suficiente para un acondicionamiento eficaz. La cantidad de células Treg es ventajosamente igual o aproximadamente a 10^6 células por kg.

60 La inyección por vía sanguínea, preferentemente intravenosa, es la forma de administración preferente del compuesto farmacéutico, según la invención. Se ha comprobado que una inyección única era tan eficaz como una serie de inyecciones repetidas (semanales) de cantidades equivalentes de células.

65 La presencia de los dos tipos de células en el compuesto farmacéutico reivindicado permite introducir las simultáneamente, durante una única inyección, en el huésped receptor biocompatible. No obstante, el efecto ventajoso en cuanto a la tolerancia inmunitaria (útil en terapia génica y celular para los trasplantes y los injertos) de una combinación de este tipo se conserva tanto en la administración simultánea, separada o escalonada en el tiempo de los 2 tipos celulares descritos anteriormente, que son objeto de la composición, según la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de este compuesto para la preparación de un medicamento destinado a aumentar o mejorar la tolerancia inmunitaria en un huésped histocompatible.

5 Como recordatorio, un huésped biocompatible es el receptor de un injerto salido de un donante que posee antígenos principales compatibles pero antígenos menores divergentes, susceptibles de poner en marcha una reacción inmunitaria que conduce al rechazo del injerto y/o del transgén terapéutico por parte del huésped.

10 Dentro del marco de la presente invención, se han realizado varias observaciones de gran importancia para las perspectivas terapéuticas después de acondicionamiento con los dos tipos celulares, tales como se han descrito:

- la tolerancia inmunitaria del receptor queda mejorada a corto plazo y también a largo plazo;
 - la tolerancia permanece específica, puesto que el receptor permanece perfectamente inmunocompetente;
 - la tolerancia se establece con respecto al antígeno menor específico reconocido por las células Tregs, pero igualmente con respecto a otros antígenos del mismo tipo, entre los que se comprende un transgén asociado
- 15 inicialmente al injerto cuya expresión estable está asegurada;
- la tolerancia persiste con respecto a un injerto secundario que lleva antígenos menores, incluso si el antígeno inicial específicamente reconocido por las células Treg no se encuentra presente en el injerto secundario.

20 En la práctica, estas ventajas ofrecen diferentes aplicaciones terapéuticas referentes a los injertos de tejidos autólogos genéticamente modificados, destinándose los procedimientos de transferencia de genes y finalmente procedimientos de inducción de tolerancia específicos de antígenos definidos a atenuar las reacciones auto-reactiva en patologías autoinmunes que poseen dianas moleculares y celulares identificadas.

25 En principio, el hecho de poder aumentar la tolerancia inmunitaria del receptor permite una mayor flexibilidad a nivel de la elección del donante, en particular suprimiendo la barrera de la diferencia de sexo.

30 En el caso de injerto de tejidos líquidos o sólidos, por ejemplo en el caso de la piel, el injerto de células madre es solamente una etapa preliminar de acondicionamiento, preparatorio para el injerto secundario del tejido de interés procedente del donante.

La invención se referirá, por lo tanto, igualmente a la utilización del compuesto descrito en el caso en el que la tolerancia inmunitaria ha aumentado en vista al trasplante de un tejido procedente de un donante portador de un antígeno menor de histocompatibilidad, por ejemplo, para un injerto de piel.

35 Las células madre pueden ser el vector de uno o varios genes llamados reparadores, que sirven para corregir un defecto de origen genético presente en el huésped. El gene reparador puede ser aportado por el patrimonio genético de las células madre por sí mismas o puede ser introducido en células por medio de un vector, preferentemente vírico. Se trata en este último caso de un transgén aportado por las células madre.

40 Tal como se ha descrito en lo anterior, el acondicionamiento descrito satisface las aplicaciones terapéuticas reivindicadas. El medicamento, según la invención, constituye, por lo tanto, un tratamiento suficiente por sí mismo.

45 La invención y las ventajas que proceden de la misma se comprenderán mejor por los ejemplos de realización siguientes con ayuda de las figuras adjuntas, que en todo caso no son limitativas.

50 Dado que la aplicación de injertos de tejidos macho en receptores hembra genera una respuesta inmune bien definida contra los antígenos DBY, UTY y SMCY en los ratones C57B1/6 (B6) (11), el ejemplo de realización siguiente se basa en este modelo para comprobar si las células Tregs específicas de macho pueden promover la adopción de injerto a largo plazo de células progenitoras de la médula espinal. Este modelo cuida las situaciones en las que las células madre autólogas, traducidas con células extrañas, son rechazadas por las respuestas específicas al transgén del huésped. Además, la presencia de varios antígenos macho introduce un nivel de complejidad apreciable, permitiendo comprobar en qué medida las células Tregs, dirigidas contra un epítipo único pueden suprimir las respuestas inmunes suprimidas contra todas las demás proteínas expresadas. Las células Tregs dirigidas contra el antígeno macho DBY, obtenidas a partir de ratones Marilyn portadores de un TCR transgénico

55 han sido utilizadas como único acondicionamiento para obtener una adopción del injerto a largo plazo con dosis apreciables de MO macho en huésped hembra B6. De modo importante para las aplicaciones terapéuticas, los ratones B6 que se han vuelto tolerantes por este procedimiento se vuelven permisivos con respecto a adopciones de injertos secundarios de tejidos autólogos modificados con el transgén presente en los MO iniciales, independientemente del antígeno DBY reconocido por las Tregs sometidas a perfusión.

60 **Figura 1: Expansión *in vivo* y propiedades inmunosupresoras de las Tregs-DBY**

(A) Análisis por FACS de las células de ganglios linfáticos de un ratón hembra Marilyn marcadas con anti-CD4-FITC, Vβ6-PE y CD25-biotina/APC-streptavidina. Las células muertas han sido excluidas con ayuda de actinomicina D (7-AAD).

(B) Se han determinado los niveles de ARNm FoxP3 de las células CD25+ y CD25- purificadas a partir de ratones hembra B6 y Marylin por análisis PCR en tiempo real en esplenocitos recientes.

(C) Supresión *in vitro* por las Tregs-DBY estimada para el porcentaje de división de $5 \cdot 10^3$ células T-helper CD4+CD25- de un ratón Marylin (marcadas con $2 \mu\text{M}$ de CFSE), estimulado con $5 \cdot 10^5$ esplenocitos macho de B6 en presencia de dosis variables de Tregs DBY (círculos llenos) o Tregs-B6 no específicos (círculos vacíos).

(D) De expansión *in vivo* de Tregs-DBY: Tregs-DBY marcados con $5 \mu\text{M}$ de CFSE han sido transferidos conjuntamente con $10 \cdot 10^6$ esplenocitos hembra o macho en un ratón hembra receptor CD45.1. En el día 6, los esplenocitos han sido marcados con CD4-Cy, CD25-PE y CD45.2-biotina/APC-streptavidina. Los histogramas de puntos presentan ventanas en las células CD4+CD45.2+.

Figura 2: Adopción de injerto a corto plazo en MO macho y expansión transitoria de las Tregs-DBY.

(A,B) Adopción de injerto a corto plazo (día 28) de células MO macho congénitas CD45.1 ($5 \cdot 10^6$ células), transferidas en ratón hembra B6, no tratados (-) o acondicionados con una inyección intravenosa de cantidad variable de Tregs-DBY o $1 \cdot 10^6$ B6-Tregs. Se han injertado ratones macho B6 como control positivo (CTRL). Los porcentajes de células donantes CD45.1+ han sido analizados en los PBMC. Los resultados representan la media de 3-6 ratones por grupo \pm error estándar de la media (SEM).

(C) Expresión transitoria de las Tregs-DBY. Se han transferido Tregs-DBY ($1 \cdot 10^5$ células) en un ratón hembra B6 con o sin MO macho (10^7 células). En cada caso, se han sacrificado 2 ratones y se han coloreado sus esplenocitos con CD45.1-PE, APC-CD4 y 7-AAD. El gráfico representa el porcentaje de células CD45.1+ en las células CD4+ 7-AAD-. Los resultados representan la media de 2 ratones por grupo \pm SEM.

Figura 3: La tolerancia con respecto al antígeno macho tiene lugar principalmente con intermedio de mecanismos periféricos.

(A) Se han transferido MO macho de ratones hembra congénitos CD45.1 B6 ($15 \cdot 10^6$ células) en ratones B6 intactos (n=5) o timectomizados (n=5), condicionados con una sola inyección intravenosa única de $1 \cdot 10^5$ Tregs-DBY.

(B) Se han transferido MO macho de ratones salvajes B6 o de ratones CD3 -/- ($15 \cdot 10^6$ células) en ratones congénitos B6 hembra CD45.1 (n=5 para cada grupo), acondicionados con una inyección intravenosa única de $1 \cdot 10^5$ Tregs-DBY.

En (A) y (B), el quimerismo donante expresado en % de células CD45.1+ ha sido analizado en las PBMC a diferentes tiempos después de la transferencia de MO. Las coloraciones FACS representadas (día 60) son representativas de dos experiencias.

Figura 4: El quimerismo macho-hembra altera las células T específicas de los antígenos machos.

10^5 células T Mata-Hari CD8 han sido transferidas en ratones hembra congénitos CD45.1 solo (-) o bien con $10 \cdot 10^6$ MO macho o bien con $10 \cdot 10^6$ MO macho y 10^5 Tregs-DBY.

(A) Se aprecian muestras sanguíneas representativas coloreadas con CD45.2-biotina/APC-streptavidina, CD8-PE y 7-AAD (día 11 después de transferencia).

(B) Se ha mostrado el porcentaje de células Mata-Hari entre las CD8+ totales analizadas en el PBMC en diferentes tiempos. Los resultados representan la media de 2 ratones por grupo \pm SEM.

Figura 5: Desarrollo de un quimerismo mixto a largo plazo y con multi-línea.

(A) Se han transferido células MO macho B6 ($15 \cdot 10^6$ células) en ratones hembra B6 CD45.1 congénitos, acondicionados con 5 inyecciones intravenosas semanales de $2 \cdot 5 \cdot 10^5$ Tregs-DBY (círculos llenos) o una inyección única de $1 \cdot 10^5$ Tregs-DBY (círculos abiertos). El quimerismo donante expresado en % de células CD45.2+ ha sido analizado en las PBMC a diferentes tiempos después de transferencia de MO. Los resultados representan la media de 5 ratones por grupo \pm SEM.

(B, C) Se han sacrificado ratones quimerizados desde más de 300 días (5 inyecciones de Tregs-DBY) y se han analizado las células de diferentes órganos por FACS. Los esplenocitos han sido coloreados con CD45.2-biotina/APC-streptavidina, PE conjugado con anti-CD8, CD4, B220, CD11c y 7-AAD (B). Se han coloreados timocitos (C) con CD4-FITC, CD3-PE, CD45.2-biotina/PECy7-streptavidina y CD8-APC (sin ventana) o con CD3-FITC, CD45.2-biotina/PE-streptavidina, 7-AAD y CD11c-APC (se han mostrado FACS con ventana en CD3-7-AAD).

Figura 6: Fuerte tolerancia con respecto a antígenos macho en ratones quiméricos.

(A, B) Ausencia de actividad CTL anti-macho en ratones quiméricos. Los esplenocitos macho y hembra marcados con $0,5 \mu\text{M}$ y $5 \mu\text{M}$ de CFSE han sido transferidos a ratones hembra de ratones macho o de ratones hembra quiméricos. Las PBMC han sido marcados con PE anti-B220 y 7-AAD en diferentes tiempos y los porcentajes de lisis específica de los esplenocitos macho con respecto a hembras han sido calculados, tal como se detalla en la parte de Material y Métodos. Los resultados representan la media de 2 ratones por grupos \pm SEM.

(C) Ausencia de respuesta anti-macho por la células T. Ratones hembra, macho o quiméricos han sido provocados de manera subcutánea con $50 \mu\text{g}$ de péptido UTY emulsionado en IFA. Los esplenocitos han sido comprobados en

el día 10 con una prueba estándar IFN γ ELISPOT contra diferentes dosis de péptido UTY. Los resultados representan la media de 3 ratones por grupo \pm SEM.

Figura 7: El quimerismo hematopoyético no afecta la respuesta inmune con respecto a terceros antígenos.

5 (A) Ratones hembra quiméricos o naturales han sido provocados de manera subcutánea con 100 μ g de proteína OVA emulsionada en IFA. Los esplenocitos han sido comprobados en el día 10 con una prueba estándar IFN γ ELISPOT contra el epítipo OVA257. Los suelos han sido comprobados por ELISA para los anticuerpos anti-OVA. Los resultados representan la media de 3 ratones por grupo \pm SEM.

10 (B, C) Susceptibilidad de las células macho a la actividad inmune citolítica. Se han comprobado ratones quiméricos de manera subcutánea con la proteína OVA en IFA, tal como en (A) y se han perfundido en el día 8 con esplenocitos macho (barras negras) o esplenocitos hembra (barras grises), pulsados con OVA257 (0,5 μ M de CFSE) o no pulsados (5 μ M de CFSE). Las PBMC han sido analizados en los días 0, 1 y 2. Los resultados representan la media de 2 ratones por grupo \pm SEM. El porcentaje de lisis específica de las células pulsadas con respecto a las no pulsadas ha sido calculado igual que anteriormente (figura 6) con las células macho y hembra.

Figura 8: adopción de injerto secundario de tejidos que expresan el transgén EGFP en ausencia del antígeno DBY.

20 (A) Se han transferido $7 \cdot 10^6$ células MO macho de ratones transgénicos EGFP en huéspedes macho B6, en huéspedes hembra B6 o en huéspedes hembra B6 acondicionados con 10^5 Tregs-DBY. Se ha mostrado el análisis FACS representativo de 3 experiencias (día 150).

(B) Quimerismo donante expresado en % de las células EGFP+ analizado en las PBMC a los 5 meses después de la transferencia de MO EGFP según (A). Los resultados representan la media de 3 ratones por grupo \pm SEM.

25 (C, D) Se han transferido células MO procedentes de ratones macho o ratones hembra EGFPxCD45.1 en ratones hembra EGFP quiméricos o naturales. Se han mostrado los datos representativos de FACS (C) y el porcentaje de células EGFP^{high} y CD45.1⁺ (D) en las PBMC a los 5 meses. Los resultados representan la media de 3 ratones por grupo \pm SEM.

30 (E) Adopción de injerto a largo plazo de injertos de piel hembra EGFP en ratones quiméricos macho-hembra EGFP (n=8, cuadrados llenos). En los controles 5/6 de los ratones quiméricos CD45.2/CD45.1 desprovistos de EGFP (cuadrados llenos) y 4/4 de los ratones B6 hembras (triángulos llenos) han rechazado el injerto de piel hembra EGFP entre el día 12 y el día 16. Los resultados presentados proceden de dos experimentos independientes.

Figura 9: Injerto de células madre hematopoyéticas purificadas sin pre-acondicionamiento del huésped.

35 (A) Análisis por FACS del perfil SP de células de médula ósea en ausencia o en presencia de verapamil. B-D) Establecimiento de quimerismo hematopoyético a lo largo del tiempo. Ratones hembra receptores CD45.1 han sido inyectados por vía intravenosa 4 días seguidos con PBS (CTRL) o con 10^5 células SP procedentes de ratones B6 (SP). El porcentaje de células donantes ha sido analizado en las PBMC por FACS. Datos representativos en el día 28 y en el día 56 (B); seguimiento en el curso del tiempo de ratón a ratón, grupo SP (C) e injerto multi-línea, grupo SP (D). E-F) ratones hembra receptores CD45.1 han sido inyectados por vía intravenosa por 10^5 células SP procedentes de ratones B6 4 días seguidos (4X), 2 días seguidos (2X) o solamente en el día J0 (1X). Se ha indicado el porcentaje de quimerismo en las PBMC (E) y reconstitución multi-línea (F). Los resultados representan la media de 3-8 ratones por grupo \pm el error estándar de la media (SEM).

Figura 10: Células madre hematopoyéticas no apareadas en antígenos menos pueden injertarse en presencia de Tregs específicas.

50 A) Rechazo de CSH macho por ratones hembra. Ratones hembra receptores CD45.1 han sido inyectados por vía intravenosa en el día J0 por 10^5 células SP procedentes de ratones B6 hembra o macho. El porcentaje de células donante se ha analizado en las PBMC por FACS a lo largo del tiempo. Los resultados representan la media de 3 ratones por grupo \pm el error estándar de la media (SEM). B-C) El rechazo es inhibido por Tregs. Ratones hembra receptores CD45.1 han sido inyectados por vía intravenosa en el día J0 con 10^5 células SP procedentes de ratones B6 macho en ausencia (NO) o en presencia de $3 \cdot 10^5$ Tregs-DBY (DBY-Tregs). En el grupo de control (CTRL), los ratones receptores CD45.1 macho han sido inyectados con SP procedentes de ratones B6 macho. El porcentaje de células donante ha sido analizado en las PBMC por FACS en el curso del tiempo. Los resultados representan la media de 3 ratones por grupo \pm el error estándar de la media (SEM).

MATERIAL Y MÉTODOS

60 **Ratones**

Ratones con edades de 6 a 8 semanas C57Bl/6 (CD45.2) y congénicos Ly5.1 (PtprcaPep3b/BoyJ [CD45.1]) han sido obtenidos de Charles River (L'Arbresle, Francia). Ratones Marylin portadores de un receptor a las células T

transgénicas, específicas del péptido DBY (NAGFNSNRANSSRSS) (SEQ ID 1), formando complejo con IA^b (18) han sido cedidos por O. Lantz y las hembras han sido utilizadas en este caso sobre un fondo genético de B6 RAG2+/- (CDTA, Orléans, Francia). Ratones Mata-Hari RAG1 -/- con un TCR transgénico específico del péptido UTY (WMHHNMDLI) (SEQ ID 2) formando complejo con D^b (21) han sido igualmente cedidos por O. Lantz. Ratones hemizigotos transgénicos EGFP (C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP) 1Os/J, Jackson Laboratory, USA) expresan el ADNc de EGFP bajo el control de un promotor de la beta-actina de pollo y el amplificador de citomegalovirus. Ratones EGFP han sido igualmente cruzados con ratones CD45.1 para generar ratones EGFP x CD45.1. Las dos especies han sido criadas en nuestras instalaciones de animales. Todas las experiencias de animales han sido realizadas según directrices institucionales para el cuidado y utilización de animales.

Análisis por FACS (Clasificación de células activada por fluorescencia) ("Fluorescence-activated cell sorting")

Todos los reactivos eran de la firma BD-PharMingen (Le Pont de Claix, Francia). Los glóbulos rojos han sido eliminados por choque hipotónico con tampón PharMLysis. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) han sido incubadas durante 10 minutos a 4°C con anticuerpos 2.4G2 contra los receptores FcII/III, a continuación se han coloreado 30 minutos en PBS – 0,1% de suero de albúmina bovina con cantidades saturantes de combinaciones de los mABs siguientes: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD11c, anti-B220 y anti-CD45.1 conjugados con fluoresceína isotiocianato (FITC), anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD25, anti-Grl, anti-CD45.2, anti-NK1.1 y anti-Vβ6 conjugados con ficoeritrina (PE), anti-CD45.2 conjugados con biotina y streptavidina conjugada con alofococianina (APC). Las células muertas han sido excluidas utilizando una coloración en la 7-actinomicina D (Sigma Chemical Co, St., MO). El análisis por citometría de flujo ha sido realizado en un FACSCalibur utilizando el programa CELLQuest (BD).

Purificación de las células T reguladoras

Los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos han sido incubados con cantidades saturantes de anti-CD25 biotiniladas (7D4) y microesferas de streptavidina (Miltenyi Biotec, Paris, Francia) seguido de separación magnética de las células utilizando columnas LS (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células han sido coloreadas a continuación durante 30 minutos sobre hielo con streptavidina-FITC, seleccionadas en un MoFlow (DakoCytomation, Freiburg, Alemania) e inyectadas en la vena de la cola en 0,2 ml de PBS.

Análisis de la inhibición in vitro

Células T CD45.2 CD4+CD25- purificadas, procedentes de ratones Marylin, han sido marcadas con CFSE (Molecular Probes, Cambridge, Reino Unido). De modo breve, se han incubado 2×10^7 células/mL con 2 μM de CFSE a 37°C durante 10 minutos en RPMI 1640 antes de su lavado 2 veces. A continuación se han cultivado $5 \cdot 10^3$ células en placas con fondo en U con $5 \cdot 10^5$ esplenocitos macho de ratones congénicos CD45.1 y diferentes proporciones de Tregs CD4+CD25+ procedentes de ratones B6 o Marylin. En el día 3, las células han sido coloreadas con CD4-PE, 7-AAD y CD45.2-biotina/streptavidina-APC antes de análisis por FACS. La división (en porcentaje) de las células que responden a CD25- ha sido determinada como porcentaje de las células que han sufrido por lo menos dos divisiones con respecto a la cantidad total de células que responden que se habían dividido en ausencia de Tregs.

Transplante de médula ósea

La médula ósea donante ha sido extraída con PBS de los fémures y de las tibias. Los glóbulos rojos han sido lisados con tampón ACK y las células de la médula ósea (BM) han sido inyectadas en la vena de la cola en 0,2 mL de PBS 1x en presencia o ausencia de Tregs CD4+CD25+.

Análisis de la mortalidad in vivo

Células esplénicas C57Bl/6 hembra y macho o células esplénicas de varios sexos portadoras o no de 10 μM OVA257 (2×10^7 /mL en RPMI 1640) han sido incubadas con 5 μM o 0,5 μM CFSE (Molecular Probes, Cambridge, Reino Unido) a 37°C durante 10 minutos. Después de lavado, las células han sido mezcladas y 2×10^7 células han sido inyectadas en la vena de la cola en 0,2 mL PBS 1x. Las PBMC han sido recogidas a partir de ratones individuales a intervalos de tiempo regulares, marcadas con PE anti-B220 y 7-AAD y analizadas para la expresión CFSE por FACS. El porcentaje de lisis específica de las células macho con respecto a las hembra (m/f) ha sido calculado en las células B220+ a cada tiempo t_x de la manera siguiente: % de lisis específica = $[(m/f)_{t_0} - (m/f)_{t_x}] / [(m/f)_{t_0}] \times 100$. Las cantidades de m y f se han medido en puertas estándar situadas en los picos de los histogramas CFSE macho bajo y hembra alto.

Respuestas inmunes anti-ovalbumina

Los ratones han sufrido una provocación sub-cutánea en la base de la cola con 100 μg de proteína ovalbumina

(Sigma) o 50 µg del péptido OVA257 (SIINFEKL) (Epytop, Nîmes, Francia), emulsionadas en un coadyuvante de Freund incompleto (Difco laboratories, BD). Se han realizado análisis por IFN γ -ELISPOT y ELISA a los 8-10 días a lo más tardar, tal como se ha descrito (17). De forma breve, para el análisis en IFN γ -ELISPOT se han cultivado esplenocitos recién aislados (2×10^6 / pocillo y diluciones en serie) en medio completo con o sin 10 µM de OVA257.

5 Para cada ensayo, se ha añadido Con A (5 µg/ml) como control positivo. Después de 20 h, se han revelado los spots y se han contado utilizando un Bioreader 2000 (BIO-SYS, Karben, Alemania). Las unidades de formación de los spots (SFU) se han representado después de sustracción de los valores de ruido de fondo obtenidos con esplenocitos no pulsados.

10 **Análisis para PCR en tiempo real**

Se han extraído los ARN totales utilizando el kit RNAeasy Micro Kit (QIAGEN) a partir de 10^5 células aisladas de cada población. El ADNc ha sido sintetizado a partir de cada lote de ARN utilizando la transcriptasa inversa MuLV y hexámeros aleatorios como cebos (Applied Biosystems). La PCR en tiempo real ha sido realizada sobre un ABI prism 7700 utilizando Absolute QPCR ROX Mix (ABgene) en doble y los ciclos medios de umbral (C_t) de los dobles han sido utilizados para calcular el nivel de ARNm Foxp3 en cada población. Todos los niveles indicados de ARNm han sido normalizados con respecto al nivel de ARNm mPO con mPO=1. Los cebos de PCR han sido los siguientes:

- Foxp3 :

5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-3' (SEQ ID 3)

5'-GCTGATCATGGCTGGGTTGT-3' (SEQ ID 4)

5'-ACTTCATGCATCAGTCTCCACTGTGGAT-3' (SEQ ID 5)

- mPO :

5'-CTCCAAGCAGATGCAGCAGA-3' (SEQ ID 6)

5'-ATAGCCTTGCGCATCATGGT-3' (SEQ ID 7)

5'CCGTGGTGCTGATGGGCAAGAA-3' (SEQ ID 8).

20 **Injerto de piel**

Se han preparado injertos de piel de 1 cm de diámetro a partir de dorsos de ratón hembra EGFP y se han injertado en los flancos de receptores, utilizando un adhesivo tisular (3M Vetbond, Francia) en lugar de costura quirúrgica. Los vendajes han sido retirados en el día 5. Los injertos se han seguido cada 2 ó 3 días hasta el día 20, y después cada semana, y se han registrado como rechazados cuando persistía menos de 10% de tejido viable.

25

25 **Purificación de las CSH**

Las células de tuétano han sido preparadas a partir de fémures y tibias. Después de lisis de los glóbulos rojos por choque hipotónico, las células son resuspendidas en 10^6 /ml en PBS suplementado con 1% de suero autólogo y marcadas con 6,5 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma) durante 90 minutos a 37°C. Los controles son incubados en presencia de 100 µM de verapamil. Las células son entonces lavadas y marcadas con 7-actinomicina D (7-AAD, Sigma Chemical Co., St., MO). La selección y análisis de las células excluyendo Hoechst (SP) ha sido hecho sobre seleccionadores MoFlow (DakoCytomation, Freiburg, Alemania). Las células SP cuentan en general para 0,04% a 0,05% de las células de tuétano totales.

30

35 **RESULTADOS**

Actividad antígeno-específica de células Treg CD4+CD25+ de ratones Marylin

40 En la cepa B6, los ratones hembra rechazan los injertos de MO macho apareados H2, generando respuestas de las células T CD4 contra un péptido DBY en el contexto de moléculas I-A^b y de respuestas dependientes de helper CD8 contra los epítomos restringidos UTY y SMCY (11). Como fuentes de Treg dirigidas contra un antígeno macho determinado se han aislado Tregs CD4+CD25+ a partir de ratones Marylin expresando un TCR transgénico, específico para el epítomo macho restringido I-A^b DBY NAGFNSNRANSSRSS (SEQ ID 1) (18).

45 Fenotípicamente, los ratos hembra RAG+/- Marylin poseen una población distinta de células T CD4+CD25+ (DBY-Tregs) expresando el transgén V β 6 TCR y representando 6-11% de las células T CD4+ totales (Figura 1A). El fenotipo de estas células T reguladores ha sido confirmado por la cuantificación del marcador de alineación/diferenciación para las Tregs recientemente identificado FoxP3 (Figura 1B). Tal como se ha detectado por PCR en tiempo real, las CD25+ purificadas a partir de ratones Marylin expresan niveles de FoxP3 similares a los observados en las Tregs B6 (B6-Tregs) y 80 veces más elevados que los que se han encontrado en células T CD25-

50

La especificidad y la función supresiva de las DBY-Treg ha sido caracterizada *in vitro* y la inhibición de la proliferación de las células T nativas CD4+ CD25- de Marylin (DBY-T-helper), estimuladas con esplenocitos macho y marcadas con CFSE, ha sido objeto de seguimiento. Tal como se ha mostrado en la figura 1C, las DBY-Tregs inhiben la proliferación de las DBY-T-helper de manera dependiente de la dosis, mientras que las B6-Tregs no específicas son ineficaces para cualquier relación.

55

A continuación, la especificidad antigénica de las DBY-Tregs ha sido verificada *in vivo* por su capacidad de proliferación en receptores hembra provocadas con esplenocitos hembra o macho. Tal como se ha medido con experimentos de dilución CFSE, se ha observado una expansión vigorosa de las DBY-Tregs en el día 6 (**figura 1D**). Esto ha sucedido solamente después de inmunización con esplenocitos macho. Las B6-Tregs han permanecido esencialmente sin división en todas las condiciones (**figura 1D**). Como conclusión, las DBY-Tregs de ratones Marylin se han mostrado eficaces en los experimentos de supresión *in vitro* y se han activado de forma macho específica *in vivo*.

Inducción de quimerismo hematopoyético mixto utilizando las DBY-Tregs

La capacidad de estas Tregs monoespecíficas en inducir quimerismo mixto sin preacondicionamiento ha sido explorada. Se han utilizado células DBY-Tregs para promover la adopción directa de injerto de una dosis moderada de MO macho en huéspedes hembra B6, en ausencia de mieloablación y de inmunosupresión. Como control en ausencia de respuestas inmunes, la inyección de $8 \cdot 10^6$ MO congénicos CD45.1+ ha llevado a una quimerización de 0,3-0,4% en ratones macho CD45.2+ (**figura 2A**). El mismo injerto ha sido rechazado por completo en ratones hembra CD45.2+ en el día 28. En estos ratones hembra, la aceptación de injerto aparecía ya comprometida en el día 14 y prácticamente ausente en el día 21 (resultados no mostrados). Tal como era esperado, la perfusión en las hembras de células DBY-Tregs de manera concomitante con las MO macho, ha suprimido el rechazo del injerto y ha permitido conseguir cerca del 0,4% de quimerismo (**figura 2A**). La dosis de DBY-Tregs ha sido modulada a continuación y se ha observado un efecto de todo o nada en la aceptación de injerto de las MO entre $5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^3$ DBY-Tregs (**Figura 2B**). De manera importante, las dosis de DBY-Tregs por encima del umbral han promocionado una aceptación de injerto máxima en todos los rotores hembra, alcanzando un nivel idéntico al de los receptores macho controlados, tratados con la misma cantidad de células MO. Como para la supresión *in vitro*, una dosis más fuerte de 10^6 B6-Tregs no específicos era ineficaz (**figura 2B**). Como conclusión, estos resultados subrayan el potencial extremo de las células T CD4+CD25+ específicas de DBY para promover el quimerismo hematopoyético mixto.

Teniendo en cuenta el número extremadamente reducido de células DBY-Tregs requeridas, se ha planteado la cuestión de su proliferación paralela a la aceptación de injerto de las MO macho. Efectivamente, se ha observado una expansión de 10-15 veces las DBY-Tregs en la rata al día 10 (**figura 2C**). Esto está de acuerdo con su fuerte capacidad proliferativa observada contra los esplenocitos macho *in vivo* (**figura 1D**). De modo interesante, las células DBY-Tregs vuelven a niveles más bajo en el día 16 sin comprometer la aceptación de injerto a largo plazo de las MO en el día 28 (**figura 2B**), sugiriendo que otros mecanismos, además de la supresión activa por las células DBY-Tregs, intervienen más tarde.

Son suficientes mecanismos periféricos para inducir el quimerismo mixto

El trasplante de un macho alogénico requiere frecuentemente un acondicionamiento que lleva a la generación por el timo de un repertorio de células T parcialmente o totalmente nuevo, como causa principal de la inducción de la tolerancia. En el sistema, según la invención, sin mieloablación ni inmunosupresión, las células T maduras periféricas del huésped son la primera barrera que se debe franquear. Para examinar si la inducción de la tolerancia iniciada por las DBY-Tregs implica únicamente mecanismos periféricos, se han transferido MO macho y DBY-Tregs conjuntamente a ratones naturales o bien a ratones timectomizados. Se ha demostrado que los dos grupos muestran un quimerismo comparable en todos los ratones al cabo de dos meses (**figura 3A**), demostrando que son suficientes mecanismos periféricos para promover el quimerismo en los ratones tratados con DBY-Tregs.

Para determinar si el tuétano óseo donador requiere linfocitos donantes maduros para inducir la tolerancia, se han transplantado MO macho CD3-/- desprovistos simultáneamente de linfocitos T CD25- y CD25+ en ratones hembra CD45.1 acondicionados con DBY-Tregs. Tal como se ha mostrado en la **figura 3B**, la ausencia de células T maduras donantes no tiene consecuencia alguna en la aceptación de injerto de las MO.

Junto con la expansión transitoria de DBY-Tregs, estos resultados incitan a examinar el desarrollo de las células T CD8+ anti-macho después de transferencia de MO y de la perfusión de las células Tregs. Para ello, se ha utilizado el modelo de ratones Mata-Hari que expresan un TCR transgénico específico del péptido UTY D^d restringido WMHHNMDLI (SEQ ID 2) (**21**). Las células T CD8+ de Mata-Hari han sido transferidas y trazadas en ratones hembra congénicos CD45.1, solos, perfundidos con MO macho o perfundidos con MO macho más DBY-Tregs. En el día 11 después de la transferencia de MO, la proporción de células T CD8+ de Mata-Hari ha aumentado notablemente en comparación con las células no estimuladas alcanzando a $2,6 \pm 0,4\%$ de células T CD8+ en el día 11 (**Figura 4A-B**). Por el contrario, en presencia de células DBY-Tregs en las células Mata-Hari representan solamente $0,1 \pm 0,03\%$ de las células T CD8+. Incluso de manera más tardía, cuando las DBY-Tregs eran difícilmente detectables (**figura 2C**), las células Mata-Hari no han superado nunca $0,1 \pm 0,08\%$ de las células T CD8+ totales en el día 22 (**figura 4B**). Estos resultados demuestran que la proliferación y función de las células T CD8+ específicas de los antígenos macho son alteradas al inicio de la inducción de la quimerización mixta.

Desarrollo de quimerismo mixto a largo plazo y multi-línea

Las DBY-Tregs inhibían de manera efectiva la respuesta inmune anti-macho promocionando la aceptación de injerto de MO a corto plazo, pero su expansión transitoria podía ser únicamente asociada a una supresión de corta

5 duración, comprometiendo la aceptación de injerto a plazo más largo de CSH y la tolerancia específica de donante. El efecto de una simple inyección de 10^5 DBY-Tregs que corresponde a dos veces la dosis umbral determinada en la **figura 2B**, ha sido comparada con 5 inyecciones semanales de $2-5 \cdot 10^5$ DBY-Tregs en el establecimiento de un quimerismo a largo plazo (**Figura 5A**). Los dos protocolos mantienen niveles sostenidos y elevados de quimerismo donante en los linfocitos de sangre periférica entre 3 y 4 veces ($9,1 \pm 1,8$ y $12,3 \pm 1,0$, respectivamente) con un aumento gradual a 9 meses ($21,8 \pm 2,6$ y $18,0 \pm 1,7$, respectivamente) y una aceptación de injerto a largo plazo sistemática a 18 meses para todos los ratones. Ninguna aceptación de injerto de MO ha tenido lugar con dosis elevadas de 10^6 B6-Tregs no específicas, incluso pre-activadas con anticuerpos anti-CD3 (resultados no mostrados). El quimerismo ha sido obtenido en todos los compartimientos hematopoyéticos (CD4+, CD8+, B220+, NK1.1+ y CD11c+) en el 100% de los receptores, incluso en los acondicionados con una dosis única reducida de 10^5 DBY-Tregs (**Figura 5B**). De manera importante para el mantenimiento del quimerismo a largo plazo, la médula espinal ha sido clonizada igualmente por CSH donantes, tal como se ha definido por su fenotipo Lin-Sca+c-Kit o la exclusión de Hoechst de la población lateral (resultados no mostrados). Igualmente, se encontraron presentes en el timo células dendríticas donantes CD11c+, así como timocitos de desarrollo normal, tal como se ha demostrado por los porcentajes de CD4+, CD8+ y CD4+CD8+ (**Figura 5C**). Este resultado se refiere a que el repertorio de células T generadas en el timo receptor puede ser educado por las células hematopoyéticas simultáneamente con origen receptor y donante.

Tolerancia consistente con respecto a los antígenos macho e inmunocompetencia con respecto a antígenos terceros

25 Creando un quimerismo a largo plazo de multi-línea se ha esperado una tolerancia consistente con respecto a todos los antígenos presentes en el injerto. Para confirmarlo, ratones que mostraban un mínimo de 3-5% de quimerismo han sido provocados con diferentes formulaciones de antígeno macho. Análisis citotóxicos *in vivo* han sido realizados profundiendo $5 \cdot 10^6$ esplenocitos B6 macho o hembra marcados con dos niveles de CFSE. En este sistema, ratones hembra naturales han sido sensibilizados y han reaccionado selectivamente en contra de los esplenocitos macho en el día 10 después de la perfusión, eliminando prácticamente todas las células macho en el día 16, mientras que no se ha observado citotoxicidad alguna en los huéspedes macho (**figura 6A**). Tal como se esperaba, los ratones quimerizados no han mostrado rechazo alguno de las dianas macho durante los 29 días del experimento (**figura 6B**), indicando que la tolerancia periférica a largo plazo con respecto a los antígenos macho había sido conseguida.

Esta tolerancia podía ser debida a un proceso de regulación activa y mantenido y/o una alteración/supresión de las células T anti-macho. Una supresión mantenida por las DBY-Tregs parecía improbable puesto que éstas eran difícilmente detectables, encontrándose por debajo del umbral de detección por FACS en sangre y en todos los órganos linfoides primarios o secundarios comprobados varios meses después de transferencia de MO (resultados no mostrados). Para aclarar este punto, las respuestas a los epítopos CD8 y CD4 han sido desacopladas para evitar una supresión inmune potencial por las DBY-Tregs residuales. De este modo, se han provocado ratones con el epítipo bien caracterizado UTY en presencia del coayudante fuerte IFA. No se ha detectado respuesta alguna anti-macho, tal como se ha demostrado por la ausencia de respuesta IFN γ específica de péptido en una prueba ELISPOT (**figura 6C**).

Para excluir la posibilidad de un estado general de falta de respuesta en las quimeras, la respuesta inmune con respecto a un tercer antígeno, ausente de injerto inicial, ha sido examinada. Después de inmunización con OVA, la frecuencia de las células T productoras de IFN γ específicas de antígeno y los títulos de los cuerpos IgG específicos de OVA, han sido objeto de seguimiento. Los ratones quiméricos y controlados han respondido de manera igual a este antígeno (**figura 7A**). Finalmente, se ha determinado si la tolerancia específica de los antígenos macho ha afectado el rechazo de esplenocitos macho cargados con el péptido OVA257. Utilizando experiencias de citotoxicidad *in vivo* se ha descubierto que los esplenocitos macho se ha descubierto que los esplenocitos macho portadores del péptido eran tan susceptibles a la lisis CTL como las células hembra portadoras del péptido (**figuras 7B, C**). De modo importante, a pesar de una fuerte citotoxicidad contra las células macho portadoras de antígenos terceros, el quimerismo a largo plazo no quedaba afectado (resultados no mostrados).

En conclusión, se ha observado una tolerancia consistente con respecto a todos los antígenos inicialmente presentes en el injerto, tales como la proteína UTY, pero no con respecto a los antígenos terceros introducidos posteriormente. Además, esta tolerancia no afecta a la inmunidad normal dirigida contra las células diana portadoras.

Aplicación a la aceptación de injerto secundario de tejidos de ingeniería

La ausencia de respuestas inmunitarias observadas en este caso, con respecto a todos los antígenos macho en los ratones quiméricos es parecida a la tolerancia a largo plazo específica de transgenes necesaria para las aplicaciones de transferencia de gen con toda seguridad. Por lo tanto, se ha decidido extender esta tolerancia

consistente a transgenes extraños estableciendo el quimerismo molecular correspondiente en más proteínas macho. Se ha escogido introducir la proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) y como fuentes MO modificadas para expresar la proteína EGFP (ACTB-EGFP), de ratones transgénicos macho C57BL/6-TgN. Tal como se ha mostrado anteriormente, con experimentos de injerto de piel (8), EGFP y ciertamente otros antígenos menores asociados precipitan el rechazo de las células MO macho EGFP^{high} en los huéspedes macho (figura 8A). Tal como se esperaba, el rechazo de todas las células MO macho EGFP ha tenido lugar en las hembras no tratadas, probablemente por razón de una fuerte respuesta anti-macho (figura 8A). Por el contrario, hembras acondicionadas con 10⁵ DBY-Tregs han mostrado un quimerismo estable hasta 10% a los 5 meses con una fuerte expresión del transgén EGFP (figuras 8A, B). Estos resultados demuestran que una simple perfusión de DBY-Tregs dirigida contra un único epítipo MHC de clase II de DBY es suficiente para inducir tolerancia a largo plazo con respecto a todos los demás antígenos menores presentes en el injerto.

Finalmente, se ha determinado si la fuerte tolerancia establecida con respecto a todos los antígenos donantes presentes en el primer injerto se podía ejercer en ausencia de expresión de DBY. Para ello, ratones hembra B6 quimerizados con un tuétano óseo macho EGFP (CD45.2+) y DBY-Tregs a los 5 meses (figuras 8A, B) han sido transplantados una segunda vez con células MO macho o EGFP hembra que llevan un marcador trazable CD45.1. Se ha descubierto que las células CD45.1+ EGFP^{high} de origen macho o hembra estaban insertadas de manera equivalente mostrando que la tolerancia se aplicaba a todos los antígenos menores, incluso en ausencia de coexpresión DBY (Figuras 8C, D).

Para extender estos resultados al marco estricto del trasplante de órganos, se han utilizados injertos de piel como injertos secundarios. Ratones hembra naturales B6 han rechazado el injerto de piel EGFP rápidamente entre los días 12 a 16 (figura 8E). Por el contrario, 100% de los ratones hembra B6 quimerizados con células MO EGFP macho han tolerado su implante aceptando el injerto de piel indefinidamente (n=8). De modo importante, ratones controlados quimerizados con células MO macho CD45.2, que no se han hecho tolerantes con respecto a EGFP, no han aceptado este aloinjerto de un EGFP tercero (5/6), lo que muestra la fuerza y la especificidad de la tolerancia creada con respecto al transgén EGFP.

Implante de células madre hematopoyéticas purificadas sin pre-condicionamiento del huésped.

Los inventores han escogido purificar las células madre hematopoyéticas en cuanto a su capacidad de excluir el Hoechst. Solamente 5 de estas células llamadas población secundaria (SP) y cuyo genotipo es Lin⁻ ckit⁺ Thy1.1^{low} Sca-1⁺ Flk2-CD34⁻ pueden reconstituir eficazmente huéspedes irradiados. En este caso, las células SP escogidas a partir de cuatro ratones CD45.2, en cuanto a su capacidad de excluir el Hoechst (figura 9A), han sido inyectadas por vía intravenosa en ratones congénitos CD45.1 en ausencia de cualquier acondicionamiento mieloablativo. Mientras que 4 semanas después del trasplante, menos del 0,5% de quimerismo ha sido observado en la sangre periférica (figura 9B), este porcentaje aumenta rápidamente alcanzando más del 2% a las 6 semanas. Se debe observar que este quimerismo se mantiene más de un año y en todos los receptores (figura 9C) y concierne las líneas mono/gránulocitarias, así como B y T (figura 9D). Los inventores han hecho variar igualmente la dosis de células SP inyectadas y han descubierto que se podía conseguir un quimerismo máximo con 2·10⁴ células SP purificadas a partir de 2 donantes (figura 9E). Inyectar 1·10⁴ células SP, purificadas a partir de una sola médula donante, conduce al establecimiento de un quimerismo en todos los ratones pero con porcentaje de injerto variables, revelando que los nichos hematopoyéticos vacíos parecen todavía existir. El injerto mult-líneas es casi idéntico en todas estas bases distintas (figura 9F).

Células madre hematopoyéticas no apareadas sobre antígenos menores pueden injertarse en presencia de Tregs específicas.

Tal como se esperaba en el sistema de rechazo macho/hembra, CSH macho transplantadas en ratones hembra son rechazadas, en oposición a la combinación compatible con CSH hembra (figura 10A). Por el contrario, el simple acondicionamiento de los ratones receptores por células DBY-Tregs es suficiente para inhibir este rechazo, conduce al mismo nivel que los injertos de los ratones de control y al establecimiento de un quimerismo hematopoyético a más de un año (figura 10B-C). Esta inmunosupresión es totalmente específica, puesto que el mismo número de Tregs no específicos del antígeno macho son incapaces de engendrar dicho efecto y depende de las propiedades reguladoras de las células T inyectadas, puesto que células CD4+CD25⁻ purificadas a partir del mismo ratón Marylin son ineficaces (datos no mostrados). Se ha demostrado de este modo que los resultados obtenidos con el tuétano óseo pueden ser reproducidos a partir de CSH purificados.

Como resumen, se ha demostrado que un acondicionamiento mínimo con un pequeño número de CD4+CD25⁺ dirigidas contra un solo epítipo de DBY favorece la aceptación de injerto de células MO y establecen una tolerancia antígeno-específica con respecto a múltiples antígenos menores histocompatibles en adultos idénticos. De modo interesante, un injerto secundario que lleva uno de estos antígenos menores, tal como el transgén EGFP, persiste, tanto si el antígeno original que ha inducido la tolerancia se encuentra presente o no. Esto abre perspectivas para la aplicación terapéutica del quimerismo mixto para condicionar el huésped para el injerto posterior de tejidos o para la transferencia de genes (6). Tregs mono-específicos pueden ser ahora multiplicados *in vitro* (19) y la generación de

novo de Tregs específico de antígenos ha sido recientemente obtenida en el hombre (20). Con la llegada de estos protocolos, las Tregs monoespecíficas podrían facilitar nuevas oportunidades para sustituir los tratamiento inmunodepresivos mieloablativos y potencialmente mortales para el trasplante de MO o de CSH autólogos modificados genéticamente antes de la transferencia de genes.

REFERENCIAS

1. Bessis, N. et al. *Gene Ther* **11**, Suppl 1:S10-17. (2004).
2. Jooss, K. et al. *Gene Ther* **10**, 955-963. (2003).
3. Brown, B. D. et al. *Blood* **100**, 1133-1140. (2002).
4. Herzog, R. W. et al. *Mol Ther* **4**, 192-200. (2001).
5. Sarukhan, A. et al. *J Virol* **75**, 269-277. (2001).
6. Sykes, M. *Immunity* **14**, 417-24. (2001).
7. Nikolic, B. et al. *Diabetes* **53**, 376-83. (2004).
8. Andersson, G. et al. *Mol Ther* **8**, 385-91. (2003).
9. Wekerle, T. et al. *Nat Med* **6**, 464-9. (2000).
10. Lin, C.Y. et al. *Nat Immunol* **3**, 1208-13. (2002).
11. Simpson, E. et al. *Eur J Immunogenet* **28**, 505-13 (2001).
12. Waldmann, H. & Cobbold, S. *Science* **305**, 209-12. (2004).
13. Walsh, P.T et al. *J Clin Invest* **114**, 1398-403. (2004).
14. Taylor, P.A. et al. *Blood* **104**, 3804-12. (2004).
15. Trenado, A. et al. *J Clin Invest* **112**, 1688-96. (2003).
16. Joffre, O. et al. *Blood* **103**, 4216-21. (2004).
17. Gross, D.A. et al. *Blood* **102**, 4326-8. (2003).
18. Thery, C. et al. *Nat Immunol* **3**, 1156-62. (2002).
19. Tarbell, K.V. et al. *J Exp Med* **199**, 1467-77. (2004).
20. Walker, M.R. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005).
21. Valujskikh, A. et al. *Nat Immunol* **3**, 844-51. (2002).

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende:
 - células T reguladoras CD4+CD25+ específicas de uno o varios antígenos menores de histocompatibilidad; y
 - células madre que no son células madre directamente procedentes de embriones humanos; ventajosamente hematopoyéticas, portadoras, como mínimo, de dicho antígeno.
2. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1, caracterizada porque las células T reguladoras CD4+CD25+ son monoespecíficas.
3. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque las células T reguladoras CD4+CD25+ y/o las células madre son autólogas.
4. Composición farmacéutica, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el antígeno menor es un antígeno menor macho, preferentemente escogido entre el grupo que comprende DBY, UTY y SMCY.
5. Composición farmacéutica, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque las células madre son traducidas por un vector portador de un gen que codifica el antígeno menor.
6. Composición farmacéutica, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque las células madre llevan, por lo menos un transgén, ventajosamente introducido y con ayuda de un vector vírico.
7. Composición farmacéutica, según una de las reivindicaciones anteriores como composición de combinación para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo en terapia celular o génica.
8. Utilización de una composición farmacéutica, según una de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento destinado a aumentar la tolerancia inmunitaria en un huésped histocompatible.
9. Utilización, según la reivindicación 8, caracterizada porque la tolerancia inmunitaria es aumentada en vistas de la expresión estable del transgén.
10. Utilización, según la reivindicación 8 ó 9, caracterizada porque la tolerancia es aumentada a efectos de trasplante de un tejido procedente de un donante portador de, como mínimo, dicho antígeno.
11. Utilización, según la reivindicación 10, caracterizada porque el trasplante del tejido es un trasplante de piel.

1/5

Figura 1

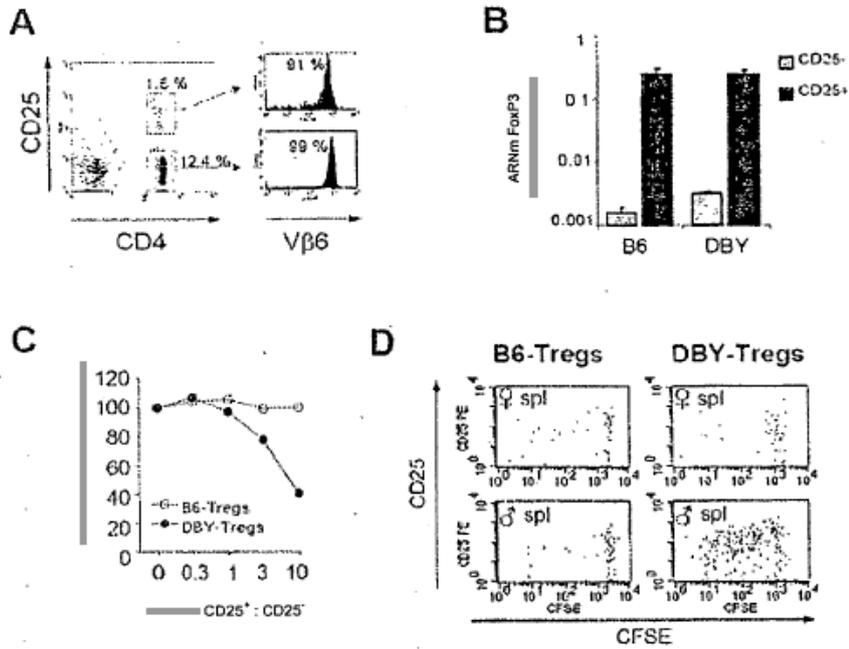
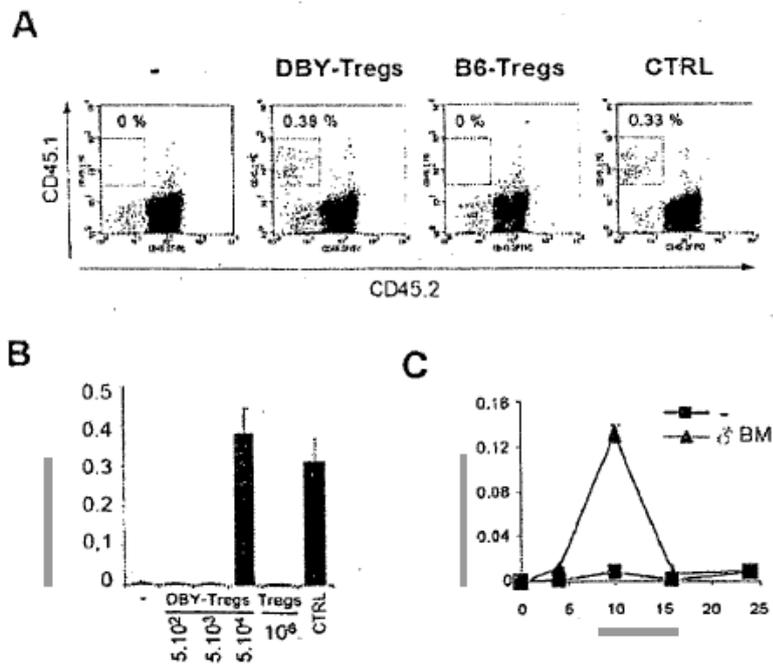


Figura 2



2/5

Figura 3

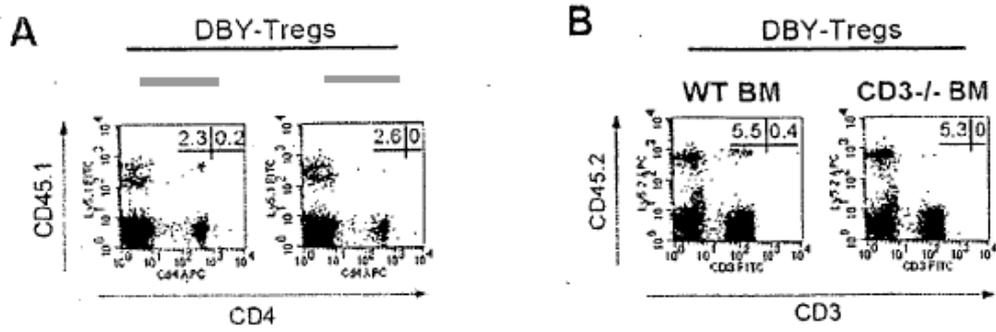
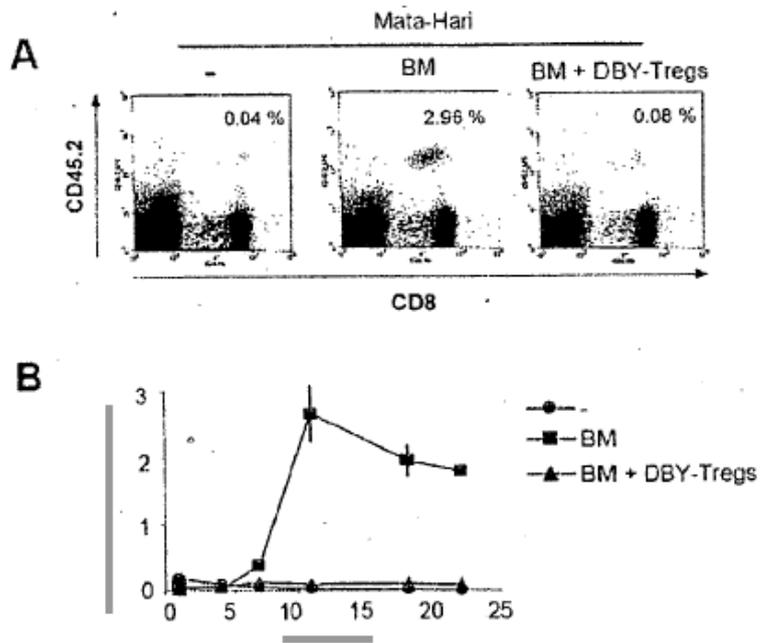


Figura 4



3/5

Figura 5

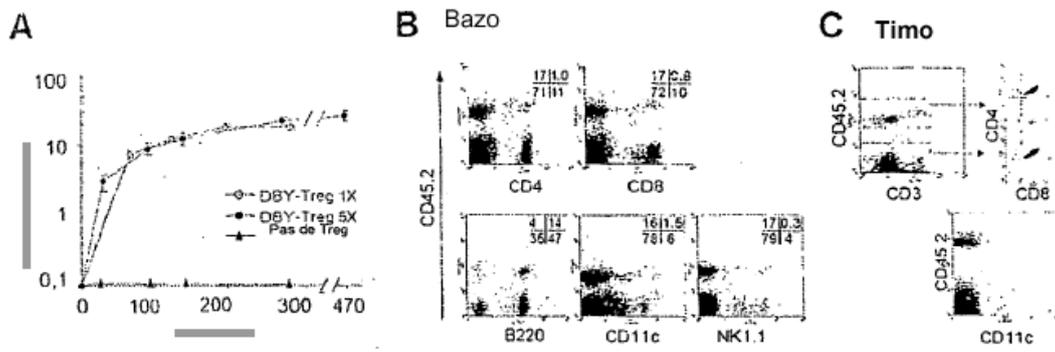
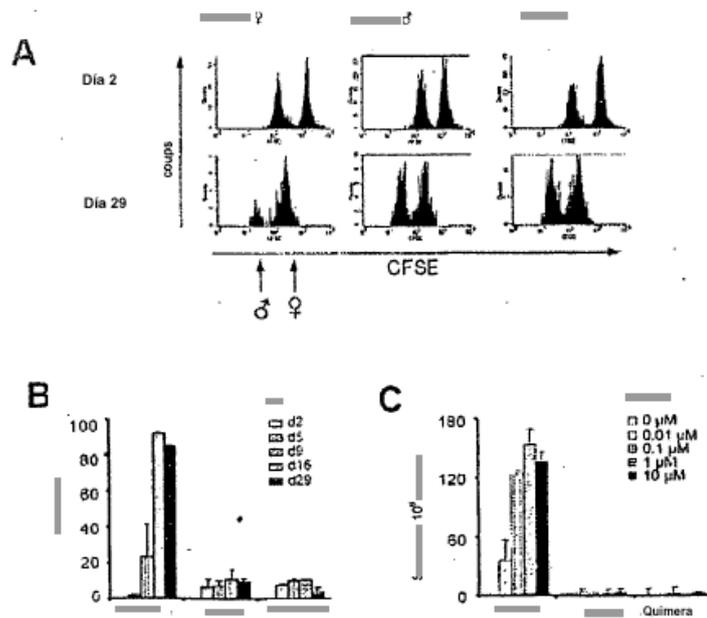


Figura 6



4/5

Figura 7

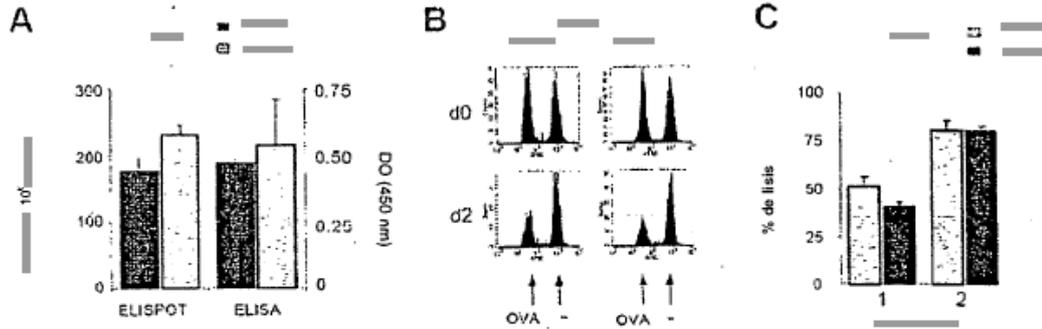
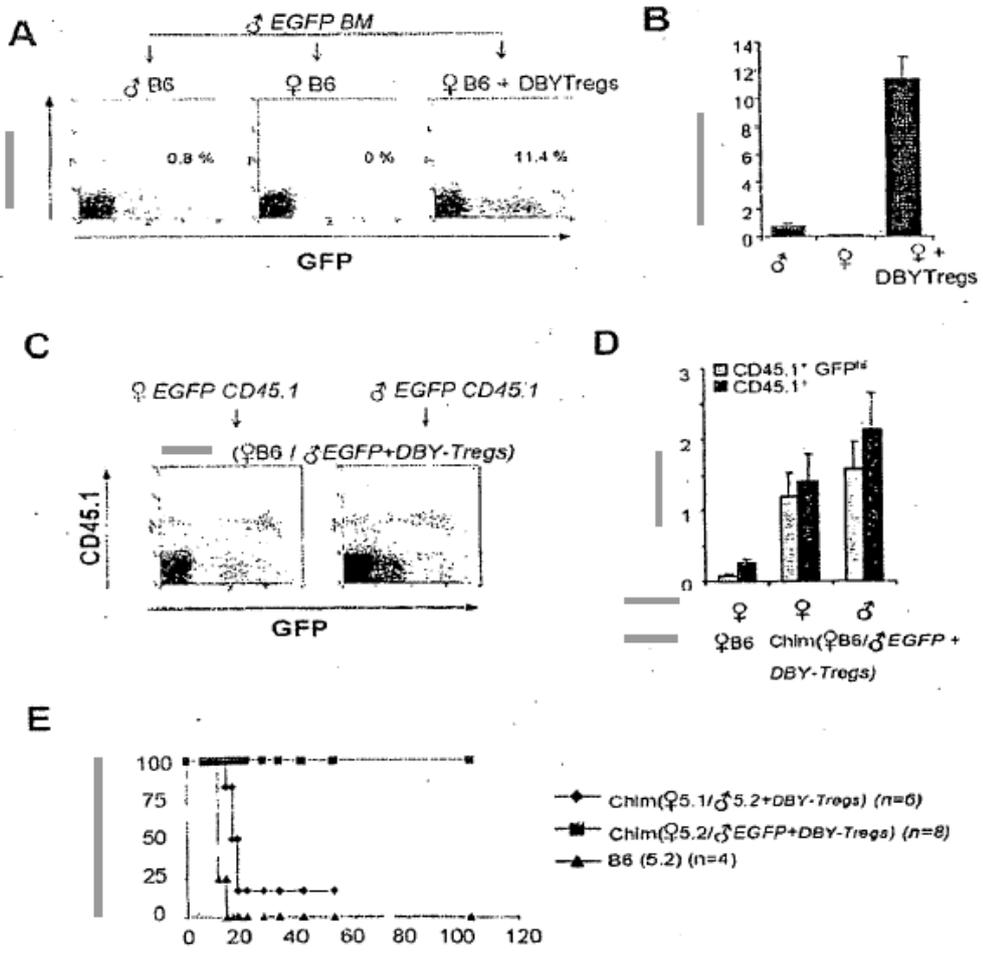


Figura 8



5/5

Figura 9

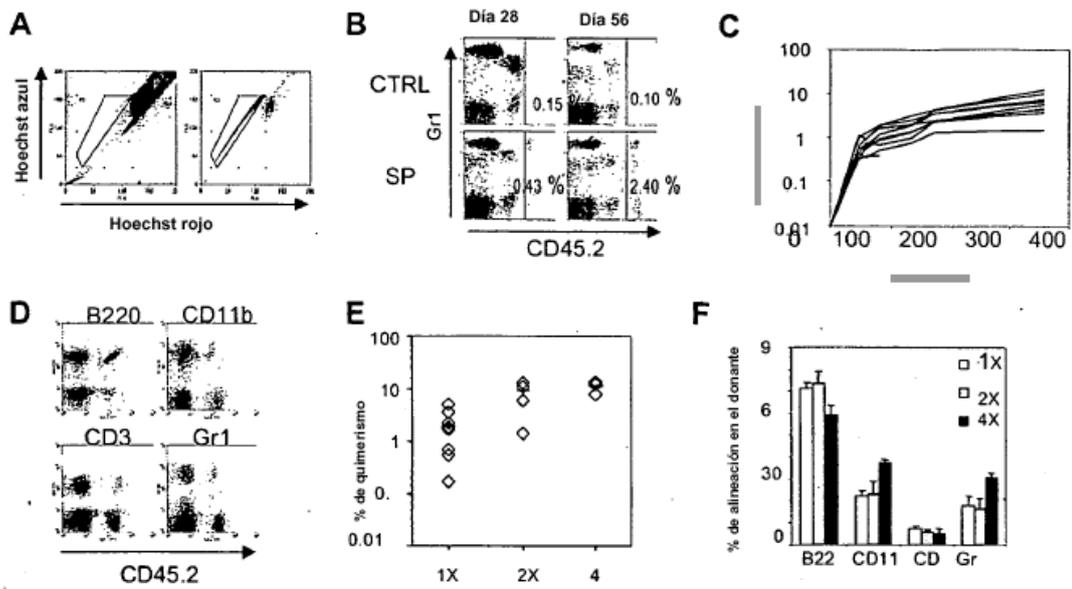


Figura 10

