

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 082**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07848526 .5**
96 Fecha de presentación: **13.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2094837**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Uso de inhibidores PI3K y AKT para inducir la expresión de FOXP3 y generar células T reguladoras**

30 Prioridad:
14.12.2006 GB 0624999
14.12.2006 US 874683 P
18.04.2007 US 912448 P
19.04.2007 GB 0707609

73 Titular/es:
**Medical Research Council
2nd Floor, David Phillips Building Polaris House,
North Star Avenue
Swindon, SN2 1FL , GB**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.08.2012

72 Inventor/es:
MERKENSCHLAGER, Matthias Michael

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.08.2012

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 386 082 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

Uso de inhibidores PI3K y AKT para inducir la expresión de FOXP3 y generar células T reguladoras.

Campo de la invención.

5 La invención se refiere a los nuevos usos de inhibidores de la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K). En particular, la invención se refiere a nuevos métodos para la inducción de la expresión de Foxp3 en las células T.

Fundamento de la invención.

10 Las células T reguladoras (células Treg) son esenciales para prevenir la autoinmunidad y la patología inmunológica, que son causadas por las células T efectoras en ausencia de células Treg. Las intervenciones inmunológicas destinadas a restringir las células T efectoras (para limitar la autoinmunidad y la patología inmunológica) o reforzar las respuestas inmunitarias (por ejemplo, contra tumores) requieren planteamientos que cambian el equilibrio entre las células Treg y las células T efectoras. Los planteamientos actuales son lentos, ineficaces, descansan en el uso de péptidos bioactivos purificados a partir de fuentes biológicas, o en la expansión de las células Treg pre-existentes.

La expresión del regulador transcripcional Foxp3, una proteína intracelular y miembro de la familia de reguladores transcripcionales *forkhead/winged-helix* (dominio en cabeza de tenedor), es característica de las células Treg.

15 Se sabe que el tratamiento de las células T con el péptido bioactivo TGFbeta induce la expresión *de novo* de Foxp3 (Chen et al., 2003 J. Exp. Med. Vol. 198, pp 1875 - 1886).

20 Se ha publicado que determinados protocolos de inmunización *in vivo* inducen la expresión de Foxp3 en las células T transgénicas receptoras de células T (Kretschmer et al., 2005 Nature Immunol. Vol. 6, p 1219). Este planteamiento requiere el conocimiento tanto de la especificidad para el antígeno como de la restricción de MHC de las células T diana, de forma que el antígeno utilizado para la inmunización se puede seleccionar de acuerdo con ello. Esta condición es satisfecha por sistemas experimentales artificiales en los que las células T llevan receptores de células T transgénicas. Un problema con este planteamiento es que esta condición no se cumple para enfermedades autoinmunitarias de origen natural.

25 El inhibidor de mTOR rapamicina (sirolimus) se ha utilizado para manipular a la expansión de las células Treg pre-existentes que expresan Foxp3 (Zheng et al, 2003 Immunity vol 19 p 503;.. Battaglia et al, 2005 Blood vol 105 p 4743). Sin embargo, se ha demostrado que tales tratamientos no inducen la expresión *de novo* de Foxp3, lo que es un problema. Por ejemplo, Battaglia et al (ibid) señalan: “La presencia de células Tr CD4 CD25 ... en cultivos de células T expuestos a rapamicina puede ser debida a una inducción de novo de células CD25 Tr a partir de células T CD25, o bien a una expansión selectiva del subconjunto de células Tr FoxP3 CD4 CD25 de origen natural ya presentes en cantidades limitadas al comienzo del cultivo (es decir, el 10% de las células T CD4 CD25bright que se encuentran normalmente en el bazo no tratado). Para enfocar esta cuestión, células T CD4 agotadas de células Tr CD25 se cultivaron durante 3 semanas en presencia o en ausencia de rapamicina. Al contrario que con las células T CD4 (Figura 3A), las células T CD4 CD25 activadas en presencia de rapamicina dieron lugar a una población de células T que no lograron suprimir la proliferación celular *in vitro* (Figura 4A). En consecuencia, la expresión de FoxP3 fue potenciada en las células T CD4 expuestas a rapamicina, pero no en las células T CD4 CD25 tratadas con rapamicina (Figura 4B)”. Además, los protocolos empleados se basan en múltiples rondas de estimulación *in vitro* a lo largo de varias semanas, lo que tiene el inconveniente de que es muy laborioso. Los efectos negativos de la rapamicina sobre el número de células Treg también han sido publicados en la técnica.

40 Un estudio de Valmori Danila et al. “El enriquecimiento mediado por rapamicina de células T con actividad reguladora en cultivos simulados de células T CD4+ no se debe a la expansión selectiva de las células T reguladoras de origen natural sino a la inducción de funciones reguladoras en células T CD4+ convencionales”. El trabajo JOURNAL OF IMMUNOLOGY 15 JUL 2006, vol. 177, nº 2, 15 julio 2006 (15-07-2006), páginas 944 – 949 describe el uso de rapamicina para diferenciar células T en células Treg, por administración concomitante de rapamicina y activación de la célula T. Sin embargo, los efectos son temporales y reversibles y requieren la presencia continua de rapamicina.

45 Así pues, los métodos de la técnica anterior se operan típicamente a través de la estimulación o la activación de Tregs existentes que pueden potenciar la expresión de Foxp3 en las células que lo expresan ya, o se basan en el bloqueo de no Tregs, que lleva a la expansión/selección o sobre-representación de Tregs en la población. Estos resultados son los mismos que el tratamiento de rapamicina, como se indicó anteriormente. Otro ejemplo es el uso de TGFbeta que típicamente potencia un nivel de expresión de Foxp3 ya presente. Ninguno de tales planteamientos conducen a la expresión de Foxp3 *de novo* / Tregs *de novo*.

55 El *gene targeting* (apuntar a un gen) de la isoenzima PI3K p110delta tiene por resultado el aumento del número de células Treg en el timo, pero la disminución del número de células Treg en los órganos linfoides periféricos. Esto va acompañado de la enfermedad inflamatoria intestinal, que suele estar relacionada con deficiencias de células T reguladoras. No pueden extraerse de estos estudios conclusiones claras acerca de la relación entre la señalización de PI3K y la expresión de Foxp3.

Los inhibidores de la isoenzima PI3K p110gamma son objeto de evaluación para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias basadas en mecanismos distintos de las células Treg.

El documento WO2004/032867A3 describe moléculas asociadas preferentemente con células T efectoras o células T reguladoras, y los métodos para usarlas. Este documento presenta estudios a nivel de población. Los inhibidores de PI3K se mencionan en la página 76 de este documento y en la figura 23A. Los efectos sobre la expresión de Foxp3 (si los hay - altas dosis de inhibidor de acuerdo con este documento son probablemente citotóxicas y podría decirse que las dosis bajas no muestran ningún efecto significativo) parece ser debido a una expansión de las células que expresan Foxp3, o una potenciación en la expresión de Foxp3 en las células que expresan Foxp3. No hay evidencia de expresión de Foxp3 *de novo* en las enseñanzas del documento WO2004/032867A3. El principio fundamental de este documento es un intento de inclinar el equilibrio del sistema inmunitario, por ejemplo, para tratar de reducir la autoinmunidad en general o para tratar de mejorar en general las respuestas. No hay ninguna enseñanza de hacer nuevas Tregs, y ninguna sugerencia hacia ello. Su método en el mejor de los casos enseña que las células en reposo (PBL) son simultáneamente activadas (CD3/CD28) e inhibidas (LY294002), es decir, la activación y la estimulación al mismo tiempo. Al igual que otros estudios de la técnica (por ejemplo, Battaglia (ibid.)), y en común con los propios estudios de los autores de la presente invención, estos tratamientos no generan la expresión Foxp3 *de novo* /Tregs *de novo*.

El documento US2004/0072766 describe métodos para modular las respuestas de células T mediante la manipulación de la transducción de señal intracelular. Los métodos descritos en este documento implican la adición de estimuladores e inhibidores juntos, esto es, a la vez o simultáneamente. No se genera ninguna expresión de Foxp3 *de novo* en este planteamiento.

Foey et al (Arthritis Res 2002 vol 4 pp 64 - 70) describen que las células T estimuladas por citocinas inducen la producción de IL-10 de macrófagos dependiendo de la fosfatidil inositol 3-cinasa y p70S6K, y las implicaciones para la artritis reumatoide. Esto está relacionado con el estudio de los macrófagos en presencia de células T. Las células T se fijaron para separar los efectos antes y después del contacto. Así pues, las células se fijan y ya no viven más cuando se añaden los inhibidores de PI3K en estos métodos. Así pues, por estos métodos no se produce ninguna expresión de Foxp3 *de novo*.

Breslin et al describen que la rapamicina y LY294002 colaboran inhibiendo la proliferación de células T. En este ejemplo, en común con otros estudios, implica exponer las células T a inhibidores con el fin de estudiar aspectos de su biología tales como la proliferación. Los inhibidores se añaden antes de la estimulación, típicamente al menos 30 minutos antes de la estimulación. Después se examinan el número de células y otros parámetros. No se genera ninguna expresión de Foxp3 *de novo* mediante tales técnicas.

El documento US2005/0261317 describe inhibidores de PI3K delta humana. Este documento simplemente examina ciertos neutrófilos, células B y ciertas células exocíticas, y no está conectado con las células T o Treg. Los datos presentados procuran simplemente validar que los inhibidores de PI3K descritos bloquean realmente las funciones relevantes.

El documento US2004/0126781 describe métodos para prevenir el aborto mediado por la inmunidad mediante la inhibición de una señal coestimuladora mediada por CD28. Estos métodos implican el bloqueo de CD28 con ligando soluble. El bloqueo de CD28 con ligando soluble es mutuamente exclusivo con claridad, con estimulación/activación de las células T.

La presente invención procura superar el problema o los problemas asociados con la técnica anterior.

Sumario de la invención.

La expresión de Foxp3 se ha asociado con la función de las células T reguladoras. En ciertas configuraciones, se ha demostrado que la expresión de Foxp3 es necesaria y suficiente para inducir la función de las células T reguladoras. Ciertamente, la expresión de Foxp3 ha sido considerada en algunas circunstancias como un indicador o identificador de células T reguladoras, en comparación con otras sub-poblaciones de células T. En la técnica anterior, la única manera que se conoce de inducir la expresión de Foxp3 farmacológicamente ha sido por medio del tratamiento de una población de células T con el péptido bioactivo TGFβ.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente una nueva técnica para la inducción de la expresión de Foxp3. Este nuevo método implica el uso de inhibidores de PI3-K que previamente no han mostrado que induzcan la expresión de Foxp3.

Un hallazgo clave de los autores de la presente invención se refiere a la cronología o programación en el tiempo de los tratamientos de las células diana. Específicamente los autores de la presente invención han encontrado que los inhibidores (tales como los inhibidores de PI3K) han de ser añadidos a las células solamente después de haber sido estimuladas. Así pues, la etapa de estimulación/activación debe ser seguida por incubación o un retardo de tiempo antes de poner en contacto los inhibidores con las células. La adición de los inhibidores al mismo tiempo, e incluso antes de la activación, no conduce a la expresión de Foxp3 *de novo*. Así pues, una enseñanza clave de la invención

es que los inhibidores deben añadirse después de la estimulación/activación. Estas importantes programaciones en el tiempo se discuten con más detalle más adelante.

Aunque se ha demostrado que ciertos inhibidores de PI3-K inhiben mTOR, no hay evidencia de que actúen induciendo la expresión de Foxp3. Además, aunque la rapamicina (que actúa sobre mTOR) ha mostrado ser capaz de expandir selectivamente las células T reguladoras CD4 + CD25 + Foxp3 +, no ha habido ninguna demostración de inducción de la expresión de Foxp3 *de novo* que use dicha técnica. Por lo tanto, el descubrimiento realizado por los autores de la presente invención de que ciertos inhibidores de la PI3-K pueden conducir directamente a la inducción de la expresión de Foxp3 *de novo* en las células T, y a la función Treg, supone un sorprendente e importante avance.

5 Aunque se ha demostrado que ciertos inhibidores de PI3-K inhiben mTOR, no hay evidencia de que actúen induciendo la expresión de Foxp3. Además, aunque la rapamicina (que actúa sobre mTOR) ha mostrado ser capaz de expandir selectivamente las células T reguladoras CD4 + CD25 + Foxp3 +, no ha habido ninguna demostración de inducción de la expresión de Foxp3 *de novo* que use dicha técnica. Por lo tanto, el descubrimiento realizado por los autores de la presente invención de que ciertos inhibidores de la PI3-K pueden conducir directamente a la inducción de la expresión de Foxp3 *de novo* en las células T, y a la función Treg, supone un sorprendente e importante avance.

10 La presente invención se basa en estos sorprendentes descubrimientos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para inducir la expresión de Foxp3 en una célula T, que comprende

(i) estimular una célula T *in vitro*

15 (ii) inhibir la señalización *in vitro* a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt en dicha célula T, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de (i).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir la expresión de Foxp3 en una célula T previamente estimulada, que comprende inhibir la señalización *in vitro* en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación.

Adecuadamente dicha inhibición se comienza aproximadamente de 17 a 19 horas después de la estimulación.

20 Adecuadamente dicha inhibición se comienza aproximadamente 18 horas después de la estimulación.

Adecuadamente, la etapa de inhibición de la señalización comprende la inhibición de la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta.

Adecuadamente la inhibición de la señalización vía PI3K alfa o PI3K delta comprende poner en contacto dicha célula con inhibidor de PI3K, y en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y / o PI3K delta.

25 Adecuadamente, dicho método o dichos métodos comprenden además la retirada de dicha estimulación no más tarde del momento de inhibir la señalización.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para generar una célula T reguladora, que comprende

(i) estimular una célula T *in vitro*

30 (ii) inhibir la señalización *in vitro* a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt en dicha célula T, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de (i).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para generar una célula T reguladora, que comprende tratar una célula T CD8- estimulada, con inhibidor de fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K), en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para generar una célula T reguladora, que comprende tratar una célula T estimulada, con inhibidor de m-TOR, en donde el tratamiento con el inhibidor se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de la célula T. El inhibidor de m-TOR puede ser cualquier inhibidor de m-TOR conocido, tal como la rapamicina (sirolimus), o un análogo de la misma, tal como RAD001 (everolimus), CCI-779 (temsirolimus), AP23573, o una combinación de inhibidor de m-TOR/p110alfa, tal como PI103. Preferentemente, dicho inhibidor de m-TOR es rapamicina.

40 La estimulación puede ser por cualquier medio adecuado que haga a la célula T sensible a la acción de los inhibidores de PI3K y/o los inhibidores de la m-TOR para la producción de Treg como se describe en el presente texto. Preferentemente la estimulación de la célula T es mediante la estimulación del receptor TCR. En algunas realizaciones esta estimulación puede ser una estimulación persistente o duradera, lo que significa que la estimulación no se retira necesariamente en el momento de la acción de los inhibidores de PI3K y / o de m-TOR. Preferentemente una célula

45 T estimulada es una célula T que ha sido estimulada a través del receptor de la célula T. Más preferentemente la estimulación de la célula T es por estimulación del receptor TCR seguida por la retirada de dicha estimulación del receptor TCR. En otra realización la estimulación puede ser por medio de CD3. En cualquier caso, preferentemente es también estimulado un receptor coestimulador tal como CD28. Preferentemente CD28 es estimulado al mismo tiempo que la estimulación del receptor o receptores TCR o CD3. En una realización preferida la estimulación es a través de la estimulación simultánea de TCR y/o CD3, y de CD28, preferentemente seguida por la retirada de la estimulación a través de TCR y CD3. La retirada de la estimulación puede referirse a la simple eliminación de la

50

señal, o puede referirse a métodos más activos, tales como el bloqueo de la coestimulación de CD3/CD28 en el momento de la adición del inhibidor o inhibidores.

Realizaciones preferidas de la invención pueden comprender además una etapa de privación de señal, por ejemplo como se establece en la sección de los ejemplos.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para generar una célula T reguladora que comprende (i) estimular una célula T, (ii) opcionalmente, retirar dicha estimulación, y (iii) inhibir la señalización por medio de PI3K alfa o PI3K delta y/o por medio de m-TOR y/o por medio de Akt en dicha célula T, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de (i). Preferentemente la etapa (ii) comprende retirar dicha estimulación.

10 La estimulación de dicha célula T puede ser a través de la estimulación del receptor TCR o a través de CD3, y un receptor coestimulador tal como CD28. La estimulación preferible es a través del receptor de células T seguido por la retirada de dicha estimulación a través del receptor de células T.

15 Preferentemente estimular dicha célula T comprende poner en contacto dicha célula T con anticuerpo anti-TCR o anti-CD3. Preferentemente, estimular dicha célula T comprende además poner en contacto dicha célula T con anticuerpo anti-CD28, preferentemente poner en contacto con dicha célula T con anticuerpo anti-TCR o anti-CD3, y con anticuerpo anti-CD28 simultáneamente. El modo de presentación de tales anticuerpos pueden ser elegido por el operador, por ejemplo esto puede realizarse utilizando anticuerpos unidos a placa o mediante el uso de esferas recubiertas con anticuerpos tales como anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, o por cualquier otro medio de presentación conocido por el operador.

20 En otra realización la estimulación puede ser por contacto de las células diana, tales como células T periféricas, con células presentadoras de antígeno, tales como células presentadoras de antígeno en contacto con el antígeno de péptido específico. En estas realizaciones, como en las realizaciones que implican otros modos de estimulación, dicha estimulación puede ser duradera o persistente, lo que significa que la estimulación no se retira en el momento de la inhibición de m-TOR/PI3K/Akt. En otras realizaciones, la estimulación puede ser retirada en el momento de la inhibición de m-TOR/PI3K/Akt, puede ser retirada antes del momento de la inhibición de m-TOR/PI3K/Akt, adecuadamente la estimulación puede ser retirada en el momento de la inhibición de m-TOR / PI3K/Akt.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de inducir la expresión de Foxp3 en una célula T previamente estimulada, que comprende inhibir la señalización en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta y / o m-TOR y / o Akt, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de la célula T.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para inducir la expresión de Foxp3 en una célula T, que comprende estimular una célula T; retirar dicho estímulo; e inhibir la señalización en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta y/o m-TOR y/o Akt, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de la célula T. Preferentemente, dicho método comprende inducir la expresión de Foxp3 en una célula T mediante la estimulación de una célula T a través del receptor de células T; retirar dicha estimulación a través del receptor de células T, e inhibir la señalización en dicha célula T a través de PI3K alfa o delta PI3K y/o m-TOR y / o Akt.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método como se describió anteriormente en el que la inhibición de la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta y/o m-TOR y/o Akt comprende inhibir la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta. Preferentemente la inhibición de la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta comprende poner en contacto dicha célula con el inhibidor de PI3K. Preferentemente, dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.

40 Cuando la inhibición de la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt comprende la inhibición de la señalización a través de m-TOR, preferentemente la inhibición de la señalización a través de m-TOR comprende poner en contacto dicha célula con rapamicina.

45 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un inhibidor de PI3K en la inducción de la diferenciación de una célula T en una célula T reguladora, en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un inhibidor de PI3K en la inducción de la expresión de Foxp3 en el que dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.

Se describe un *kit* que comprende un estimulante de TCR y un inhibidor de PI3K alfa o delta, y/o un inhibidor de m-TOR y/o un inhibidor de Akt.

50 Se describe un *kit* como se describió anteriormente en el que dicho estimulante de TCR comprende anti-TCR o anti-CD3, y anti-CD28. Preferentemente los agentes anti-TCR/anti-CD3/ anti-CD28 son anticuerpos contra TCR, CD3, CD28 respectivamente.

Se describe un *kit* como se describió anteriormente que comprende además un inhibidor de m-TOR tal como rapamicina. Puede usarse ventajosamente un inhibidor de m-TOR en la expansión de las células T que expresan Foxp3

generado mediante el uso del estimulante de TCR / inhibidor de PI3K de los *kits* de la presente invención. Además, un inhibidor de m-TOR puede incrementar ventajosamente la eficiencia de la inducción de Foxp3.

Se describe un *kit* como se describió anteriormente que comprende además un inhibidor de Akt.

5 En una realización que es la más preferida, el inhibidor es un inhibidor de PI3K. Preferentemente dicho inhibidor de PI3K comprende LY294002; preferentemente, dicho inhibidor de PI3K comprende un inhibidor de PI3K clase IA tal como PIK-90 (alfa / m-TOR), PI-103 (alfa / gamma) o YM-024 (alfa/delta).

Aspectos preferidos.

10 Adecuadamente, la población de partida de las células (células diana) en las que se ha de inducir Foxp3 están agotadas de Tregs pre-existentes. Adecuadamente, la población de células de partida es agotada de células CD25 +. Si una población de células comprende menos del 1% de células Treg, los autores de la presente invención consideran que han sido agotadas de Tregs o que están efectivamente libres de Tregs. Adecuadamente, la población de partida de células no comprende Tregs. Adecuadamente, el método de la invención comprende una etapa más de tal agotamiento; adecuadamente tal etapa se lleva a cabo antes de la estimulación. Adecuadamente, la población de partida de células (células diana) en las que se ha de inducir Foxp3 están enriquecidas en células T vírgenes (*naive*).
15 Adecuadamente, la población de partida se enriquece en CD62L y se enriquece en células CD45Rb. Adecuadamente, el método de la invención comprende una etapa más de tal enriquecimiento; convenientemente tal etapa se lleva a cabo antes de la estimulación.

20 Una característica clave de la invención es que la activación y la inhibición de las células están separadas en el tiempo. La activación y la inhibición simultáneas no conducen a la expresión de Foxp3 *de novo*. Adecuadamente, la activación y la inhibición no se realizan simultáneamente de acuerdo con la presente invención. Esto ha ocurrido en la técnica anterior y no conduce a la expresión de Foxp3 *de novo*. Por ejemplo, con referencia a la Fig. 1C del presente texto, el momento de tiempo '0' es indicativo de tratamientos de la técnica anterior - esto representa 0 horas entre la estimulación/activación y la adición de inhibidores, es decir de inhibidores añadidos al mismo tiempo que la activación/estimulación. Está muy claro que este tratamiento es ineficaz en la inducción de la expresión de Foxp3 *de novo*.
25 Por el contrario, los tratamientos de acuerdo con la presente invención que implican un retraso o incubación entre la estimulación y la inhibición, son eficaces para la inducción de la expresión de Foxp3 *de novo*. Esto no significa que los inhibidores no puedan añadirse con activadores todavía presentes, pero significa que la activación debe preceder a la inhibición o que la inhibición ha de ocurrir después de la activación. El tiempo de la separación puede ser muy importante y es una contribución clave para la técnica. El tiempo entre la activación y la inhibición puede ser elegido específicamente para aplicaciones particulares, como se enseña en el presente texto. Programaciones en el tiempo ejemplares son cuando el tratamiento con inhibidor se aplica aproximadamente de 12 a 18 horas después de la activación, adecuadamente aproximadamente 18 horas después de la activación. Esto se discute con más detalle más adelante.

35 Adecuadamente, los métodos de la invención se aplican para inducir Foxp3 sin que se requiera la expansión de las células.

Una ventaja de la invención es que células de una especificidad deseada pueden ser convertidas en Tregs. Es esta capacidad la que proporciona varias de las ventajas establecidas en el presente texto.

Descripción detallada de la invención

40 Los tipos de células especializadas en organismos multicelulares están definidos por patrones específicos de expresión génica. Durante su diferenciación de las células madre hematopoyéticas, las células T CD4 naive han experimentado una considerable restricción de su potencial de desarrollo, pero hay varias opciones que permanecen abiertas para ellas, como son Th1, Th2, Th17 y Treg. La elección del linaje Th es importante para las respuestas inmunitarias eficaces a agentes patógenos específicos, mientras que el equilibrio entre las funciones efectoras y reguladoras es crítico para asegurar la competencia inmunológica, evitando al mismo tiempo una patología inmunitaria excesiva y la autoinmunidad. Las células T reguladoras naturales se caracterizan por la expresión del factor de transcripción de señal Foxp3 y la persistente expresión de Foxp3 es tanto necesaria como suficiente para la función de la célula T reguladora. Las Tregs surgen "naturalmente" en el timo y pueden surgir de células T CD4 periféricas naive. Los autores de la presente invención identifican señales que inducen la expresión de Foxp3 y la función de las células T reguladoras en células T CD4 naive. Los autores de la presente invención describen que la expresión de
45 Foxp3 se induce cuando las células T recientemente activadas se ven privadas de las señales de TCR. En esta configuración, la inducción de Foxp3 es potenciada selectivamente por inhibidores del eje PI3K/mTOR, y parece ser independiente de TGFbeta, el inductor clásico de la diferenciación de Treg.

En particular, la invención proporciona el uso de inhibidores de PI3-K/mTOR, preferentemente inhibidores de PI3K, que sinergizan con la privación de la señal de TCR para inducir Foxp3 en células T CD4 recién activadas.

55 La activación de las células T CD4 naive revela su potencial para hacerse células T efectoras o reguladoras (Tregs). Mientras las efectoras median en respuestas inmunitarias, las Tregs equilibran las células T efectoras, mantienen la homeostasis y previenen la patología inmunitaria. Los autores de la presente invención describen nuevos métodos

para la inducción estable de Foxp3, el factor de transcripción distintivo de Tregs, que se inicia cuando células T recién activadas son privadas de señales de TCR, y potenciadas por los inhibidores de PI3K/mTOR, preferentemente inhibidores de molécula pequeña de PI3K. La inhibición selectiva de subunidades catalíticas PI3K de clase I identifica p111 alfa y p110delta - pero no p110gamma ni p110beta - como reguladores de Foxp3. La inducción de Foxp3 es independiente de la TGFbeta exógena y resistente a anticuerpos TGFbeta neutralizantes y antagonistas farmacológicos de señalización de Smad. Estas descripciones permiten nuevos planteamientos para manipular la diferenciación de células T reguladoras.

Se ha de indicar que una ventaja de la presente invención es que se induce la expresión Foxp3 *de novo*. Esto se compara con la situación en la técnica anterior en la que el mejor efecto mostrado hasta ahora ha sido la expansión de células T que ya están expresando Foxp3. La oportunidad para inducir activamente la expresión de Foxp3 en células que no están actualmente expresándolo es una ventaja significativa de la presente invención.

Los autores de la presente invención muestran que los inhibidores de moléculas pequeñas de la ruta PI3K/mTOR inducen de forma rápida y eficaz la expresión de Foxp3 *de novo*, el factor de transcripción distintivo del linaje de células Treg. Esto permite aplicar nuevos planteamientos terapéuticos para configuraciones clínicas en las que es deseable la generación *de novo* de células T reguladoras, tales como la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Muchas de estas enfermedades son de gran importancia clínica, como la artritis reumatoide y la diabetes de tipo I. Así, la aplicación industrial y la utilidad de la invención fluyen de estas importantes aplicaciones sanitarias.

Fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3-K)

Las PI3-K's son una familia de enzimas que tienen numerosas isoenzimas individuales diferentes. En un amplio aspecto, la presente invención se refiere al uso de inhibidores de PI3-K, preferentemente inhibidores de PI3K de clase I, en la inducción de la expresión de Foxp3. Sin embargo, a partir de los propios datos de los autores de la presente invención, está claro que la inhibición de PI3Kgamma de clase IB no induce la expresión de Foxp3, y que PI3-Ky no actúa a través de las células T reguladoras. Esta observación contrasta con las enseñanzas de la técnica anterior, que afirman que PI3-Ky puede tener efectos moduladores. Sin embargo, como se describe en el presente texto, de hecho PI3-Ky no ejerce sus efectos por la acción en las células T reguladoras, y por tanto la inhibición de o los inhibidores de PI3-Ky son apartados específicamente de la presente invención. Preferentemente las referencias a inhibidores de PI3-K deben ser consideradas como referencias a inhibidores de PI3-K de clase IA que no son específicos para PI3-Kbeta. Preferentemente las referencias a inhibidores de PI3-K deben considerarse como no referidas a ningún compuesto que actúe inhibiendo la actividad de PI3-Ky.

El hecho de si un compuesto actúa o no inhibiendo una actividad de PI3K particular, tal como la actividad de PI3-Ky, puede ser determinado con facilidad. Por ejemplo, se expone en los ejemplos una manera en la que puede determinarse la inhibición de PI3-Ky. Además, puede determinarse si un compuesto es un inhibidor de una isoforma de PI3K específica o selectiva, tal como un inhibidor específico o selectivo de PI3-Ky, haciendo ensayos de acuerdo con métodos descritos en el presente texto o en la técnica anterior. El ensayo estándar es producir la cinasa y ensayar *in vitro* con el inhibidor en un experimento de titulación con diferentes concentraciones de inhibidor y un sustrato de prueba adecuado capaz de ser fosforilado por la cinasa que se está ensayando. Además, los inhibidores de PI3K están caracterizados típicamente con referencia a su especificidad por el fabricante o suministrador o en la bibliografía relacionada con el compuesto de interés.

Debe considerarse que las referencias a PI3-K están relacionadas con PI3-K's, preferentemente PI3K's de clase I, preferentemente PI3K's de clase IA, preferentemente PI3K's de clase IA excepto para gamma, lo más preferentemente una PI3-K de clase IA elegida entre el grupo que consiste en PI3-K α , PI3-K β , PI3-K δ .

También se describe en el presente texto que PI3-K β tiene un papel limitado o nulo en la inducción de Foxp3. Por consiguiente, preferentemente la PI3-K no es PI3-K α , y preferentemente el inhibidor de PI3-K no es específico o selectivo para PI3-K β .

Específicamente, los autores de la presente invención demuestran que la inhibición de PI3-K α o PI3-K δ es particularmente ventajosa. Por consiguiente, en una realización preferida, el inhibidor de PI3-K es un inhibidor que es específico o es selectivo para PI3-K α . En otra realización preferida, el inhibidor de PI3-K es un inhibidor que es selectivo o específico para PI3-K δ .

Células diana.

Las células diana en las que se desea producir la expresión de Foxp3 pueden ser cualquier célula. Preferentemente las células son células hematopoyéticas, preferentemente las células son células del linaje de las células T, preferentemente las células son timocitos o linfocitos, preferentemente las células son una población de linfocitos tales como linfocitos periféricos (p. ej. linfocitos de la sangre periférica) que comprende una sub-población de células T maduras. Preferentemente las células diana son células T, preferentemente células T maduras naive. Cuando las células son timocitos, preferentemente las técnicas usadas son las mismas que para las células T periféricas.

Preferentemente las células diana no son células T CD8+. Las células T CD8+ no expresan Foxp3 después de la activación y la inhibición de PI3K. Adecuadamente la o las células diana no comprenden células T CD8+. Adecuadamente las células diana están agotadas en células T CD8+, o son esencialmente libres de células T CD8+. Adecuadamente las células diana son células T naive.

- 5 Preferentemente las células diana no son células transgénicas. Las células transgénicas pueden ser genéticamente inestables. Las células transgénicas pueden estar sometidas a problemas reguladores cuando se contempla su reintroducción en un sujeto. Preferentemente las células diana son células de origen natural previamente recogidas de un sujeto de interés.

10 Cuando las células a tratar comprenden solamente una sub-población de células diana (células T), p. ej. cuando el tratamiento se lleva a cabo en linfocitos periféricos, entonces claramente la expresión "célula diana" ha de ser interpretada en consecuencia para referirse a las células T dentro de la población global de células que se están tratando. En otros términos, al llevar a cabo la invención puede desearse tratar una población de células para inducir la expresión de Foxp3 cuando de hecho solamente una sub-población de esas células son células diana. Por ejemplo, una población de linfocitos periféricos puede comprender células B, células T y otras células. Por razón de conveniencia puede tratarse la población completa de linfocitos periféricos, pero desde luego se apreciará por parte del lector experimentado que solamente una proporción de ellos (esto es, las células T) son realmente células diana. Dado que la pretensión es típicamente generar Tregs, las células diana serán células no-Treg. Preferentemente las células diana son células T que no expresan Foxp3 antes del tratamiento o los tratamientos de la invención.

Métodos de generación de células T reguladoras.

- 20 En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a tomar una población de una o más células T, tratarlas con un inhibidor de PI3-K, y obtener células T reguladoras.

25 Con algo más de detalle, preferentemente la población de células T es estimulada a través del receptor de células T (TCR) o el complejo CD3 asociado a TCR de proteínas de señalización. En la práctica, la señal de TCR se transmite de hecho a través de las proteínas asociadas. Así pues, para estimular a través de TCR es posible señalar como diana la propia TCR real (p. ej. *targeting* o apuntamiento de TCR específico del antígeno) o señalar como diana CD3 (p. ej. la proteína o proteínas asociadas con TCR). Esta estimulación es preferentemente retirada después. Después de la retirada de esta estimulación, las células son tratadas con un inhibidor de PI3-K. Después de la incubación con el inhibidor de PI3-K se obtienen las células T reguladoras. Específicamente, el tratamiento del inhibidor de PI3-K induce la expresión de Foxp3 y esto lleva a un desarrollo de células T reguladoras o diferenciación en una célula T reguladora.

30

En los ejemplos se proporcionan métodos ilustrativos para producir este efecto.

35 La programación en el tiempo con respecto a la estimulación de TCR puede ser manipulada ventajosamente para mejorar los efectos. Preferentemente las células T han sido activadas recientemente cuando son tratadas con inhibidor de PI3-K. La activación se refiere a la estimulación a través del receptor de células T. Por "reciente" se entiende la estimulación o activación dentro de los dos días precedentes.

40 Los mejores resultados se obtienen cuando el tratamiento con inhibidor, tal como el tratamiento con inhibidor de PI3-K, es aplicado dentro de las 48 horas de la activación. Preferentemente el tratamiento con inhibidor tal como el tratamiento con inhibidor de PI3-K se proporciona dentro de las 3 a 47 horas de la estimulación, preferentemente dentro de las 47 horas de la estimulación, preferentemente dentro de las 30 horas de la estimulación, preferentemente a aproximadamente las 18 horas a partir de la estimulación, preferentemente a las 18 horas de la estimulación. Preferentemente el tratamiento con inhibidor tal como el tratamiento con inhibidor de PI3-K se proporciona al menos 3 horas después de la estimulación, preferentemente al menos 4 horas después de la estimulación, preferentemente más de 9 horas después de la estimulación, preferentemente al menos 10 horas después de la estimulación, preferentemente aproximadamente 18 horas después de la estimulación, preferentemente a las 18 horas después de la estimulación. Los beneficios técnicos de estas programaciones son la optimización y/o la maximización de la inducción de Foxp3.

45

Preferentemente el tiempo a partir de la estimulación es el tiempo desde la retirada de la señalización a través del receptor de células T.

50 En una realización que es la más preferida, el tratamiento con inhibidor tal como el tratamiento con inhibidor de PI3-K se proporciona en el momento de las 10 a las 22 horas después de la estimulación, preferentemente de 12 a 20 horas después de la estimulación, preferentemente de 12 a 18 horas después de la estimulación, preferentemente de 17 a 19 horas después de la estimulación, preferentemente aproximadamente 18 horas después de la estimulación, preferentemente 18 horas después de la estimulación. Esto tiene la ventaja de una excelente inducción de Foxp3. En realidad, el beneficio técnico de estas programaciones en el tiempo se ilustra en la sección de ejemplos, p. ej. con referencia a la figura 1C.

55

Células T reguladoras.

Las células T reguladoras (también denominadas a veces Tregs) son un importante componente de un sistema inmunitario sano. Las células T reguladoras están implicadas en el mantenimiento de las células T efectoras en comprobación y en prevención de “auto-reconocimiento”, que puede ser uno de los principales factores en una enfermedad autoinmunitaria.

Las células T reguladoras tienen numerosos biomarcadores reconocidos en la técnica. Estos incluyen CD4+, CD25+, y Foxp3+. En particular, de acuerdo con la presente invención una célula T reguladora tiene que manifestar expresión de Foxp3 (Foxp3+).

Una célula T reguladora tiene que mostrar preferentemente función reguladora. La exhibición de la función reguladora puede determinarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. En particular, ejemplos de tales pruebas se exponen en la sección de ejemplos. Específicamente, las pruebas plasmadas en la figura 3 están consideradas como pruebas *in vitro* estándar para la función de la célula T reguladora.

In vivo, se cree de un modo general que las células T reguladoras necesitan factores adicionales tales como IL-2, TGFbeta, o IL-9 (tal como IL-9 derivada de mastocitos) para su supervivencia y/o el mantenimiento de sus funciones reguladoras. Así pues, en una realización preferida, la invención se refiere a la inducción de Foxp3 en células T junto con la puesta en contacto de esas células T con dichas linfocinas; la puesta en contacto con dichas linfocinas puede realizarse por contacto con células que producen dichas linfocinas, tales como los mastocitos. Las células que producen dichas linfocinas (p. ej. los mastocitos) pueden ser proporcionadas *in vivo* en el sujeto que está siendo tratado. Debe indicarse que animales PI3 KP110δ *knockout* no tienen respuestas dependientes de los mastocitos, y muestran una función de Treg reducida.

Inhibidores de PI 3K/m-TOR/Akt

Los inhibidores de PI3K de la presente invención pueden ser cualquier compuesto o compuestos capaces de inhibir la PI3K, preferentemente PI3K de clase I, preferentemente PI3K de clase IA. En particular, los inhibidores de PI3K pueden ser macromoléculas biológicas o pueden ser compuestos pequeños orgánicos o inorgánicos. Preferentemente los inhibidores de PI3K son compuestos orgánicos pequeños, preferentemente compuestos sintéticos.

Varios inhibidores de PI3K de molécula pequeña son objeto de evaluación para uso clínico – estos son inhibidores de la invención preferidos. Varios inhibidores de PI3K de molécula pequeña están aprobados para uso clínico –estos son inhibidores de la invención más preferidos.

Desde luego, algún inhibidor de PI3-K puede actuar sobre más de una isoenzima. Si sucede que un inhibidor de PI3-K actúa sobre uno de los subtipos de PI3-K que los autores han descrito que no causan directamente inducción de la expresión de Foxp3, esto no lo excluye de la presente invención. La característica importante de un inhibidor de PI3-K como se usa en el presente texto es que no actúa inhibiendo una de las isoenzimas PI3-K que se describen como importantes para la inducción de la expresión de Foxp3. Por consiguiente, un inhibidor de PI3-K de acuerdo con la presente invención ha de mostrar actividad para inhibir la acción de PI3-Kα y/o PI3-Kδ. Si tal inhibidor tiene también un efecto subsidiario sobre una isoenzima PI3-K diferente, tal como PI3-Kβ o PI3-Kγ, tal inhibidor no debe ser considerado excluido de la presente invención. Sin embargo, claramente es preferible elegir el inhibidor de PI3-K que tiene un efecto tan específico como sea posible con el fin de simplificar la administración y de evitar efectos pleiotrópicos no deseados o efectos secundarios. Por consiguiente, preferentemente el inhibidor de PI3-K de la invención es específico para una isoenzima PI3-K dada. Preferentemente el inhibidor de PI3-K de la invención es específico para PI3-Kα y/o PI3-Kδ. Preferentemente el inhibidor es específico para PI3-Kα. Preferentemente el inhibidor es específico para PI3-Kδ. Los inhibidores que reducen la actividad tanto de PI3-Kα como de PI3-Kδ son particularmente preferidos; los más preferidos son los inhibidores que reducen la actividad de PI3-Kα y PI3-Kδ, pero no reducen la actividad de otras isoenzimas tales como PI3-Kγ y/o PI3-Kβ.

Lo más preferentemente el inhibidor es específico para PI3-K alfa o delta, preferentemente el inhibidor es específico para PI3-K alfa y delta, ya que estas son las actividades predominantes en la regulación de Foxp3.

Los más preferidos son los inhibidores de PI3K que están aprobados para uso clínico y que inhiben PI3K alfa y/o PI3K delta. Incluso más preferidos son tales inhibidores que además no reducen la actividad de otras isoenzimas tales como PI3-Kγ y/o PI3-Kβ.

Al contrario que los péptidos bioactivos purificados a partir de fuentes biológicas como los que han sido empleados en la técnica anterior (p. ej. TGF beta), los inhibidores de PI3K de molécula pequeña pueden ser preparados sintéticamente y tienen propiedades farmacológicas superiores (análogas a la diferencia entre la insulina y los productos antidiabéticos orales). El uso de compuestos inhibidores de PI3K sintéticos, tales como aquellos que tienen selectividad para isoenzimas PI3K individuales, ofrece la ventaja técnica de que los efectos secundarios de los péptidos bioactivos pueden ser minimizados o eliminados.

Una nueva generación de inhibidores de PI3-K ha sido caracterizada recientemente a los niveles bioquímico, estructural y biológico, y muestran tener selectividad para isoenzimas PI3-K en preferencia sobre una gama extensiva de

otras cinasas (Knight et al., 2006 Cell vol 125 pp 733 - 747). Los inhibidores de PI3K de clase IA selectivos son inhibidores de la invención preferidos. Los inhibidores preferidos se muestran en la sección de ejemplos; los más preferidos son los inhibidores de PI3K alfa y delta de la sección de ejemplos.

5 Los inhibidores de m-TOR incluyen rapamicina, wortmanina, y compuestos sintéticos tales como PIK-90. Inhibidores de m-TOR preferidos se describen anteriormente y en la sección de ejemplos. El más preferido es la rapamicina.

La proteína cinasa B o Akt (PKB/Akt – por comodidad se denomina en el presente texto simplemente “Akt”) es una cinasa de serina/treonina, que en los mamíferos comprende tres miembros altamente homólogos conocidos como PKB alfa (Akt1), PKB beta (Akt2) y PKB gamma (Akt3). Los inhibidores de Akt incluyen el inhibidor alostérico Akti-1/2.

10 **Rapamicina.**

Aunque se ha demostrado que la inhibición de la señalización de m-TOR (es decir, tratamiento con rapamicina) contribuye a la expansión de Tregs Foxp3+ en la técnica anterior, no hay ninguna enseñanza de la inducción de Foxp3 por la rapamicina. Los autores de la presente invención no conocen ninguna unión entre la inhibición de m-TOR y la inducción de Foxp3 en la técnica. Realmente, los autores de la presente invención han investigado esta
15 área usando la reducción inducida por depleción de nutrientes/agotamiento biológicamente relevante de la actividad de m-TOR. Se demostró que estas señales abolen pS6 como una demostración de la actividad de m-TOR reducida, pero no conducen a la inducción de Foxp3. Esta elegante disección del sistema ilustra que los métodos de la invención proporcionan un nuevo planteamiento a la inducción de Foxp3 y muestran además que los planteamientos de la técnica anterior que actúan a través de la señalización de m-TOR para producir la expansión de las células Foxp3+,
20 no inducen de hecho la expresión *de novo* de Foxp3 ni la diferenciación de Tregs.

La rapamicina no es un inhibidor de PI3K. Por ejemplo, se demuestra en la técnica que “ninguna proteína cinasa ensayada fue inhibida de forma significativa por la rapamicina a 1 microM, una concentración de 10 a 20 veces más alta que la requerida para inhibir mTor en ensayos basados en células (Bioch. J. 351:95-105, 2000), el trabajo estándar sobre especificidad del inhibidor.

25 **Combinaciones,**

Una vez que la expresión de Foxp3 ha sido inducida de acuerdo con la invención, puede ser ventajoso combinar los métodos enseñados en la misma con métodos que favorecen la expansión de esas células. Así pues, en una realización preferida, preferentemente células T reguladoras en las que ha sido inducida la expresión de Foxp3 son subsecuentemente expandidas. Preferentemente esto se realiza mediante tratamiento con rapamicina. En particular,
30 esto puede llevarse a cabo como en Battaglia et al 2005 Blood, Volumen 105 página 4743.

Otras aplicaciones.

La invención encuentra una amplia aplicación en el entorno clínico en donde la generación *de novo* de células Treg es deseable, tal como la prevención y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

La inhibición de m-TOR puede ser importante para el mantenimiento de la función reguladora *in vitro*.

35 La invención encuentra aplicación en la inducción de células T reguladoras para un antígeno específico. En esta realización, primeramente se selecciona el antígeno y después tiene lugar la inducción de Foxp3 en células T capaces de responder al antígeno específico.

Las células T reguladoras controlan sistemas inmunitarios. En particular, mantienen bajo control las células T efectoras. Las deficiencias en células T reguladoras están asociadas con enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide. Así, haciendo células T reguladoras, típicamente por inducción de la expresión de Foxp3 como se describe en el presente texto, puede detenerse, prevenirse o reducirse tal daño inmunitario.
40

La invención puede aplicarse con ventaja a la generación de células T reguladoras *in vitro*. En la técnica anterior, esto se ha realizado mediante el tratamiento con TGFβ. La presente invención proporciona una conveniente alternativa a este método. Además, la invención proporciona la ventaja de que evita la exposición al péptido TGFβ bioactivo.
45

En particular, la invención encuentra aplicación en la producción *ex vivo* de células T reguladoras. En esta realización, se tomaría de un paciente una población de células T. Estas serían después tratadas de acuerdo con los métodos de la presente invención para inducir las células T reguladoras. Estas células T reguladoras pueden entonces ser reintroducidas en ese paciente para proporcionar el efecto terapéutico.

50 La invención encuentra aplicación en la inmunosupresión. En particular, la inmunosupresión puede aplicarse después de un trasplante de órganos o en la enfermedad del injerto contra huésped.

La invención encuentra también aplicación en enfermedades autoinmunitarias en general. En particular, la invención encuentra aplicación en enfermedades autoinmunitarias tales como gastritis, tiroiditis, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, diabetes autoinmunitaria, esclerosis múltiple u otras enfermedades autoinmunitarias.

5 Además, la invención encuentra aplicación en la supresión del rechazo de aloinjertos, y ejemplos de artritis tales como artritis reumatoide o artritis inducida por colágeno. Además, la invención encuentra aplicación en la lucha con ciertos cánceres, específicamente aquellos cánceres que están ellos mismos formados por linfocitos tales como la malignidad de células B (p. ej. leucemia, linfoma, etc.) como se discute en el presente texto.

La invención es *in vitro*. Los métodos de la invención no implican al organismo humano o animal.

10 Adecuadamente ha de entenderse que las referencias a la inducción de la expresión de Foxp3 no significan inducción de la expresión de Foxp3 *de novo*. Adecuadamente, la potenciación de la expresión de Foxp3 existente, o la expansión de células que ya expresan Foxp3, no son parte de la presente invención. Adecuadamente la invención se refiere a producir la expresión de Foxp3 en células que no estaban expresando Foxp3 antes de los tratamientos o métodos de la invención. Sin desear vincularse a ninguna teoría, la expresión de Foxp3 es necesaria y suficiente para la producción de Treg a partir de una célula diana apropiada. Así pues, la incubación de una célula hace que exprese Foxp3 *de novo* de acuerdo con la presente invención conduce a la producción de Treg.

Ciertos aspectos de la descripción pueden entenderse por referencia a los párrafos numerados que siguen:

1. Un método para generar una célula reguladora que comprende tratar una célula T estimulada, con inhibidor de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.
2. Un método para generar una célula T reguladora que comprende
 - 20 (i) estimular una célula T
 - (ii) opcionalmente retirar dicha estimulación
 - (iii) inhibir la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt en dicha célula T.
3. Un método para tratar un sujeto en necesidad de células T reguladoras, que comprende
 - (i) sacar una muestra que comprende una célula T de un sujeto
 - 25 (ii) estimular dicha célula T
 - (iii) opcionalmente retirar dicha estimulación
 - (iv) inhibir la señalización en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt; y
 - (v) reintroducir dicha célula T en dicho sujeto
4. Un método para inducir la expresión de Foxp3 en una célula T previamente estimulada, que comprende
 - 30 inhibir la señalización en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt.
5. Un método de inducir la expresión de Foxp3 en una célula T que comprende
 - (i) estimular una célula T
 - (ii) opcionalmente retirar dicha estimulación; y
 - (iii) inhibir la señalización en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt.
- 35 6. Un método de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes, en donde estimular dicha célula T comprende estimular dicha célula T a través del receptor de células T (TCR).
7. Un método de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes, en el que inhibir la señalización a través de PI3K alfa o PI3K delta comprende poner en contacto dicha célula con inhibidor de PI3K, y en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.
- 40 8. Uso de un inhibidor de PI3K en la inducción de la diferenciación de una célula T en una célula T reguladora, en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.
9. Uso de un inhibidor de PI3K en la inducción de la expresión de Foxp3 en donde dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.
10. Uso de un inhibidor de PI3K alfa o un inhibidor de PI3K delta para la elaboración de un medicamento para
 - 45 la deficiencia de células T reguladoras.

11. Inhibidor de PI3K alfa para uso en el tratamiento de una deficiencia de células T reguladoras.
12. Inhibidor de PI3K delta para uso en el tratamiento de una deficiencia de células T reguladoras.
13. Un *kit* que comprende
 - (i) un estimulador de TCR; y
 - (ii) un inhibidor de PI3K alfa o delta.
14. Un *kit* de acuerdo con el párrafo 13, en donde dicho estimulador de TCR comprende anticuerpo anti-TCR y anti-CD28.
15. Un *kit* de acuerdo con el párrafo 13 o el párrafo 14, que comprende además un inhibidor de m-TOR.
16. Un *kit* de acuerdo con el párrafo 15 en donde dicho inhibidor de m-TOR es rapamicina.
17. Un *kit* de acuerdo con cualquiera de los párrafos 13 a 16 que comprende además un inhibidor de Akt.
18. A método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 7, un uso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 8 a 10, e inhibidor de acuerdo con el párrafo 11 o el párrafo 12, o un *kit* de acuerdo con cualquiera de los párrafos 13 a 17 en donde dicho inhibidor de PI3K comprende LY294002.

Breve descripción de las figuras.

- 15 La figura 1 muestra que la privación de señal de TCR induce la expresión de Foxp3 por las células T recientemente activadas, en sinergia con inhibidores de la ruta PI3-K/mTOR
 - a) células T CD62LhiCD4+CD25- LN naive fueron estimuladas con anti TCR unido a placa y anti CD28, durante 18 horas, y fueron cultivadas durante dos días más en presencia de anticuerpo TCR (señalización de TCR continuada) o en ausencia de anticuerpo TCR (privación de señal de TCR). La expresión del RNA de Foxp3 fue establecida mediante RT-PCR en tiempo real (media \pm SD, n = 3).
 - b) células T CD4 naive fueron marcadas con CFSE y estimuladas con anti TCR unido a placa y anti CD28 como en a), y fueron transferidas a las condiciones indicadas al cabo de 18 horas. La expresión de proteína Foxp3 fue evaluada por tinción intracelular 2 días más tarde. Los perfiles de CFSE se muestran para células Foxp3- y Foxp3+.
 - 25 c) La inducción de Foxp3 es lo más efectiva 18 horas después de la activación de células T CD4 naive.

La figura 2 muestra que la señalización de TCR controla la actividad de mTOR en células T CD4 recién activadas.

 - a) células T LN naive fueron estimuladas con anti TCR unido a placa y anti CD28 durante 1 o 18 horas, o durante 1 hora con anti CD28 solamente (no señalización de TCR). La fosforilación de la proteína ribosómica S6 fue determinada al nivel de célula individual usando tinción intracelular y citometría de flujo.
 - 30 b) células LN naive fueron activadas como en a). Al cabo de 18 horas, se añadió rapamicina (25 nM) o Ly294002 (10 μ M) durante una hora más, o las células fueron cultivadas durante el tiempo indicado en ausencia de anti TCR. Los niveles de pS6 fueron determinados como en a).

La figura 3 muestra que la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR e inhibidores de PI3K/mTOR es estable y tiene por resultado la adquisición de la función reguladora.

 - 35 a) la expresión de Foxp3 fue inducida en células T CD4 naive por privación de señal de TCR, rapamicina y Ly294002, y se vigiló a lo largo del tiempo. Las células fueron re-estimuladas cada 7 días en presencia de IL-2.
 - b) se activaron células T CD4 naive durante 18 horas y se cultivaron durante otros 2 días más, bien sea con anti-TCR (testigo, < 1% Foxp3+) o sin anti-TCR y en presencia de rapamicina y Ly294002 (Foxp3 inducido, 28% Foxp3+). Se añadieron números graduales de Foxp3 inducido o células testigo a células T CD4 LN frescas, marcadas con CFSE, en presencia de APC y anti CD3 soluble, y el efecto sobre la división de las células (perfil de CFSE) fue registrado 48 horas más tarde.
 - 40

La figura 4 muestra la expresión de Foxp3 en respuesta a la privación de señal de TCR y a la inhibición de PI3-K/mTOR *in vivo*.

 - 45 a) células T CD4 naive fueron marcadas con CFSE y estimuladas con anti TCR unido a placa y anti CD28, y se transfirieron i.v. a hospedadores inmunocompetentes singénicos después de 18 horas con o sin rapamicina y Ly294002 i.p. como se indica. La expresión de proteína Foxp3 por células esplénicas endógenas (CFSE-) y transferidas (CFSE+, la inserción muestra un mayor número de eventos) CD4+ fue evaluada 2 días más tarde mediante tinción intracelular

b) resumen de 11 experimentos de transferencia a las 18 o las 48 horas.

La figura 5 muestra la implicación diferencial de isoenzimas p110 en la inducción de Foxp3. Células LN naive fueron activadas como en la figura 1 y se añadieron inhibidores de PI3-K al cabo de 18 horas. Se muestra la especificidad de la isoforma p110 de cada inhibidor a la concentración usada (panel izquierdo). El porcentaje de células Foxp3+ en cultivos privados de señalización de TCR (14% en este experimento) se sustrajo para indicar el efecto neto de los inhibidores de PI3-K (valores Δ rojos en cada gráfico de dispersión). Las células fueron marcadas con CFSE antes de la activación para monitorizar la división de la célula (panel izquierdo). Para cada inhibidor, se determinó la fosforilación de la proteína ribosómica S6 mediante tinción intracelular al cabo de 90 minutos, y se muestra el porcentaje de células pS6+ (negro, media \pm SD, n = 3 - 5 excepto TGX-115, n = 1, panel derecho). Se muestra el porcentaje de células Foxp3+ después de sustraer el porcentaje de células Foxp3+ en cultivos privados de señalización de TCR (rojo, media \pm SD, n = 4 -12). Se indican los valores de la IC50 determinados *in vitro* (Camps et al., 2005; Knight et al., 2006) para enzimas relevantes (panel derecho).

Figura 6. La inducción de Foxp3 por inhibidores de señalización de PI3K/mTOR es independiente de TGF β .

a) Células T LN naive fueron activadas en medio AIM-V libre de suero (Invitrogen) durante 18 horas y los extractos de células completas fueron sometidos a electroforesis en gel de SDS y transferencia western después de la exposición de las células a TGF β (1 ng/ml) (durante 90 minutos, calle 1), privación de señal TCR (90 minutos, calle 2), o privación de señal TCR más rapamicina y Ly294002 (90 minutos, calle 3, o 8 horas, calle 4). La mancha se sondó secuencialmente con anti pSmad2 (S465/467) y anti Smad2/3.

b) Células T LN naive activadas como en a) fueron privadas de señales TCR y se añadieron inhibidores de TGF β y PI3-K/mTOR como se indica bajo el gráfico. El porcentaje células que expresan Foxp3 se determinó 24 - 48 horas más tarde. Los cultivos fueron suplementados con anti TGF β neutralizante (R&D Systems, 3 μ g/ml) o el inhibidor de Smad cinasa SB431542 (Sigma, 20 μ M). Se sustrajo la expresión de Foxp3 en cultivos privados de señal TCR (9,2 \pm 5,6%, n = 6). Se muestra la expresión de Foxp3 en presencia de anti TGF β (barras gris oscuro) o SB431542 (barras gris claro) normalizadas a cultivos testigo (100%, barras negras; TGF β 22,3 \pm 7,0%, n = 9; PIK90 36,0 \pm 12,9%, n = 7; PI-103 35,1 \pm 3,8%, n = 8; Ly294002 21,5 \pm 4,0%, n = 4 y rapamicina 28,6 \pm 9,0%, n = 4). ND: no realizado.

La figura 7 muestra que la privación de señal TCR e inhibidores de la ruta PI3K/mTOR induce la expresión de Foxp3 por células T recién activadas.

a) Células T CD62L^{hi} CD4⁺ CD25⁻ LN naive fueron estimuladas con anti-TCR unido a placa y anti-CD28 soluble durante 18 horas y se cultivaron durante otros dos días con anticuerpo TCR (señalización de TCR continuada) o sin anticuerpo TCR (privación de señal de TCR). La expresión del RNA de Foxp3 fue establecida mediante RT-PCR en tiempo real (media, SD, n = 3).

b) Células T CD4 naive fueron marcadas con CFSE y estimuladas con anti TCR unido a placa y anti CD28 como en a) y se transfirieron a las condiciones indicadas al cabo de 18 horas. La expresión de proteína Foxp3 fue evaluada mediante tinción intracelular 2 días más tarde. La recuperación celular fue entre 67 y 108% de la entrada. Se muestran los perfiles de CFSE para células Foxp3- y Foxp3+.

c) Células T CD4 LN naive fueron activadas como en a) durante el número de horas indicado, después de lo cual las células fueron privadas de señales TCR y expuestas a rapamicina y LY294002. El porcentaje células que expresan Foxp3 fue determinado 2 días más tarde (media de 2 experimentos).

d) La expresión de Foxp3 fue inducida en células T CD4 naive mediante privación de la señal TCR, rapamicina y LY294002. Las células fueron re-estimuladas semanalmente en presencia de IL-2 y la expresión de Foxp3 fue monitorizada. Se muestran las células Treg naturales para comparación.

e) Células T CD4 naive fueron activadas durante 18 horas y cultivadas durante otros 2 días más, bien sea con anti-TCR (testigo, < 1% Foxp3 +) o bien sin anti-TCR y en presencia de rapamicina y LY294002 (Foxp3 inducida, 28% Foxp3 +). Se añadieron números graduales de células inducidas Foxp3 o testigo a células T CD4 LN frescas, marcadas con CFSE, en presencia de APC y anti CD3 soluble, y el efecto sobre la división celular (perfil de CFSE) fue registrado 48 h más tarde.

f) Células CD45RB^{hi} CD4⁺ CD25⁻ LN naive fueron transferidas intravenosamente a receptores deficientes en Rag singénico, bien sea recién aisladas *ex vivo*, activadas bajo condiciones de control con activación TCR continuada, o privadas de señales de TCR y tratadas con rapamicina y LY294002 después de 18 horas. La puntuación de colitis se determinó al cabo de ocho semanas.

g) Timocitos CD4 positivos individuales, CD25 negativos fueron activados, se retiraron las señales TCR, se añadió rapamicina/LY294002 al cabo de 18 horas y se analizó la expresión de Foxp3 2 días más tarde como en b).

La figura 8 muestra la implicación diferencial de isoenzimas p110 en la inducción de Foxp3.

a) Células LN naive fueron activadas como en la figura 1 y se añadieron inhibidores de PI3K al cabo de 18 horas. La especificidad de la isoforma de p110 de cada inhibidor a la concentración usada se muestra junto al porcentaje de células Foxp3+.

5 b) El porcentaje células pS6+ fue determinado mediante tinción intracelular a los 90 min (negro, media \pm SD, n = 3 - 5 excepto TGX-115, n = 1, panel derecho). Se muestra el aumento en las células Foxp3 + sobre el de cultivos privados de señalización de TCR (rojo, media \pm SD, n = 4 - 12). Se indican los valores de IC₅₀ determinados *in vitro* para enzimas relevantes.

La figura 9 muestra que la inducción de Foxp3 por señalización de PI3K/mTOR es independiente de TGF β .

10 a) Células T LN naive fueron activadas en medio AIM-V libre de suero durante 18 horas, y los extractos de células completas fueron sometidos a electroforesis en gel de SDS e inmunotransferencia después de la exposición de las células a TGF β (1 ng/ml) (durante 90 minutos, calle 1), privación de señal de TCR (90 minutos, calle 2), o privación de señal de TCR, rapamicina y LY294002 (90 minutos, calle 3 o 8 horas, calle 4). La mancha fue quitada y sondada con anti pSmad2 (S465/467) y anti Smad2/3.

15 b) Células T LN naive activadas como en a) fueron privadas de señales de TCR y se añadieron inhibidores de TGF β y PI3K/mTOR como se indica. Los cultivos fueron suplementados con anti TGF β neutralizante (3 μ g/ml) o el inhibidor de Smad cinasa SB431542. Se muestra la expresión de Foxp3 en presencia de anti TGF β (barras gris oscuro) o SB431542 (barras gris claro) determinada 2 días más tarde normalizadas a cultivos testigo sin anti TGF β y SB431542 (barras negras; TGF β 22,3 \pm 7,0%, n = 9; PIK90 36,0 \pm 12,9%, n = 7; PI-103 35,1 \pm 3,8%, n = 8; LY294002 21,5 \pm 4,0%, n = 4 y rapamicina 28,6 \pm 9,0%, n = 4). ND: no realizado. Se sustrajo la expresión de Foxp3
20 en cultivos privados de señal de TCR (9,2 \pm 5,6%, n = 6).

La figura 10 muestra el impacto de la señalización de TCR sobre la red de PI3K/mTOR/Akt en células T CD4 recién activadas.

25 a) Células T CD4 LN naive fueron estimuladas con anti TCR y anti CD28 unido a placa durante 1 o 18 horas, o durante 1 hora con anti CD28 solo (no señalización de TCR). La fosforilación de S6 fue determinada mediante tinción intracelular y citometría de flujo.

b) Células LN naive fueron activadas como en a). Al cabo de 18 horas, se añadió rapamicina (25 nM) o LY294002 (10 μ M) durante una hora más, o las células fueron cultivadas durante el tiempo indicado en ausencia de anti TCR. Los niveles de pS6 fueron determinados como en a).

30 c) La inmunotransferencia confirmó la declinación de pS6 en respuesta a la privación de señal de TCR y la rapamicina detectada a nivel de célula individual en b). TGF β también redujo pS6. pAkt (S473) fue visible 1 hora, no 18 horas después de la activación de la célula T, pero reapareció en respuesta a la privación de señal de TCR, la rapamicina, y TGF β .

35 d) Modelo de ruta del eje PI3K/mTOR. PI3K activa Akt a través de PDK1, Akt inhibe TSC1/2, este activa mTOR, libera la inhibición traduccional a través de 4EBP/eIF4E y estimula la actividad ribosómica a través de S6K1/eIF4E.

e) Los modelos de red del eje PI3K/mTOR distingue mTORC1 y mTORC2. La actividad de S6K1 dependiente de mTORC1 bloquea la activación de mTORC2 por PI3K a través de IRS1. La actividad de Akt depende tanto de PDK1 (T308) como de mTORC2 (S473) (Jacinto et al., 2006; Sabatini, 2006).

40 f) La inhibición de Akt por Akti 1/2 induce la expresión de Foxp3. Células T CD4 naive fueron activadas y la expresión de Foxp3 fue evaluada como en la figura 1.

La figura 11 muestra la expresión de Foxp3 en respuesta a la privación de señal de TCR y la inhibición de PI3K/mTOR *in vivo*.

45 a) Para imitar la privación de señal de TCR, células LN CD62L^{hi}CD4⁺ CD25⁻ marcadas con CFSE fueron activadas y después transferidas intravenosamente a hospedadores singénicos, totalmente inmunocompetentes (2 – 4 \times 10⁶ células por receptor) con o sin rapamicina intraperitoneal (0,5 mg/kg) y LY294002 (15 mg/kg). La expresión de Foxp3 por células esplénicas CD4 endógenas (CFSE-) y transferidas (CFSE+) fue ensayada dos días más tarde. Con 5,3 \pm 4,6% (n = 11) la frecuencia de células Foxp3+ recuperadas fue 3 veces más alta que en los inóculos originales (1,5 \pm 1,1%). Cuando la transferencia de las células fue acompañada de rapamicina y LY294002 i.p., la frecuencia de células Foxp3+ aumentó más mientras que la expresión de Foxp3 entre células T endógenas (CFSE-) no cambió, demostrando selectivamente toxicidad a células T CD4 convencionales, pero no a Foxp3+.
50

b) Resumen de 11 experimentos de transferencia. Para estudiar si el aumento de células que expresan Foxp3 era debido a la recuperación selectiva de células T CD4 Foxp3+ o a la inducción de Foxp3, los autores de la presente invención transfirieron células CD62L^{hi}CD4⁺ CD25⁻ LN marcadas con CFSE después de 48 horas de activación, tiempo en el que la privación de TCR ya no inducía eficazmente la expresión de Foxp3 *in vitro* (véase la figura 1c).

Bajo estas condiciones, $1,3 \pm 0,5\%$ de células CFSE+ expresaron Foxp3 después de la transferencia ($n = 4$) y $1,6 \pm 0,3\%$ de células CFSE+ después de la transferencia en presencia de rapamicina y LY294002 ($n=3$).

La figura 12 muestra la inducción de Foxp3 por inhibidores de PI3K/mTOR en presencia de disponibilidad continua de ligandos de TCR.

- 5 Células T CD4 naive fueron activadas con esferas de CD3/CD28 (Dyna, $4 \mu\text{l}/10^6$ células). Se añadieron los inhibidores de PI3K/mTOR indicados ($1 \mu\text{M}$) a las 18 horas sin retirar las esferas, y la expresión de Foxp3 fue establecida dos días más tarde.

La figura 13 muestra la inducción de Foxp3 en respuesta a ligandos de TCR fisiológico y a la inhibición de PI3K/mTOR.

- 10 Células CD4 LN procedentes de ratones transgénicos AND TCR H2^b Rag1 deficientes fueron marcadas con CFSE y cultivadas con células de presentación de antígeno B10.BR (H2^k) derived de BM pre-cargadas con las concentraciones indicadas de péptido citocromo-C de pichón 81-104. Se añadió PIK90 ($1 \mu\text{M}$) al cabo de 18 horas sin eliminar las células de presentación de antígeno o el péptido antigénico. La expresión de Foxp3 fue analizada dos días más tarde.
- 15 La invención se describe ahora por medios de ejemplos. Se entiende que estos ejemplos son ilustrativos, y que no limitan las reivindicaciones anexas.

Ejemplos.

Materiales y métodos.

- 20 Cepas de ratones, clasificación y cultivo de las células. El trabajo con animales se realizó de acuerdo con el Animals (Scientific Procedures) Act, UK. Células de ganglios linfáticos (lymph node: LN) fueron teñidas, analizadas y clasificadas por citometría de flujo como se ha descrito (Cobb et al 2005 J. Exp. Med. 201: 1367 - 1373). La tinción intracelular para la proteína Foxp3 se hizo de la forma que recomiendan los fabricantes (eBiosciences.com). El estatus de la fosforilación de la proteína ribosómica S6 se determinó usando Ser235/236 anti pS6 (Cellsignaling cat.no. 2211, <http://www.cellsignal.com>) usando el *kit* de tinción para Foxp3 de eBioscience y IgG-FITC anti-conejo o IgG-Cy5 (Jackson Immunoresearch). Para la inducción de la expresión de Foxp3, se cultivaron células T LN CD4+ CD25- CD62L^{hi} a $1 - 3 \times 10^6/\text{ml}$ con anti-TCR β unido a placa (H57, Pharmingen, 200 ng/ml) y anti-CD28 ($2 \mu\text{g/ml}$, Pharmingen). Al cabo de 18 horas las células se dejaron para estimulación continuada de TCR o bien se llevaron a pocillos no recubiertos con los aditivos indicados.

- 30 Para establecer la función reguladora, células T CD4 cultivadas como se indica fueron tituladas en pocillos de fondo redondo que contienen 1×10^5 células LN totales marcadas con CFSE o bien 5×10^4 células T CD4+ CD25- marcadas con CFSE y 1×10^5 esplenocitos agotados de células T tratados con mitomicina C ($25 \mu\text{g/ml}$, 20 min, 37°C) con las concentraciones de anti CD3 indicadas (2C11, Pharmingen). Los perfiles CFSE de las células T CD4 fueron registrados entre 48 y 72 horas más tarde.

- 35 Experimentos de transferencia adoptiva (pasiva). Para establecer el impacto de la privación de señal de TCR y la inhibición de PI3-K/mTOR *in vivo*, células T BALB/c CD4+ CD25- CD62L^{hi} LN fueron marcadas con CFSE, activadas durante 18 horas como antes, y transferidas *iv* a receptores singénicos no tratados ($2 - 4 \times 10^6$ células por receptor). Se administró rapamicina y Ly294002 *ip* como se indica. Los esplenocitos fueron teñidos para CD4 y Foxp3 48 horas más tarde y la expresión de Foxp3 fue determinada para células CD4+ endógenas (CFSE-) y para transferidas (CFSE+).

- 40 RT-PCR y transferencias northern. El RNA total fue aislado usando RNAbee (Tel-Test, Friendswood, TX) y sometido a transcripción inversa. El análisis de PCR en tiempo real se llevó a cabo en un sistema Opticon@DNA (MJ Research Inc.; 95°C durante 15 min seguido por 40 ciclos de 94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, con una lectura de placa a 72°C) y se normalizó a la media geométrica de proteína de activación Ywhaz (tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido zeta) y Ube2L3 (enzima conjugadora de ubiquitina E2L3) como se describe (Cobb et al 2005 *ibid.*).

Secuencias de cebador (5' a 3')

Ywhaz directo: CGTTGTAGGAGCCCGTAGGTCAT

Ywhaz inverso: TCTGTTGCGAAGCATTGGG

Ubc directo: AGGAGGCTGATGAAGGAGCTTGA

- 50 Ubc inverso: TGGTTTGAATGGATACTCTGCTGGA

Foxp3 directo: ACTCGCATGTTGCGCTACTTCAG

Foxp3 inverso: GGCGGATGGCATTCTTCCAGGT

Ejemplo 1: La retirada de la señal de TCR induce la expresión de Foxp 3 en células T recién activadas.

Células CD4+ CD25- Naive fueron estimuladas con anti-TCR(H57) y anti-CD 28 unido a placa durante 18 horas y después fueron transferidas (en su medio original) a placas no recubiertas con anticuerpos TCR. 48 horas más tarde, la RT-PCR en tiempo real mostró niveles elevados de RNA Foxp3 en células privadas de señales TCR en comparación con testigos expuestos a señalización continuada de TCR (figura 1a). La tinción intracelular mostró la expresión de proteína Foxp3 en una fracción considerable de células T CD4 recién activadas privadas de señales de TCR ($10,8 \pm 7,6\%$ n = 30) (figura 1b), pero no en células dejadas en contacto con anticuerpo TCR ($1,0 \pm 0,8\%$ n = 21).

Ejemplo 2: La inhibición de la ruta PI3K/mTOR favorece la expresión de Foxp3 en células T recién activadas.

Para identificar rutas de señalización irrelevantes para la inducción de Foxp3, los autores de la presente invención hicieron un cribado de activadores e inhibidores de las rutas de transducción de señal. Estas incluyen inhibidores de calcineurina, que bloquean la translocación nuclear de NFAT (ciclosporina A y FK-506), activadores e inhibidores de MAPKs relevantes (quinasas activadas por mitógeno, incluyendo JNK/SAPK/p38 y cinasas upstream), una amplia gama de inhibidores y seudosustratos de isoenzimas PKC, GSK3 (glucógeno sintasa cinasa-3), HIF-1 α (factor inducible por hipoxia), la proteína Notch (que usa el inhibidor de β -secretasa L-685458) y BMP (proteínas morfogénicas óseas), que son parientes de TGF β . Ninguna de estas potenció de una manera detectable la expresión de Foxp3 iniciada por la privación de señal de TCR. En cambio, los inhibidores de PI3K y mTOR potenciaron de una forma acusada la inducción de Foxp3. El antibiótico macrólido inmunosupresor rapamicina indujo la expresión de Foxp3 en $26,8 \pm 14,4\%$ de las células dentro de las 24 - 48 horas (n = 30, figura 1b). De un modo similar, los inhibidores de PI3K Ly294002 (2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona) y wortmanina indujeron Foxp3 ($26,9 \pm 11,4\%$, n = 25 para Ly294002, figura 1b y $17,3 \pm 5,3\%$, n = 3, para wortmanina). El compuesto testigo Ly303511 (2-piperazinil-8-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona) es estructuralmente muy similar a Ly294002 pero no inhibe PI3-K debido a una única sustitución atómica en el anillo de morfolina. Ly303511 no afectó a la expresión de Foxp3 en este sistema ($6,6 \pm 3,0\%$, n = 7). La rapamicina y Ly294002 fueron de la máxima eficacia cuando se usaron en combinación con privación de señal de TCR 18 horas después de la activación células T CD4 naive, antes de que ocurriese la división de la célula (véase más adelante). Se requirió la señalización de TCR para que los inhibidores de PI3K/mTOR indujesen Foxp3, y la co-estimulación potenció de una forma acusada la eficiencia de la inducción de Foxp3 (de 3 a 9% para la retirada de la señal de TCR, de 7 a 46% para TGF β , de 10 a 25% para rapamicina y de 4 a 44% para Ly294002, media de dos experimentos. Como control positivo, TGF β indujo Foxp3 en $46,0 \pm 15,1\%$ de las células privadas de señalización continuada de TCR (n = 30, figura 1b). Para estudiar si el aumento de frecuencia de células que expresan Foxp3 era debido a la expansión selectiva de células Foxp3+ preexistentes, los autores de la presente invención marcaron las células T CD4 naive con CFSE antes de su activación. Ninguna división de células había ocurrido a las 18 horas después de la activación, en el momento en que la células se pusieron en las condiciones de cultivo indicadas (figura 1b). Al cabo de 24 horas, entre el 67 y el 108% de las células de entrada fueron recuperadas. A pesar de potenciar sustancialmente la frecuencia de las células que expresan Foxp3, la rapamicina y Ly294002 tuvieron por resultado una ligera reducción del número de divisiones de células, descartando la expansión selectiva como explicación para el aumento de frecuencia de las células que expresan Foxp3 en respuesta a la privación de señal de TCR y a inhibidores de PI3K/mTOR.

La inhibición de PI3-K/mTOR era menos efectiva al inducir Foxp3 en momentos más tardíos y una vez que había ocurrido la división de la célula (figura 1c).

Ejemplo 3: La señalización de TCR controla la actividad de mTOR en células T CD 4 recién activadas.

Para monitorizar la actividad del eje PI3K/mTOR en respuesta a la señalización de TCR, la retirada de la señal de TCR y el tratamiento con rapamicina y Ly294002, los autores de la presente invención analizaron el nivel de proteína ribosómica S6 fosforilada (pS6), la diana de la cinasa p70 S6, que es regulada directamente por mTOR. La tinción intracelular para pS6 mostró a nivel de célula individual que la señalización de TCR (H57 unido a placa, 300 ng/ml) combinada con anti-CD28 indujo niveles elevados de fosforilación de S6 en la mayoría de las células T CD4 naive (figura 2a). El anti-CD28 sólo no tenía efecto (figura 2a, panel superior). La fosforilación de S6 persistió en presencia de la señalización continuada de TCR, pero era completamente eliminada por rapamicina (25 nM) o Ly294002 (10 μ g/ml) en el plazo de una hora (figura 2b). La pS6 declinó más gradualmente cuando las células T CD4 naive que habían sido activadas durante 18 horas con H57 unido a placa y anti CD28, fueron privadas de señales de TCR (figura 2b). Por ello, la inducción de Foxp3 ocurre en respuesta a manipulaciones que reducen la fosforilación de S6. Es importante, sin embargo, que la reducción de la fosforilación de S6 no es suficiente para la inducción de Foxp3. En particular, la inhibición de por privación de nutriente de células T CD4 recientemente activadas no logra inducir la expresión de Foxp3.

Ejemplo 4: La inducción de Foxp 3 por privación de la señal de TCR e inhibidores de PI3K/mTOR es estable y tiene por resultado la adquisición de la función reguladora.

Como se describió anteriormente, la expresión de Foxp3 fue inducida dentro de las 24 - 48 horas en respuesta a la privación de señal de TCR y a inhibidores de PI3-K/mTOR. A continuación, los autores de la presente invención examinaron la estabilidad de la expresión de Foxp3 y la competencia funcional de las células inducidas en Foxp3, ya que la regulación por exceso de Foxp3 sin función reguladora ha sido descrita en células T CD4 humanas. Foxp3 se expresó de forma robusta al día 7 después de la inducción y la expresión era mitóticamente heredable, ya que se mantuvo establemente a través de varias rondas de re-estimulación en IL-2 (figura 3a). Pare establecer si la inducción de Foxp3 por inhibición de PI3K/mTOR tiene por resultado la función reguladora de las células T, se activaron células CD62LhiCD4+CD25- LN, se privaron de señales de TCR y se cultivaron en presencia de rapamicina y Ly294002. Números graduales de la población resultante (28% Foxp3+ mediante tinción intracelular) fueron añadidos a células T CD4 LN frescas marcadas con CFSE, y se bloqueó eficientemente su respuesta a anti CD3 soluble (2C11, 1 µg/ml) como se estableció mediante el perfil de división de las células (figura 3b, panel superior). En cambio, las células testigo (<1% de Foxp3+) no bloquearon la división inducida por anti CD3 de las células respondedoras marcadas con CFSE (figura 3b, panel inferior).

Los autores de la presente invención usaron un modelo de transferencia de células T de colitis (Powrie et al., 1993) para ensayar si la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR e inhibición de PI3K/mTOR confiere la capacidad de protección frente a la colitis, que es desencadenada cuando células T CD4 naive son transferidas a receptores deficientes en células T. (Powrie et al., 1993).

Ejemplo 5: Expresión de Foxp 3 en respuesta a la privación de señal de TCR e inhibición de PI3-K/mTOR *in vivo*.

A continuación los autores de la presente invención estudiaron si Foxp3 es inducido por la privación de señal de TCR y la inhibición de PI3-K/mTOR *in vivo*. Para simular la privación de señal de TCR, los autores de la presente invención inyectaron células CD62LhiCD4+CD25- LN marcadas con CFSE activadas, en la vena de la cola de hospedadores singénicos totalmente inmunocompetentes. Dos días más tarde evaluaron la expresión de Foxp3 por células CD4 esplénicas endógenas (CFSE-) y transferidas (CFSE+) (figura 4a). Con $5,3 \pm 4,6\%$ ($n = 11$) la frecuencia de células Foxp3+ recuperadas fue 3 veces más alta que la frecuencia de células Foxp3+ contenidas en los inóculos originales ($1,5 \pm 1,1\%$, resumido en la figura 4b). Cuando la transferencia *in vivo* de células T activadas marcadas con CFSE era acompañada por la inyección *in vivo* de rapamicina y Ly294002, la frecuencia de células que expresan Foxp3 que fueron recuperadas 2 días más tarde aumentó más, a aproximadamente 10% (figura 4). En cambio, la frecuencia de células T (CFSE-) Foxp3+ endógenas permaneció sin cambios, excluyendo la posibilidad de que los inhibidores fueran selectivamente tóxicos para las células T CD4 convencionales, pero no para las Foxp3+ (figura 4). A continuación los autores de la presente invención estudiaron si la elevada frecuencia de células que expresan Foxp3 era debida a la recuperación selectiva de células T CD4 Foxp3+ o a la inducción de Foxp3. Los autores de la presente invención transfirieron células CD62LhiCD4+CD25- LN marcadas con CFSE después de 48 horas de activación, momento en el cual la privación de TCR ya no inducía eficientemente la expresión de Foxp3 *in vitro* (véase la figura 1c). Bajo estas condiciones, solamente el $1,3 \pm 0,5\%$ de las células CFSE+ expresaron Foxp3 después de la transferencia ($n = 4$) y $1,6 \pm 0,3\%$ de células CFSE+ después de la transferencia en presencia de rapamicina y Ly294002 ($n = 3$, figura 4b).

Por eso, la privación de señal de TCR predispone a las células T recién activadas a la expresión de Foxp3 en sinergia con la inhibición del eje PI3-K/mTOR, lo que indica que la señalización de PI3-K/mTOR antagoniza la inducción de Foxp3 en células T recién activadas *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 6: Los inhibidores de PI3-K selectivos revelan una jerarquía entre isoenzimas p110 en la regulación de Foxp3.

Una nueva generación de inhibidores de PI3-K ha sido recientemente caracterizada a nivel bioquímico, estructural y biológico, y muestra tener selectividad para isoenzimas PI3-K en preferencia sobre una amplia gama de otras cinasas (Camps et al., Nat. Med. 2005, 11: 936 - 943; Knight et al., 2006 *ibid.*). Los autores de la presente invención utilizaron estos compuestos para diseccionar el papel de las isoenzimas p110 en la regulación de Foxp3 titulándolas en el ensayo de diferenciación de células T. En estos experimentos, se usó el marcaje con CFSE para establecer la progresión del ciclo celular como medida de la activación y viabilidad, y la inducción de Foxp3 fue ensayada a nivel de células individual (figura 5, paneles izquierdo y derecho), junto con la fosforilación de S6 (figura 5 panel derecho).

p110β y p110γ no afectan de una manera detectable a la expresión de Foxp3. TGX115 tenía un ligero impacto sobre la expresión de Foxp3 a 10 µM, en que inhibe tanto p110β como p110δ. A 0,1 µM, en donde TGX115 inhibe selectivamente p110β, no afectó a la expresión de Foxp3, lo que indica que p110β no desempeña un papel significativo en la regulación de Foxp3 en este sistema. De un modo similar, el inhibidor específico de p110γ AS-605240 afectó a Foxp3 solamente a una concentración muy por encima de su IC50 para p110γ (0,008 µM), descartando un papel para p110γ en la regulación de Foxp3 (figura 5, paneles izquierdo y derecho).

p110 α y p110 δ regulan la expresión de Foxp3 en células T recién activadas. El inhibidor IC-87114 indujo Foxp3 10-15% de células sobre y por encima de la privación de TCR solo bajando a 0,01 μ M. A estas concentraciones, IC-87114 inhibe selectivamente p110 δ , demostrando una contribución importante de la isoenzima p110 δ a la regulación de Foxp3. El compuesto PI-103 indujo fuertemente Foxp3, elevando la frecuencia de células que expresan Foxp3 en >20% por encima de la privación de señal de TCR sólo. PI-103 indujo Foxp3 a concentraciones ligeramente por debajo de su IC50 *in vitro* para mTORC1 (0,02 μ M) y alrededor de la IC50 para p110 α (0,008 μ M), consistente con un papel para p110 α . El inhibidor específico de p110 α PIK75 no pudo ser usado para ensayar esta sugerencia debido a la toxicidad a lo largo de la duración del ensayo de los autores de la presente invención (datos no mostrados). Una evidencia concluyente procede del análisis de PIK90, que indujo fuertemente Foxp3 a 0,1 μ M, donde inhibe selectivamente p110 α y p110 γ (figura 5, paneles izquierdo y derecho). Dado que los experimentos de los presentes autores con AS-605240 descartan un papel para p110 γ , este resultado identifica p110 α como la isoenzima p110 dominante en la regulación de Foxp3. Basándose en estos estudios, el papel de las isoenzimas p110 en la regulación de Foxp3 parece ser selectivo: p110 y p110 γ no juegan un papel detectable, p110 δ es moderadamente importante, y p110 α es predominante.

15 Ejemplo 7: Implicación de TGF β en la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR e inhibición de PI3K/mTOR.

Se sabe que TGF β es un potente inductor de la expresión de Foxp3 en células T CD4 convencionales *in vitro*, y por tanto los autores de la presente invención se preguntaron si el TGF β media la inducción de Foxp3 mediante privación de señal de TCR de células T recientemente activadas e inhibidores de PI3-K/mTOR. Como el medio de cultivo de las células suplementado con FCS contiene TGF β , los autores de la presente invención llevaron a cabo los experimentos descritos en esta sección en medio de cultivo libre de linfocitos (AIM-V, Invitrogen). La RT-PCR en tiempo real detectó la ausencia de aumento en TGF- β 1, la isoforma de TGF β predominante en el sistema inmunitario, pero se sabe que la regulación de TGF- β es compleja y los niveles de RNA no se correlacionan necesariamente con la cantidad de proteína segregada. La unión de TGF β a receptor II ALK5 y TGF β (TGF β RII) tiene por resultado la fosforilación de Smad2 y -3 asociado a receptor, que subsiguientemente se asocian con co-Smads, se translocan al núcleo y actúan como reguladores transcripcionales. La fosforilación de proteínas Smad por consiguiente proporciona un indicador sensible de la señalización de TGF β . Las células T LN naïve fueron activadas durante 18 horas en medio libre de suero y después se expusieron a TGF β (1 ng/ml) para privación de señal de TCR, o privación de señal de TCR más rapamicina y Ly294002. Los extractos de células completas fueron sometidos a electroforesis en gel de SDS y la transferencia western con anti pSmad2 (S465/467) mostró una fuerte fosforilación de Smad2 en respuesta a TGF β (figura 6a, calle 1). En cambio, no hubo una fosforilación detectable de Smad2 en respuesta a la privación de señal de TCR (figura 6a, calle 2), o a la privación de señal de TCR más rapamicina y Ly294002 (figura 6a, calles 3 y 4). La mancha fue subsiguientemente sondada con anti Smad2/3 como control de carga.

A continuación, los autores de la presente invención procuraron inhibir la señalización de TGF β usando dos métodos diferentes, anticuerpos neutralizantes contra TGF β y SB 431542, un inhibidor de cinasas de tipo receptor de activina TGF β (ALKs: Activin Like Kinases). SB-431542 es un inhibidor potente y específico de receptores ALK de tipo I de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta, ALK4, ALK5, y ALK7 (Inman et al 2002 Mol. Pharmacol. vol 62: 65 - 74). Dado que el medio de cultivo de células suplementado con FCS contiene TGF β , los autores de la presente invención llevaron a cabo estos experimentos en medio de cultivo de linfocitos libre de suero (AIM-V, Invitrogen). Los anticuerpos neutralizantes TGF β y SB431542 bloquearon la inducción de Foxp3 por TGF β en un 85% y un 96%, respectivamente, pero no tuvieron ningún efecto sobre la inducción de Foxp3 por inhibidores de PI3-K/mTOR (figura 6b).

Tabla 1. Especificidad de los inhibidores de molécula pequeña usados en la figura 5 y en otras para isoenzimas p100 y otras cinasas

	TGX115	IC87114	PIK90	PI-103	SA-605240
p110 α	61	>200	0,011	0,008	0,06
p110 β	0,13	16	0,35	0,088	0,27
p110 δ	0,63	0,13	0,058	0,048	0,3
p110 γ	100	61	0,018	0,15	0,008
PI3KC2 α	>100	>100	0,047	~1	
PI3KC2 β	50	>100	0,064	0,026	
PI3KC2 γ	100	>100	ND	ND	
hsVPS34	5,2	>100	0,83	2,3	

ES 2 386 082 T3

PI4Ks					
PI4KII α	>100	>100	>100	>100	
PI4KIII α	>100	>100	0,83	>100	
PI4KIII β	>100	>100	3,1	~50	
PIKKs					
ATR	>100	>100	15	0,85	
ATM	20	>100	0,61	0,92	
DNA-PK	1,2	>100	0,013	0,002	
mTORC1	>100	>100	1,05	0,02	
mTORC2	>100	>100	ND	0,083	
PIPKs					
PI4P5KI α	>100	>100	>100	>100	
PI4P5KI α	>100	>100	>100	>100	
PI5P4KII β	>100	>100	>100	>100	
Abl	121,2	103,6	103,4	100,8	
Abl (T315I)	141,2	99,4	111,3	108,1	
Akt1	126,6	122,2	140,2	108,5 -	
Akt1 (Δ PH)	91,4	89,6	122,4	123,1	
Akt2	98,8	116,5	102,0	98,8	
FAK	105,5	110,1	100,0	101,8	
Fyn	145,7	105,3	126,1	114,2	
GRK2	113,5	118,7	120,2	110,3	
GSK3 β	114,0	104,7	85,6	105,5 (+)	
Hck	104,9	93,0	94,7	94,9	
Insulin R,	108,4	115,7	102,8	106,0	
JNK1 α 1	99,9	88,5	94,2	83,6 -	
JNK2 α 1	104,8	107,1	90,5	81,0 -	
JNK2 α 2	95,4	87,7	83,1	76,9	
IRAK4	112,7	93,1	94,9	105,6	
NEK2	125,2	114,3	103,4	120,0	
PKA	105,4	108,6	103,1	102,5 -	
PKC δ	103,9	104,6	100,7	101,2	
PKC ϵ	108,9	114,1	105,2	103,4	
PDK1	111,2	113,4	110,4	107,5 -	
PLK1	122,7	109,6	107,6	106,2	
p38	101,2	104,1	98,5	99,8	

Src –	111,7	113,3	103,7	100,6	
Src (T338I)	112,8	95,7	109,5	113,4	
WNK1	107,5	109,0	108,6	104,1	
Zap70	123,8	110,5	115,8	117,7 -	
Akt2 (APH)	104,4	117,8	108,5	112,6	
Akt3	97,6	111,0	113,3	103,5	
CamKII	111,4	115,4	116,1	127,6 -	
CDK1/cyc. B	103,0	116,0	126,6	142,3 (+)	
CDK2/cyc. A	105,3	102,4	100,9	98,5 -	
Chk1	119,9	103,0	102,9	92,3 -	
CK1	99,7	98,1	97,8	84,8 (+)	
CK2	103,3	111,7	103,1	108,1	
Erk1	96,7	93,7	98,8	92,0	
Erk2	107,7	104,7	119,8	114,7	

Resumen de los Ejemplos 1-7.

Los autores de la presente invención muestran que la señalización de TCR y la actividad de PI3-K/mTOR antagoniza la inducción de Foxp3 en células T recién activadas. Sin desear vincularse con ninguna teoría, este hallazgo tiene importantes implicaciones para comprender la regulación inmunológica, ya que une la elección entre el destino de la célula T reguladora y la efectora a la terminación de la señalización de TCR. Las respuestas inmunitarias efectivas reducen la carga de antígeno y crean condiciones en las que la disponibilidad de antígeno se hace limitante. Los resultados de los autores de la presente invención indican cómo la regulación inmunitaria puede ligarse a la fase de involución de las respuestas inmunitarias, lo que es importante para la homeostasis de la célula T y para limitar la patología inmunitaria.

La inhibición farmacológica del eje PI3K/mTOR potencia la inducción de Foxp3 disparada por la privación de señales de TCR. La implicación de PI3K/mTOR es selectiva, ya que el bloqueo de PKC, N-FAT, GSK-3, MAPK, Notch y otros no tiene por resultado la inducción de Foxp3 en los sistemas de los ejemplos. La actividad de PI3-K persiste durante muchas horas después de la activación de la célula T y los hallazgos de los autores de la presente invención demuestran que el eje PI3K/mTOR es crítico en la prevención de la inducción de Foxp3 en células T recién activadas. Las PI3-quinasas de clase I se subdividen en dos grupos, A y B, basándose en la implicación selectiva de las isoenzimas p110, las subunidades catalíticas de PI3-K. La expresión de las subunidades p110 δ y p110 γ está principalmente restringida a los leucocitos, mientras que p110 α y p110 β se expresan de forma ubicua y son esenciales para el desarrollo embrionario. p110 γ , el miembro único de Clase IB, es importante para el desarrollo y la activación de la célula T y una diana principal para el tratamiento de las respuestas inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. El enlace entre la señalización de PI3K y la enfermedad ha proporcionado un importante impulsor para el desarrollo y la introducción en la clínica de inhibidores selectivos de subunidades PI3-K. Los autores de la presente invención han empleado inhibidores selectivos caracterizados extensivamente para mostrar selectividad entre isoenzimas p110, en donde p110 α y p110 δ , pero no p110 o p110 γ , regulan Foxp3. Aunque p110 γ es activada por receptores acoplados a proteína G, la clase IA PI3Ks p110 α , p110 δ y p110 β son típicamente activadas aguas abajo del receptor de tirosina cinasa y por tanto están implicadas en la señalización del receptor de linfocitos. De un modo interesante, la jerarquía entre IA PI3Ks en la regulación de Foxp3 parece ser distinta de su contribución relativa a la actividad de PI3-K estimulada por TCR. Los análisis genético y farmacológico apuntan ambos a un papel prominente para p110 δ en la señalización del receptor de antígeno en linfocitos B y T, mientras que los datos de los autores de la presente invención indican que p110 δ tiene un papel significativo pero menos dominante en la regulación de Foxp3, donde p110 α parece dominar. La distinción funcional entre isoformas p110 en la señalización de TCR y la regulación de Foxp3 ayuda al experto en la manipulación de la respuesta inmunitaria.

Los ratones p110 δ deficientes no solo muestran defectos en la activación de linfocitos, sino que también desarrollan enfermedad intestinal inflamatoria, el sello de la deficiencia de Treg. Una posible explicación para esto está sugerida por la dependencia de la tolerancia a Treg en IL-9 derivada de mastocitos y el papel esencial de p110 δ para la función de los mastocitos o células cebadas. De forma consistente con estos datos, la función de Treg es dañada en la

periferia de ratones deficientes p110δ. A pesar de esto, la diferenciación de Tregs aumenta en el timo deficiente en p110δ de acuerdo con los hallazgos de los autores de la presente invención.

Tanto los inhibidores de PI3-K como la rapamicina han sido usados para reprimir respuestas inmunitarias no deseadas pero los mecanismos por los cuales los inhibidores de PI3-K/mTOR regulan la inmunidad son desconocidos en gran parte. Se ha sugerido un enlace entre inhibidores de PI3-K y autoinmunidad por el hallazgo de que ratones heterocigóticos para Pten, un antagonista de la señalización de PI3-K, desarrollaron autoinmunidad, así como otras observaciones. Las PI3-Ks regulan numerosos procesos en múltiples tipos de célula y los mecanismos potenciales para la implicación de PI3-Ks en la autoinmunidad incluyen el aumento de la supervivencia de las células T y el reclutamiento y activación de células de presentación de antígeno, mastocitos y otros tipos de células inflamatorias. Anteriormente se había publicado que la rapamicina afecta al número de células T reguladoras positivamente o negativamente en ensayos a largo plazo. Los hallazgos de los autores de la presente invención establecen la regulación de Foxp3 como mecanismo por el cual los inhibidores de PI3-K/mTOR modulan la inmunidad.

Al contrario que las isoenzimas p110α y δ de clase IA, la isoenzima PI3-K de clase IB p110γ funciona predominantemente aguas abajo de los receptores acoplados a la proteína G (en vez de cinasas de tirosina src), y PI3-Kγ no regula de forma significativa Foxp3. Sin embargo, PI3-Kγ desempeña un importante papel en el desarrollo y activación de la célula T y recientemente ha sido reconocido como diana para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Los inhibidores de PI3-Kγ son fármacos eficaces en la prevención y en el tratamiento de la autoinmunidad pero, como demuestran los autores de la presente invención, no a través de la inducción de Foxp3 en células T recién activadas.

Estudios anteriores habían ligado la rapamicina a la delección o la expansión prolongada de Tregs preexistentes, especialmente en combinación con la retirada del factor de crecimiento, pero la rapamicina parecía no tener efecto sobre la inducción *de novo* de Foxp3. Aquí los autores de la presente invención demuestran la rápida inducción *de novo* de Foxp3 por la rapamicina en combinación con la privación de señal de TCR.

TGFβ es un potente inductor de Foxp3 en células T CD4 naive y por tanto los autores de la presente invención indagaron si TGFβ está implicado en la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR de células T recién activadas e inhibidores de PI3-K/mTOR. No han encontrado ninguna evidencia de que las células T recién activadas aumenten la producción de TGFβ en respuesta a la privación de señal de TCR e inhibición de PI3K/mTOR. La inducción de Foxp3 fue eficiente en medio libre de suero, lo que excluye el requisito de TGFβ derivado de suero. Los hallazgos de los autores de la presente invención indican que la privación de señal de TCR e inhibidores de PI3-K/mTOR no tienen por resultado la fosforilación detectable de Smad2, y que la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR e inhibidores PI3-K/mTOR es independiente de TGFβ exógeno resistente a anti-TGFβ neutralizante y resistente a SB431542. Por consiguiente son consistentes con un modelo en el que los inhibidores PI3-K/mTOR inducen Foxp3 por una ruta independientemente de TGFβ.

En resumen, los autores de la presente invención han identificado una nueva ruta, independiente de TGFβ, de inducción de Foxp3 en células T naive recién activadas. Estos hallazgos subrayan la importancia de la señalización de TCR para la elección entre el destino efector y la función de Treg y los autores describen nuevos planteamientos para conducir la diferenciación de la célula T reguladora por inhibidores de molécula pequeña de señalización de PI3K/mTOR en situaciones en las que es deseable la manipulación de respuestas inmunitarias.

Ejemplo 8: Inducción de la expresión *de novo* de Foxp 3.

Los autores enseñan que la activación de células T CD4 naive crea una ocasión para la inducción de la expresión de Foxp3, controlada por la señalización de PI3K/mTOR.

Visión de conjunto: La activación revela el potencial de las células T CD4 naive para diferenciarse hacia una gama de tipos de célula T colaboradora (Th: helper), o, alternativamente, a adoptar un destino de célula T reguladora (célula Treg). La forma en la que se controla la elección del destino de célula efectora frente a la reguladora es en gran parte desconocida en la técnica anterior. Los autores de la presente invención muestran que la expresión del factor de transcripción Foxp3 de la señalización de la célula Treg es inducida cuando las células T CD4 naive son privadas de señales de TCR poco después de la activación. La inducción de Foxp3 es controlada por la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), subunidades catalíticas p110α y p110δ, Akt y mTOR. Estos hallazgos ligan las rutas de transducción de señal de TCR a la elección del destino de célula Treg. La invención proporciona nuevos planteamientos para la manipulación experimental y terapéutica de la diferenciación de la célula T reguladora.

Introducción: Los tipos de célula especializados en los organismos multicelulares son definidos por patrones específicos de expresión génica. Durante su diferenciación a partir de células madre hematopoyéticas multipotenciales, las células T en desarrollo experimentan una considerable restricción de su linaje potencial. Las opciones que permanecen abiertas a las células T CD4 naive incluyen varios subconjuntos de Th distintos (tales como Th1, Th2 y Th17) y el destino de célula Treg. La elección del linaje Th es importante para respuestas inmunitarias específicas a patógenos específicos, mientras que el equilibrio entre las funciones efectora y reguladora es crítico para asegurar competencia inmunológica y evitar al mismo tiempo una excesiva patología inmunitaria y autoinmunidad. Las células T reguladoras naturales se caracterizan por la expresión del factor de transcripción de señalización Foxp3 y la ex-

presión de Foxp3 estable a alto nivel es tanto necesaria como suficiente para la función de la célula T reguladora. Las células Treg proceden del timo y de células T CD4 periféricas naive. TGFβ instruye la expresión de Foxp3 *in vitro* pero, al igual que IL-2, es importante para el mantenimiento de células Treg *in vivo* en vez de para la diferenciación de la célula Treg. Dado que la base molecular de la elección entre el destino de célula T efectora y reguladora es desconocida en la técnica anterior, los autores de la presente invención exponemos identificar señales que inducen la expresión de Foxp3 y la función de célula T reguladora en células T CD4 naive.

Experimental: Células CD4 + CD25 - naive son activadas con anti-TCR unido a placa y anti-CD28 soluble durante 18 horas y después se trasladan a pocillos frescos con anti-CD28 soluble solamente. Dos días más tarde, la RT-PCR en tiempo indicó una elevada expresión de RNA de Foxp3 en células privadas de señales de TCR en comparación con testigos expuestos a señales de TCR continuas (figura 7a) y la proteína Foxp3 fue detectada en 10,8 ± 7,6% (n = 30) de células privadas de señales de TCR, pero solamente en 1,0 ± 0,8% (n = 21) de células dejadas en contacto con anticuerpo TCR (figura 7b). Para identificar las rutas que controlan Foxp3 aguas abajo de la señalización de TCR, los autores de la presente invención cribaron inhibidores de molécula pequeña de enzimas implicadas en la transducción de la señal. Los inhibidores de PI3K y mTOR potenciaron de forma acusada la inducción de Foxp3 (figura 7b), mientras que los inhibidores de calcineurina/NFAT (ciclosporina A y FK-506), cinasas activadas por mitógeno (MAPKs JNK, SAPK, p38 cinasas aguas arriba), isoenzimas proteína cinasa-C, glucógeno sintasa cinasa -3, factor inducible por hipoxia, y γ-secretasa/Notch no lo hicieron. El inhibidor de mTOR rapamicina indujo Foxp3 en el 26,8 ± 4,4% de células (n = 30, figura 7b). De un modo similar, los inhibidores de PI3K LY294002 wortmanina indujeron Foxp3 en el 26,9 ± 11,4% (n = 25, figura 7b) y el 17,3 ± 5,3% de las células, respectivamente (n = 3). El derivado de LY294002, LY303511, no inhibe PI3K debido a una única sustitución atómica en el anillo de morfina y no induce la expresión de Foxp3. TGFβ se usó como control positivo (figura 7b). Para estudiar si el aumento de la expresión de Foxp3 era el resultado de la expansión selectiva de células Foxp3 + pre-existentes, los autores de la presente invención marcaron células T CD4 naive con CFSE antes de la activación. Ninguna división celular había tenido lugar al cabo de 18 horas, cuando las células fueron expuestas a inhibidores. La rapamicina y LY294002 redujeron ligeramente el número de divisiones celulares que ocurrieron durante las siguientes 24 - 48 horas, pero potenciaron sustancialmente la frecuencia de expresión de Foxp3 (figura 7b), y Foxp3 fue expresada en muchas células que habían sido sometidas a división celular (figura 7b). Por tanto, la privación de señal de TCR y los inhibidores PI3K/mTOR inducen la expresión de Foxp3 en células T CD4 naive.

La activación de la célula T fue requerida para la inducción de Foxp3 (figura 7c) y la coestimulación potenció de una manera acusada su eficacia.

La coestimulación potenció de forma acusada la eficacia de la inducción de Foxp3 en respuesta a la privación de señal de TCR y la inhibición de PI3K/mTOR:

	Priv. de señal de TCR	rapamicina	LY294002
anti-TCR	3% Foxp3 ⁺	10% Foxp3 ⁺	4% Foxp3 ⁺
anti-TCR + anti-CD28	9% Foxp3 ⁺	25% Foxp3 ⁺	44% Foxp3 ⁺

Para explorar la relación temporal entre la activación de la célula T y la inducción de Foxp3, los autores de la presente invención retiraron la estimulación de TCR e inhibieron PI3K/mTOR en momentos diferentes (figura 7c). La inducción de Foxp3 fue máxima cuando las células T fueron activadas durante 18 horas antes de la inhibición de PI3K/mTOR. La adición más temprana de inhibidores bloqueó la división celular y tuvo como resultado una inducción de Foxp3 menos eficaz. De un modo similar, la inducción Foxp3 fue ineficaz cuando había ocurrido en instantes más posteriores, una vez que había ocurrido la división celular (figura 7c). Los autores de la presente invención llegan a la conclusión de que la activación de la célula T crea una ocasión para la inducción de Foxp3.

Una vez inducida, la expresión de Foxp3 era mitóticamente heredable y se mantenía a través de varias rondas de reestimulación (figura 7d). La expresión de Foxp3 estaba acompañada por la función reguladora de la célula T, ya que las células inducidas por Foxp3 (36% Foxp3⁺) bloquearon eficazmente la división celular de las células T CD4 LN marcadas con CFSE en respuesta al anti CD3 soluble (figura 7e, panel superior), mientras que las células activadas testigo (1% Foxp3⁺) no lo hicieron (figura 7e, panel inferior). Las células T CD4 CD45RB^{hi} activadas en reposo o testigo causan colitis cuando se transfieren a ratones deficientes en linfocitos (Rag - / -), mientras que la colitis era acusadamente menos grave cuando Foxp3 había sido inducida en una proporción de células T CD4 CD45RB^{hi} (28% Foxp3⁺) antes de la transferencia (figura 7f).

Aunque las células T CD4 periféricas pueden dar lugar a células Treg “adoptivas”, su importancia fisiológica comparada con las células Treg que surgen “naturalmente” en el timo es un área de interés. Para estudiar si las manipulaciones de la transducción de señal de TCR conduce la expresión de Foxp3 en los timocitos, los autores de la presente invención activaron timocitos CD4 simples positivos, CD25 negativos durante 18 horas y añadieron inhibidores de PI3K/mTOR (figura 7f). El análisis de la expresión de Foxp3 dos días más tarde demostró la inducción de Foxp3 en una considerable fracción de los timocitos.

Una nueva generación de inhibidores de PI3K ha sido recientemente caracterizada a nivel bioquímico, estructural, y biológico. La selectividad de estos compuestos para las isoenzimas PI3K ha sido extensamente validada mediante ensayos de cinasa *in vitro* y experimentos basados en células (véase la Tabla 1) y comparando directamente los efectos de la ablación farmacológica y genética sobre la señalización de insulina y la activación de linfocitos. Los autores de la presente invención utilizaron estos compuestos para definir la implicación de las subunidades catalíticas PI3K en el control de Foxp3. El compuesto TGX115 tenía un ligero impacto sobre la expresión de Foxp3 a 10 μM , donde inhibe tanto p110 β como p110 δ , pero no afecta a la expresión de Foxp3 a 0,1 μM , donde inhibe selectivamente p110 β . De un modo similar, el inhibidor específico de p110 γ AS-605240 afectaba a Foxp3 solamente a concentraciones muy por exceso de su IC₅₀ para p110 γ (0,008 μM ; indicando que p110 δ y p110 γ no juegan un importante papel en la regulación de Foxp3 en este planteamiento (figura 8a, b). El compuesto IC-87114 indujo consistentemente Foxp3 en 10 - 15% de las células sobre y por encima de la privación de TCR solo a concentraciones en las que inhibe selectivamente p110 δ (0,01 μM), demostrando una contribución significativa de p110 δ a la regulación de Foxp3. El compuesto PI-103 indujo intensamente Foxp3, elevando la frecuencia de células que expresan Foxp3 en > 20%. PI-103 indujo Foxp3 a concentraciones ligeramente por debajo de su IC₅₀ *in vitro* para mTOR (0,02 μM) y alrededor de la IC₅₀ *in vitro* para p110 α (0,008 μM), de forma consistente con un papel para p110 α . El inhibidor PIK75 específico para p110 α no pudo ser usado para ensayar esta sugerencia debido a la toxicidad sobre la duración del ensayo. Una evidencia concluyente para un papel de p110 α provino del análisis de PIK90, que indujo fuertemente Foxp3 a 0,1 μM , donde inhibe selectivamente p110 α y p110 γ (figura 8a, b). Dado que la inhibición de p110 γ no afectó a la inducción de Foxp3 (véase más arriba) este resultado identifica p110 α como la isoenzima p110 dominante en este entorno. Esta jerarquía de isoenzimas p110 ($\alpha > \delta \gg \beta$ y γ) parece poner la regulación de Foxp3 aparte de la activación de linfocitos, en donde p110 δ es considerado como dominante.

Desde luego los valores de IC₅₀ *in vitro* han de ser tratados como guía para las IC₅₀s celulares; los valores celulares son típicamente algo más altos a causa de la competencia del ATP. IC87114 es extraordinariamente selectivo a p110 δ , especialmente a 1 μM , así que el 15% de inducción a esa concentración es claramente debida a δ . TGX-115 tiene un efecto muy pequeño incluso a 10 μM (donde se obtiene menor inhibición de δ), de forma que beta es probablemente de importancia limitada o periférica. Los inhibidores α 103 y 90 muestran una inducción drástica por encima de IC87114 a dosis bajas, lo que indica que α desempeña un papel significativo. La ventana entre α y δ para esos compuestos no es muy grande, de forma que la observación clave es que tienen más actividad que la que tiene IC87114 a dosis de δ totalmente inactivadoras (10 μM). La interpretación de los datos de AS-605240 depende de cual es el IC₅₀ celular para ese compuesto para γ ; a 10 μM se obtiene algo de inhibición de α con este compuesto. Así, es muy improbable que gamma se acoplase a la señalización de TCR en este contexto.

TGF β es un potente inductor de la expresión de Foxp3 en células T CD4 convencionales *in vitro* y los autores de la presente invención estudiaron su papel en el presente sistema. La unión de TGF β que une a ALK5 receptor II de TGF β (TGF β RII) tiene por resultado la fosforilación de Smad2 y -3 asociado a receptor, que proporciona un indicador sensible de la señalización de TGF β . pSmad2 (S465/467) era fácilmente detectable en respuesta a TGF β (figura 9a calle 1) pero no en respuesta a la privación de señal de TCR (figura 9a, calle 2), o la inhibición de PI3K/mTOR (figura 9a, calles 3 y 4). Los anticuerpos TGF β neutralizantes y SB 431542, que bloquea las cinasas similares a receptor de activina TGF β , redujeron la inducción de Foxp3 por TGF β (en un 85% y 96%, respectivamente), pero no tuvieron efecto sobre la inducción de Foxp3 por inhibidores de PI3K/mTOR (figura 9b), demostrando que TGF β es dispensable para la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR e inhibición de PI3K/mTOR.

Para monitorizar la actividad del eje PI3K/mTOR en las células T CD4 recién activadas los autores de la presente invención analizaron la fosforilación de proteína S6 ribosómica (pS6), una diana de la p70 S6 cinasa regulada por mTOR, S6K1. La señalización de TCR/CD28 (pero no anti-CD28 solo) indujo niveles elevados de pS6 (figura 10a). El mantenimiento de la actividad de mTOR en células T activadas 18 horas requirió la señalización continuada de TCR, ya que la fosforilación de S6 declinó cuando las señales de TCR fueron retiradas (figura 10b). La fosforilación de S6 fue completamente eliminada por la rapamicina o LY294002 (figura 10b). La proteína cinasa de serina/treonina Akt/PKB es fosforilada rápidamente en respuesta a la señalización a través de TCR/CD28 pero, al contrario que pS6, pAkt (S473) ya no era detectada 18 h después de la iniciación de la señalización de TCR/CD28 (figura 10c). La fosforilación de Akt (S473) fue restablecida, sin embargo, cuando células T activadas 18 h fueron privadas de señales de TCR, lo que tuvo por resultado niveles crecientes de pAkt a 1, 3, y 8 horas y una declinación recíproca en los niveles de pS6 (figura 10c). La exposición a rapamicina durante 1 hora tuvo un efecto similar. El aumento de la fosforilación de Akt en respuesta a la privación de señal de TCR y al tratamiento con rapamicina es incompatible con una ruta tradicional de señalización lineal (figura 10d) pero es consistente con un modelo de red en el que la actividad de Akt es controlada tanto por PDK1 como por mTORC2. En este modelo, mTORC2 (mTOR/ricor/Sin1) está bajo control de retroalimentación negativa de mTORC1 (mTOR/raptor) via S6K1, que fosforila e inhibe IRS1 (sustrato 1 receptor de insulina) y reduce la activación de Akt via PI3K, PDK1 y mTORC2 (figura 10e). Aplicado a los datos de los autores de la presente invención, la retirada de la señalización de TCR hace descender la actividad de mTORC1 y S6K1 (figura 10b), lo que reduce la inhibición de retroalimentación de mTORC2 y explica el aumento observado en pAkt (S473) (figura 10c). De un modo similar, el tratamiento a plazo corto con rapamicina bloquea la inhibición de retroalimentación dependiente de mTORC1 de mTORC2, que tiene por resultado fosforilación de Akt (S473) (figura 10c, e). De forma interesante, TGF β tiene también por resultado la reducción de pS6 y el aumento de pAkt S473, y en este aspecto simula la privación de señal de TCR y la inhibición de mTOR (figura 10c).

La fosforilación de S6 reducida sola no fue suficiente para inducir la expresión de Foxp3, ya que la privación de nutrientes de células T CD4 activadas 18 horas inhibió pS6 pero no indujo Foxp3 (señalización continuada de TCR: 2% de Foxp3+; privación de señal de TCR 11% de Foxp3+; rapamicina: 25% de Foxp3+; medio de cultivo IMDM con 0,1% de FCS: 4% de Foxp3+; PBS con 10% de FCS: 5% de Foxp3+; PBS con 0,1% de FCS: 2% de Foxp3+). Queda pendiente si la inducción de Foxp3 por privación de señal de TCR es debida al aumento de la actividad de Akt después de la pérdida de inhibición de retroalimentación mediada por mTORC1, o, alternativamente, a la eventual pérdida de actividad de Akt, que ocurre cuando la exposición a largo plazo a la rapamicina interfiere con el conjunto de mTORC2, y en consecuencia con la fosforilación de Akt (S473). Para estudiar esta cuestión, los autores de la presente invención usaron un inhibidor alostérico, Akti-1/2. Akti-1/2 potenció la expresión de Foxp3 en células T recién activadas a concentraciones alrededor de su IC50 para Akt1 y Akt2 (58 nM y 210 nM, respectivamente), demostrando que la inhibición de Akt, no la activación de Akt, conduce la inducción de Foxp3 (figura 10f).

Resumen

En resumen, los autores de la presente invención han demostrado que la activación crea una ocasión para la inducción de Foxp3 en células T CD4 naive. La inducción de Foxp3 parece independiente de TGF β y es antagonizada por la señalización de PI3K/mTOR/Akt. Este hallazgo tiene importantes implicaciones para entender la regulación inmunitaria, por cuanto liga la elección entre el destino de la célula T efectora y reguladora a las rutas de transducción de señal de TCR. De forma consistente con el hallazgo de que p110 δ regula la expresión de Foxp3, se genera un número mayor de lo normal de células Treg en el timo de ratones deficientes en p110 δ . A plazo más largo, la deficiencia de p110 δ perjudica el mantenimiento y la función de la célula Treg, posiblemente porque p110 δ es importante para otros tipos de célula tales como los mastocitos, lo que a su vez afecta a las células Treg. Estas consideraciones, junto con el papel diferencial de las isoenzimas p110 en la regulación de Foxp3, han demostrado los autores que permiten nuevas estrategias para la manipulación de la respuesta inmunológica. Un obstáculo potencial para la generación de células Treg específicas del antígeno por inhibición de PI3K/mTOR es si el método requiere la eliminación de ligandos de TCR para permitir la inducción de Foxp3. Sin embargo, los autores de la presente invención demuestran que los inhibidores de PI3K/mTOR inducen Foxp3 en una considerable proporción de células T CD4 naive en la presencia continuada de esferas de anti CD3/CD28 (figura 12). Foxp3 era también inducible por inhibición de PI3K/mTOR en células CD4 LN transgénicas AND TCR Rag1 deficientes estimuladas por células de presentación de antígeno y péptido específico, demostrando que ahora es ventajosamente posible generar células Treg específicas del antígeno usando inhibidores de PI3K/mTOR.

De manera interesante, la señalización de PI3K/mTOR/Akt comprometida no solo favorece la diferenciación de las células Treg, sino que, según se ha publicado, la señalización de Akt es comprometida en células Treg y sus dianas, dando lugar a la posibilidad de que la función de la célula T reguladora implique alteraciones en la señalización de PI3K/ mTOR/Akt.

La falta de compromiso de TCR mantenido o señalización de TCR comprometida puede ocurrir en situaciones relevantes para la regulación inmunitaria, tal como la presentación del antígeno por APCs no profesionales, baja dosis de antígeno durante la fase de involución de respuestas inmunológicas o expresión en mosaico del antígeno. Esto es consistente con la selección de células Treg por células epiteliales que expresan ectópicamente antígenos específicos del tejido en el timo y en los ganglios linfáticos.

Materiales y métodos para el Ejemplo 8.

Ratones, clasificación de células y cultivo. El trabajo con animales se llevó a cabo de acuerdo con el Animals (Scientific Procedures) Act, UK. Células de los ganglios linfáticos (Lymph Node: LN) o timocitos a partir del tipo silvestre fueron teñidos, analizados y clasificados por citometría de flujo como se ha descrito (Thompson et al., 2007 Immunity Vol 26 pp 335 - 344) a partir de ratones de tipo silvestre (C57BL/6, BALB/c o C57BL/6 \times 129) o a partir de ratones transgénicos H2b AND TCR Rag1 deficientes. Las células de presentación de antígeno fueron derivadas de médula ósea en presencia de GM-CSF e incubadas con péptido antigénico. La tinción intracelular para proteína Foxp3 se hizo como aconsejan los fabricantes (eBiosciences.com). El estatus de fosforilación de la proteína ribosómica S6 fue determinado usando anti pS6 Ser235/236 (Cell Signaling cat.no. 2211, <http://www.cellsignal.com>) usando el *kit* de tinción de Foxp3 eBioscience e IgG-FITC anti conejo o IgG-Cy5 (Jackson ImmunoResearch). Para la inducción de la expresión de Foxp3, células T CD4 + CD25 - CD62L^{hi} LN clasificadas fueron cultivadas a 1 - 3 \times 10⁶/ml con anti-TCR β unido a placa (H57, Pharmingen, 200 ng/ml) y anti-CD 28 soluble o unido a placa (2 μ g/ml, Pharmingen). Al cabo de 18 horas las células se dejaron tal cual para la estimulación de TCR continuada o se pasaron a pocillos no recubiertos con los aditivos indicados. Para establecer la función reguladora, las células T CD4 cultivadas como se indica fueron tituladas en pocillos de fondo redondo que contienen 1 \times 10⁵ células LN totales marcadas con CFSE o bien 5 \times 10⁴ células T CD4 + CD25 - marcadas con CFSE y 1 \times 10⁵ esplenocitos agotados en células T tratados con mitomicina-C (25 μ g/ml, 20 min, 37 $^{\circ}$ C) con las concentraciones indicadas de anti CD3 (2C11, Pharmingen). Los perfiles de CFSE de célula T CD4 fueron registrados entre 48 y 72 horas más tarde.

Experimentos de transferencia adoptiva. Células CD4 naive CD4+ CD25- CD45RB^{hi} fueron transferidas a hospedadores deficientes en linfocitos (Rag -/-) y la colitis fue puntuada como se describe (Powrie et al., 1993 Int. Immunol. Vol 5 pp 1461 - 1471).

RT-PCR y transferencias northern e inmunotransferencias. El RNA total fue aislado usando RNAbee (Tel-Test, Friendswood, TX) y se sometió a transcripción inversa. Se llevó a cabo análisis de PCR en tiempo real en un aparato Opticon® DNA (MJ Research Inc.; 95° C durante 15 min seguido por 40 ciclos de 94° C durante 15 s, 60° C durante 30 s y 72° C durante 30 s con una lectura de placa a 72° C) y se normalizó a la media geométrica de Ywhaz (proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido zeta) y Ube2L3 (enzima de conjugación con ubiquitina E2L3) como se ha descrito (Thompson et al., 2007 anterior).

Secuencias de cebador (5' a 3')

Ywhaz directa: CGTTGTAGGAGCCCGTAGGTCAT;

Ywhaz inversa: TCTGGTTGCGAAGCATTGGG;

10 Ubc directa: AGGAGGCTGATGAAGGAGCTTGA;

Ubc inversa: TGGTTTGAATGGATACTCTGCTGGA;

Foxp3 directa: ACTCGCATGTTTCGCCTACTTCAG;

Foxp3 inversa: GGCGGATGGCATTCTTCCAGGT

Las inmunotransferencias se hicieron como se describe (Thompson et al., 2007 anterior).

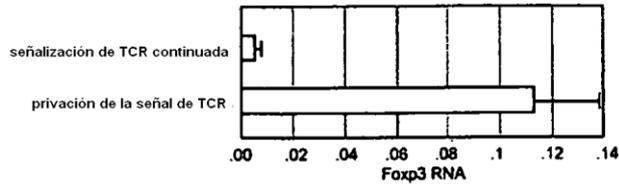
15

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir la expresión de Foxp3 en una célula T que comprende
 - (i) estimular una célula T *in vitro*
 - (ii) inhibir la señalización *in vitro* a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt en dicha célula T, en donde dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de (i).
2. Un método para inducir la expresión de Foxp3 en una célula T previamente estimulada, que comprende inhibir la señalización *in vitro* en dicha célula T a través de PI3K alfa o PI3K delta o m-TOR o Akt, en el que dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha inhibición se comienza aproximadamente de 17 a 19 horas después de la estimulación.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que dicha inhibición se comienza aproximadamente 18 horas después de la estimulación.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de señalización comprende inhibir la señalización a través de la inhibición de PI3K alfa o PI3K delta.
6. Un método según la reivindicación 5 en el que la inhibición de la señalización a través de PI3K alfa o de PI3K delta comprende poner en contacto dicha célula con el inhibidor de PI3K, y en el que dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además retirar dicha estimulación no más tarde del momento de inhibir la señalización.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que estimular dicha célula T comprende estimular dicha célula T a través del receptor de células T (TCR).
9. El uso de un inhibidor de PI3K en la inducción *in vitro* de la diferenciación de una célula T en una célula T reguladora, en el que dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta, en el que dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de la célula T.
10. El uso de un inhibidor de PI3K en la inducción *in vitro* de la expresión de Foxp3 en una célula T, en el que dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta, en el que dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de la célula T.
11. Un método para generar una célula T reguladora, que comprende
 - (i) estimular una célula T *in vitro*
 - (ii) inhibir la señalización *in vitro* a través de PI3K alfa y/o PI3K delta o m-TOR o Akt en dicha célula T, en el que dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de (i).
12. Un método para generar una célula T reguladora, que comprende tratar *in vitro* una célula T CD8– estimulada, con inhibidor de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), en el que dicho inhibidor inhibe PI3K alfa y/o PI3K delta, en el que dicha inhibición se comienza de 10 a 22 horas después de la estimulación de la célula T.
13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, u 11 o 12, o un uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que dicho inhibidor de PI3K comprende LY 294002.

Figura 1. La privación de la señal de TCR induce la expresión de Foxp3 por células T recién activadas en sinergismo con inhibidores de la ruta de PI3-K/mTOR

a



b

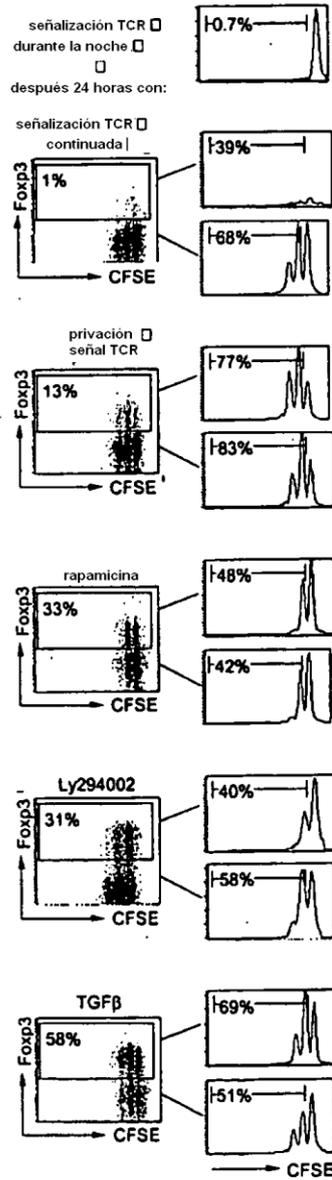


Fig. 1 Cont .

C

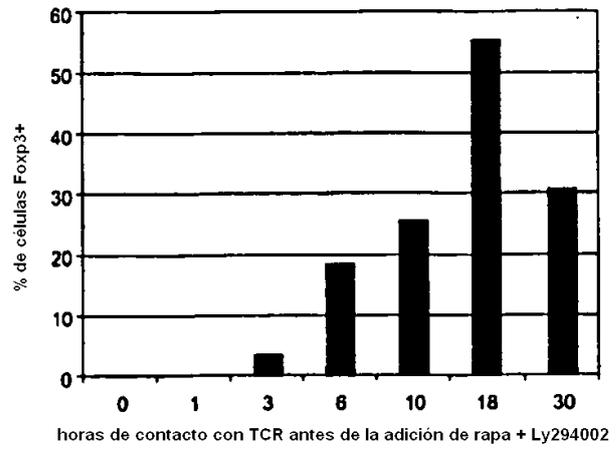
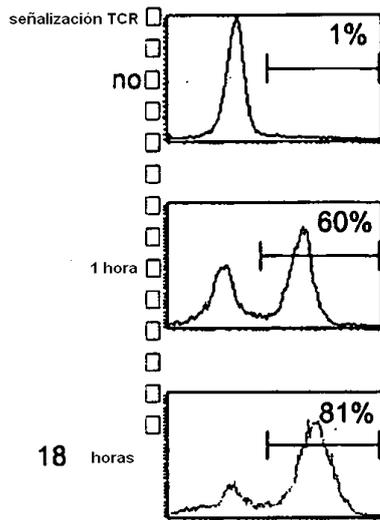


Figura 2: La señalización de TCR controla la actividad de mTOR en células T CD4 recién activadas.

a



b

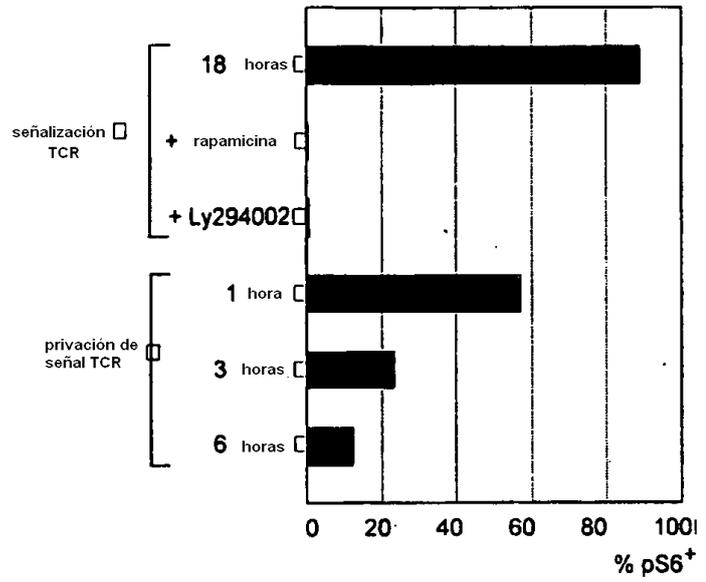


Figura 3. La inducción de Foxp3 por privación de la señal de TCR e inhibidores de PI3K/mTOR es estable y tiene como resultado la adquisición de la función reguladora.

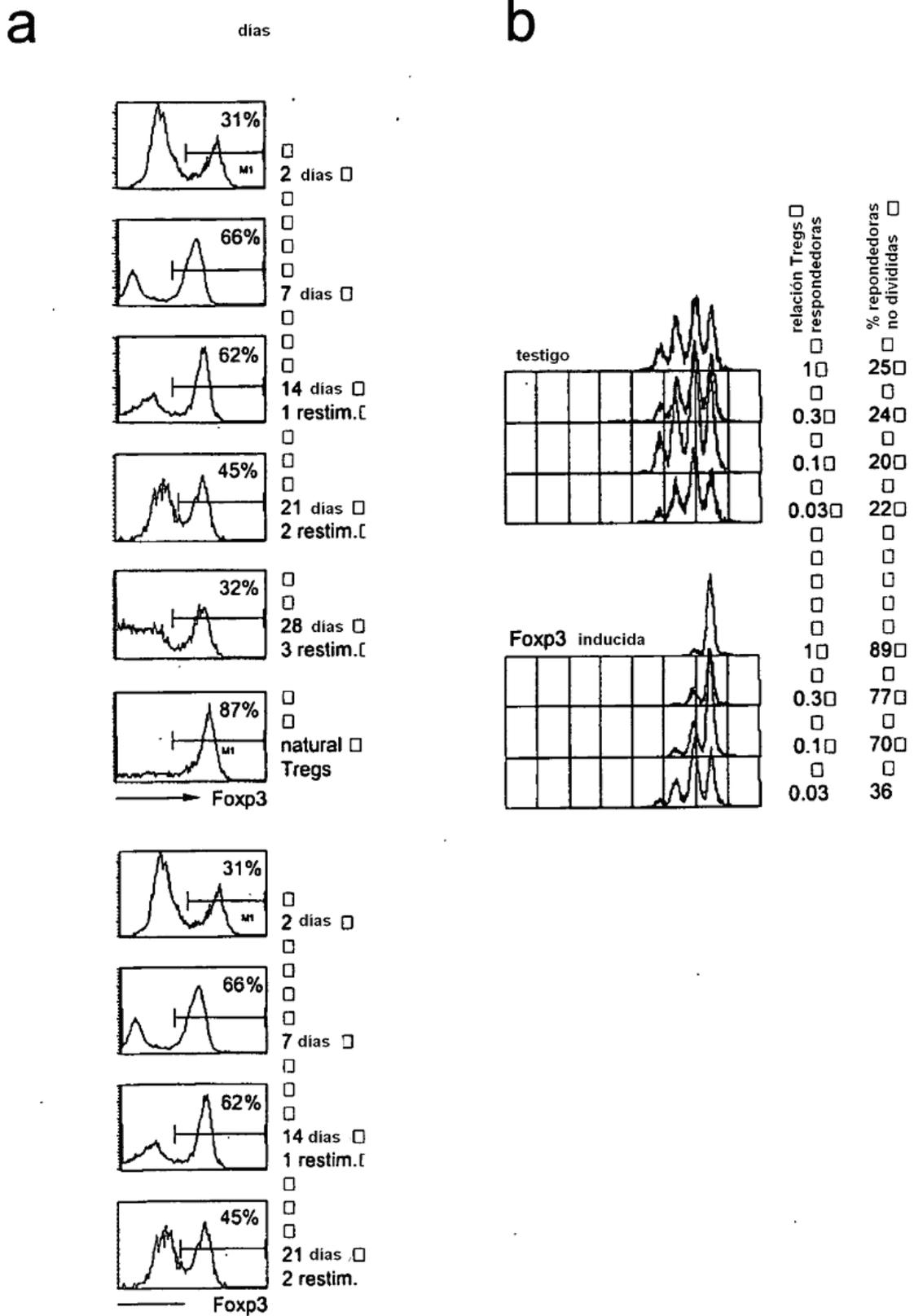


Figura 4. Expresión de Foxp3 en respuesta a la privación de señal e inhibición de PI3K/mTOR *in vivo*.

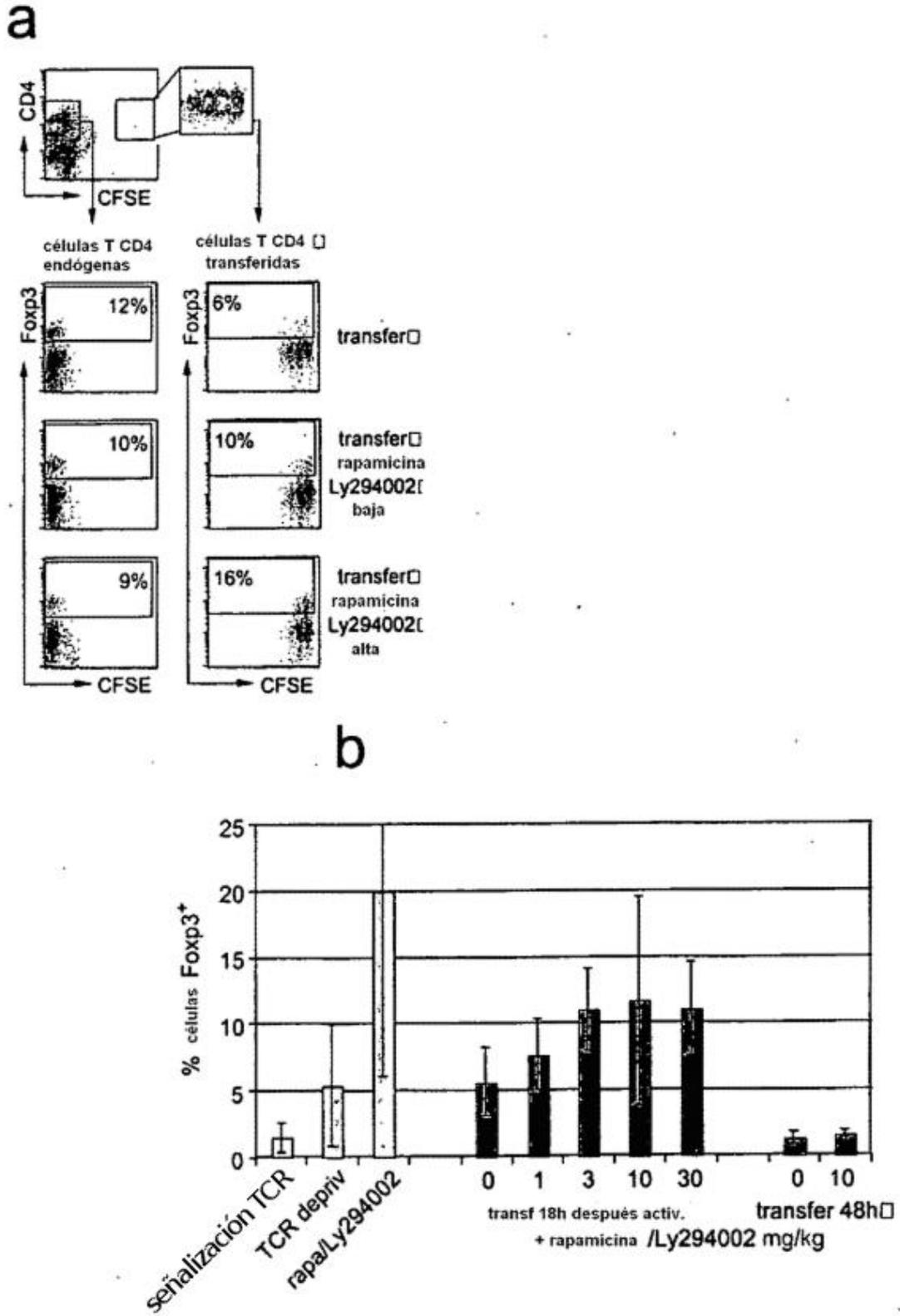
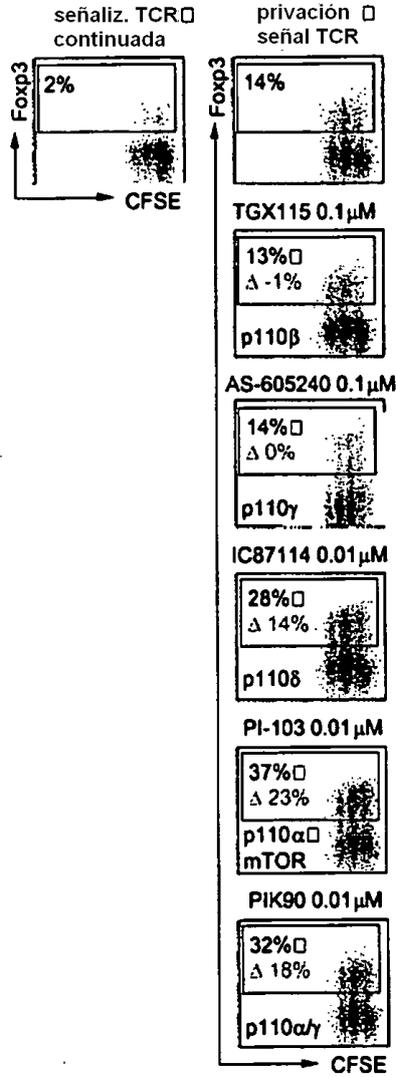


Figura 5. Implicación diferencial de isoenzimas p110 en la inducción de Foxp3.

Panel izq.



Panel derecho

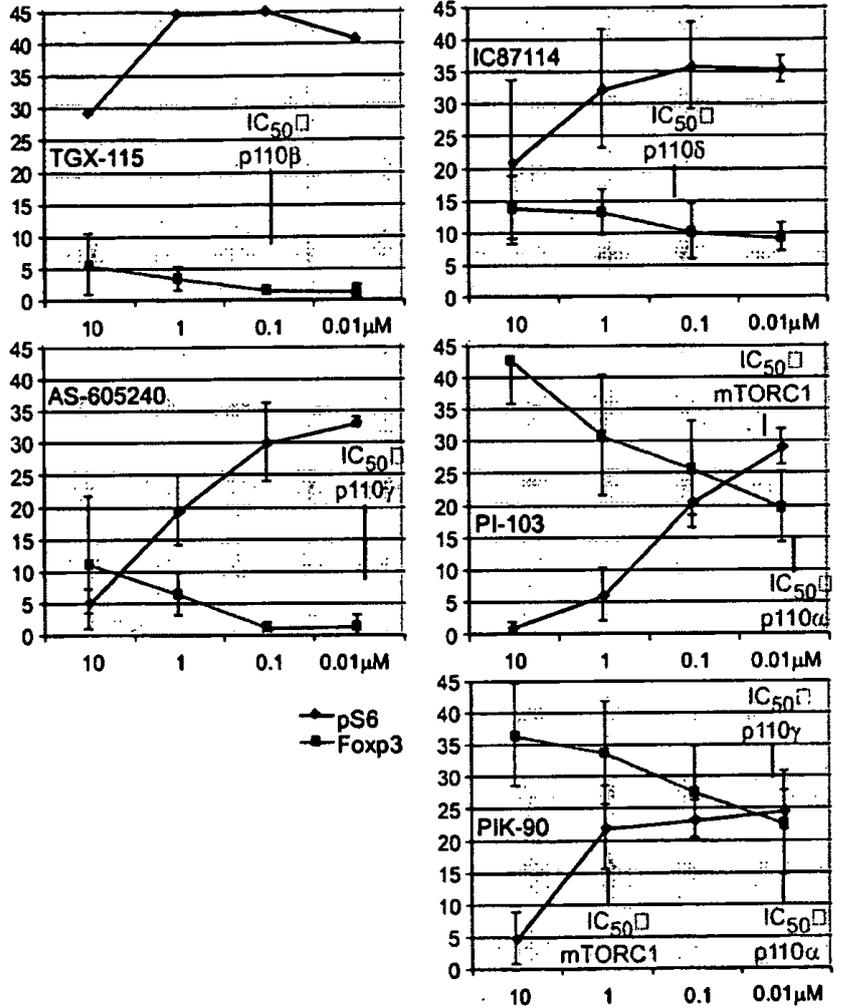
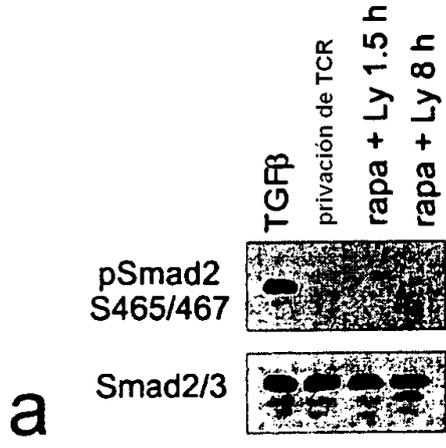


Figura 6. La inducción de Foxp3 por inhibidores de señalización de PI3K/mTOR es independiente de TGFβ.



b

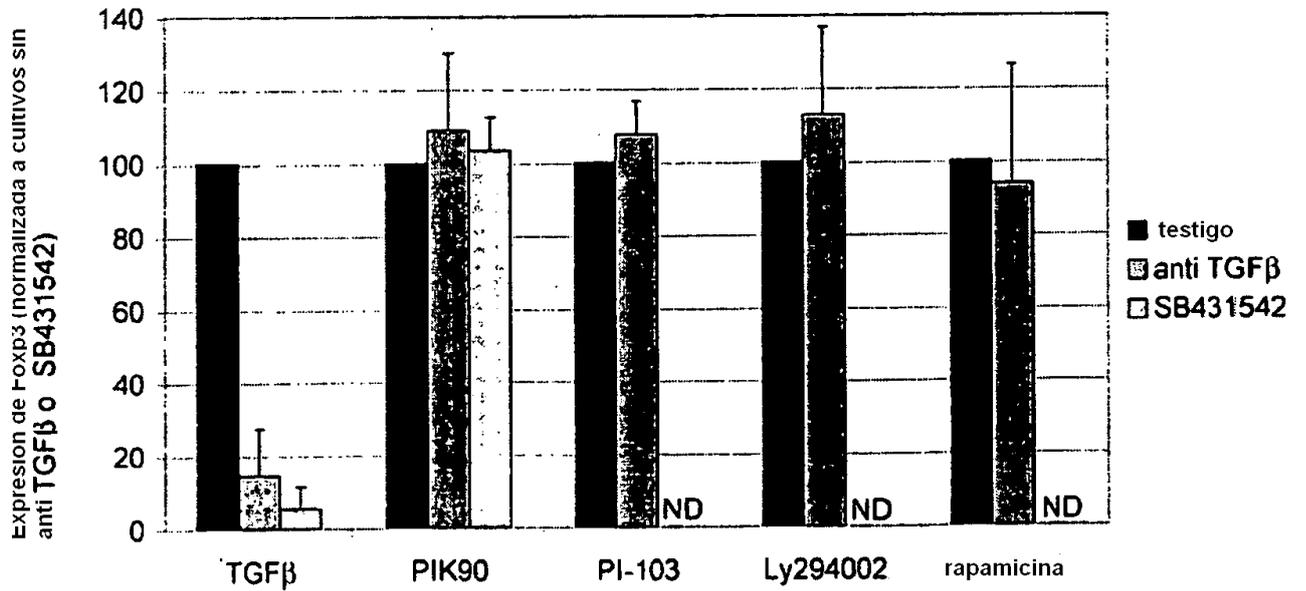


Figura 7.

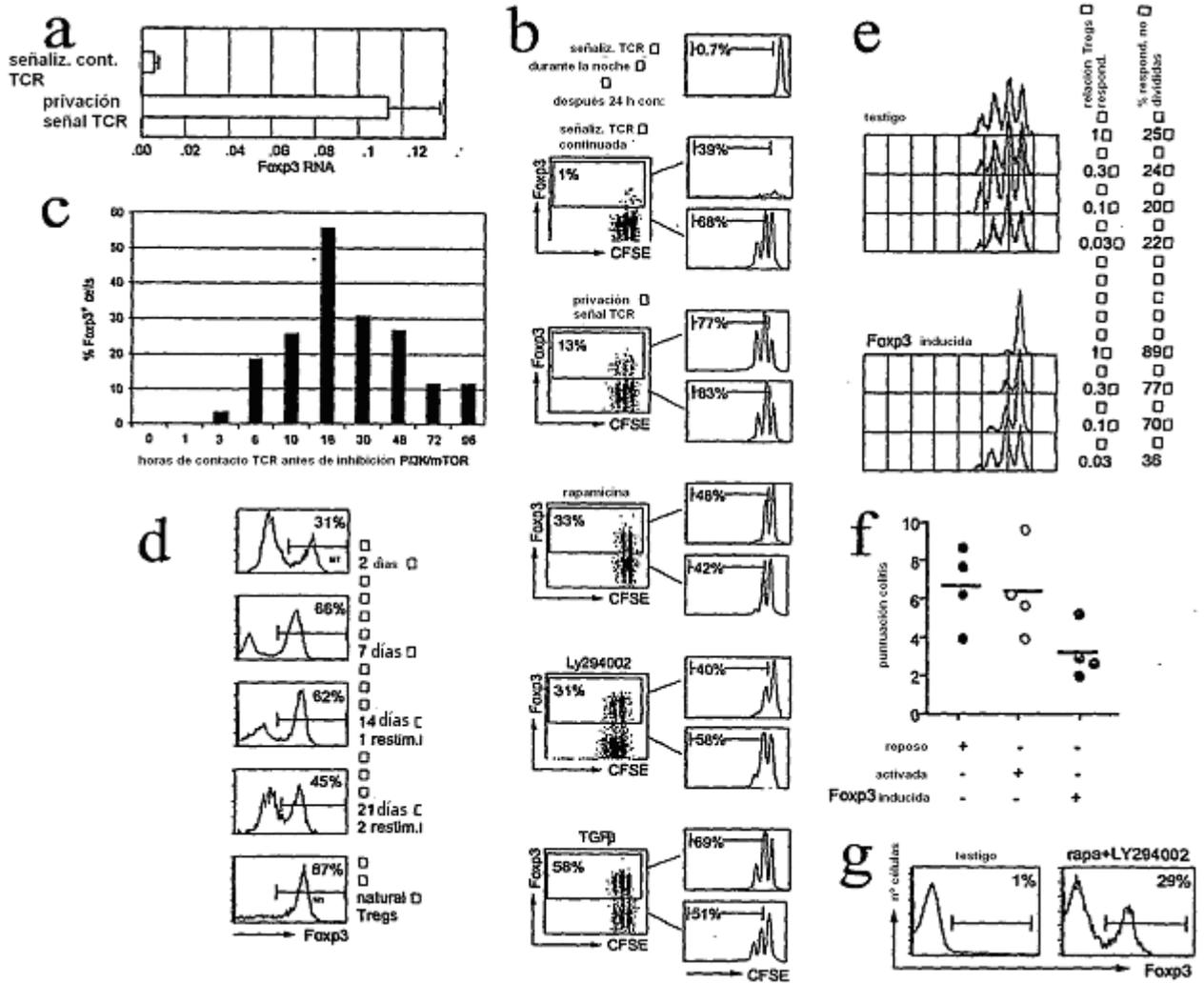
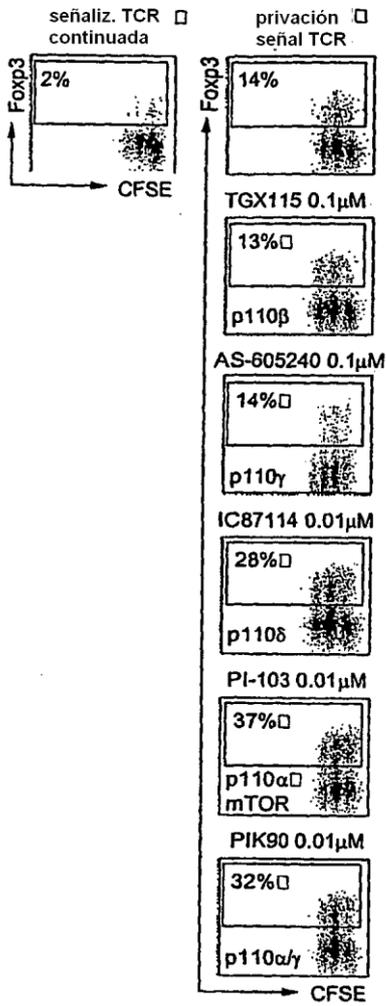


Figura 8

a



b

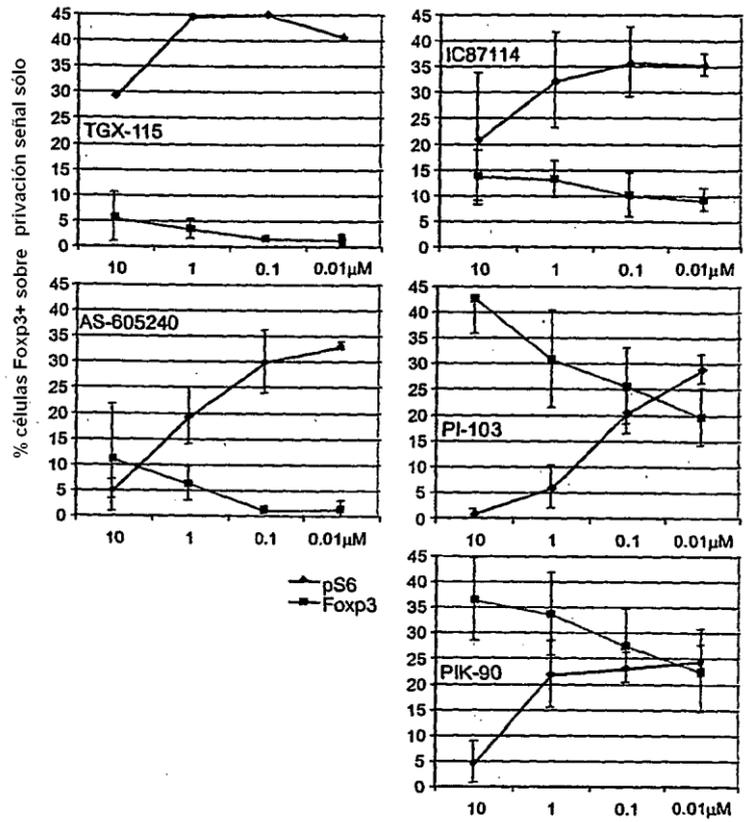


Figura 9

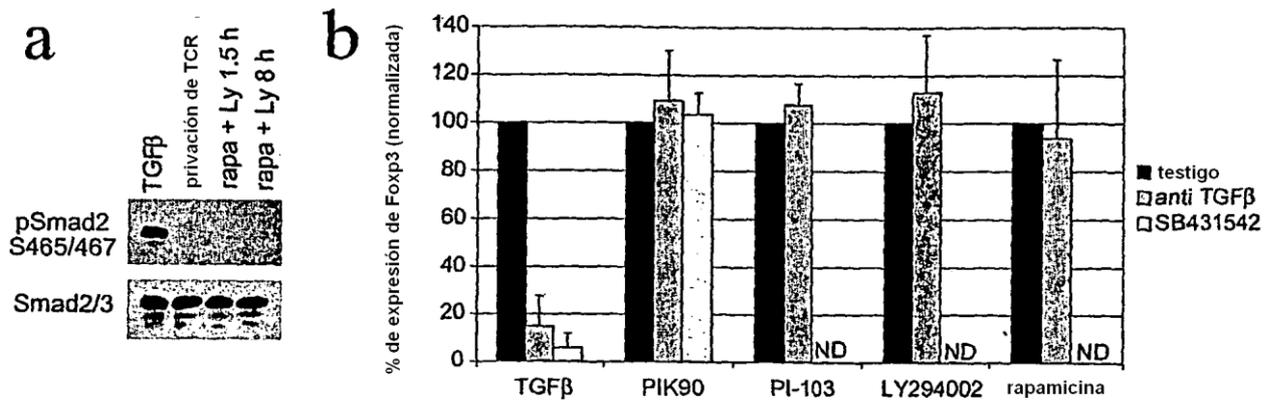


Figura 10

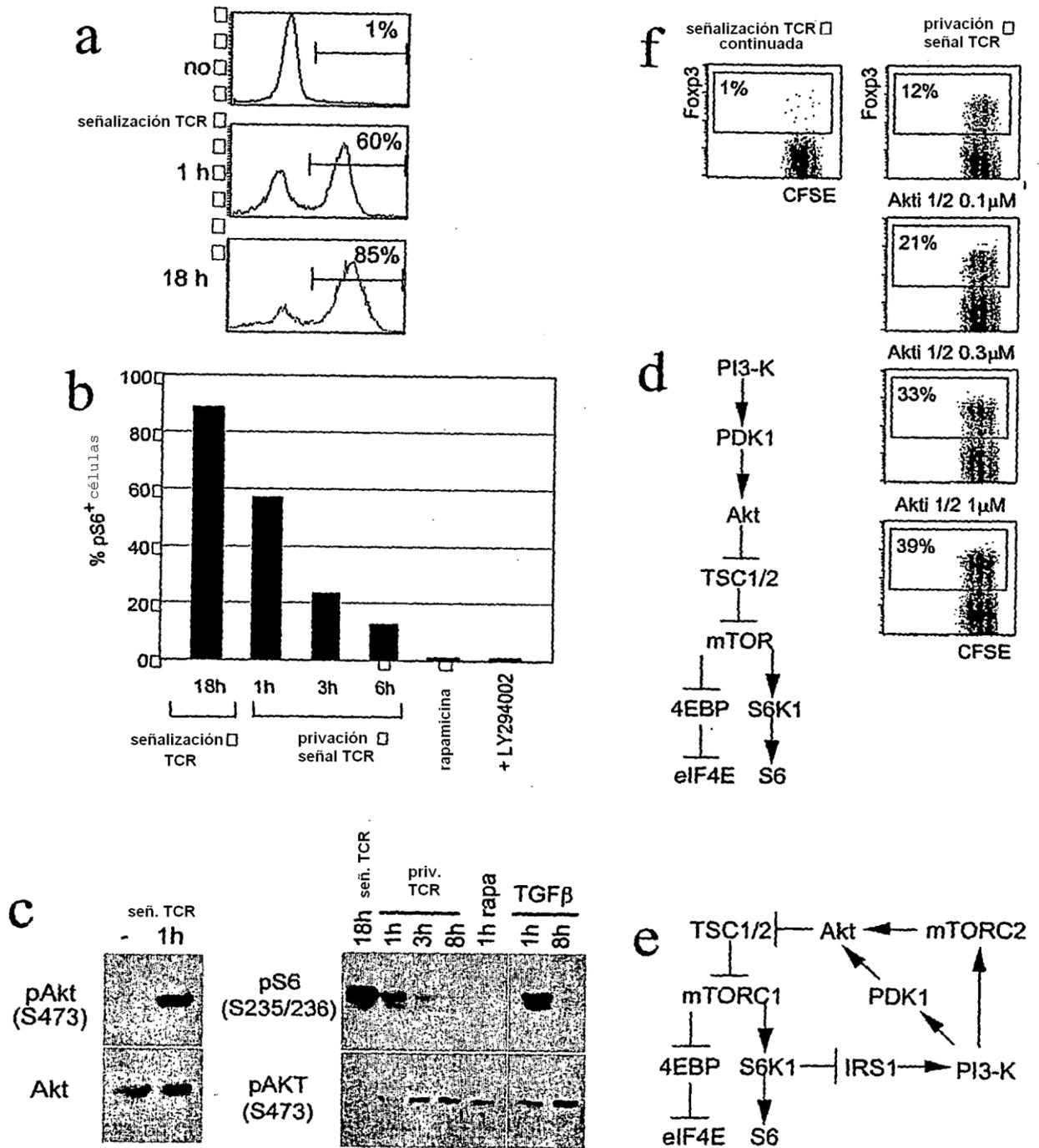
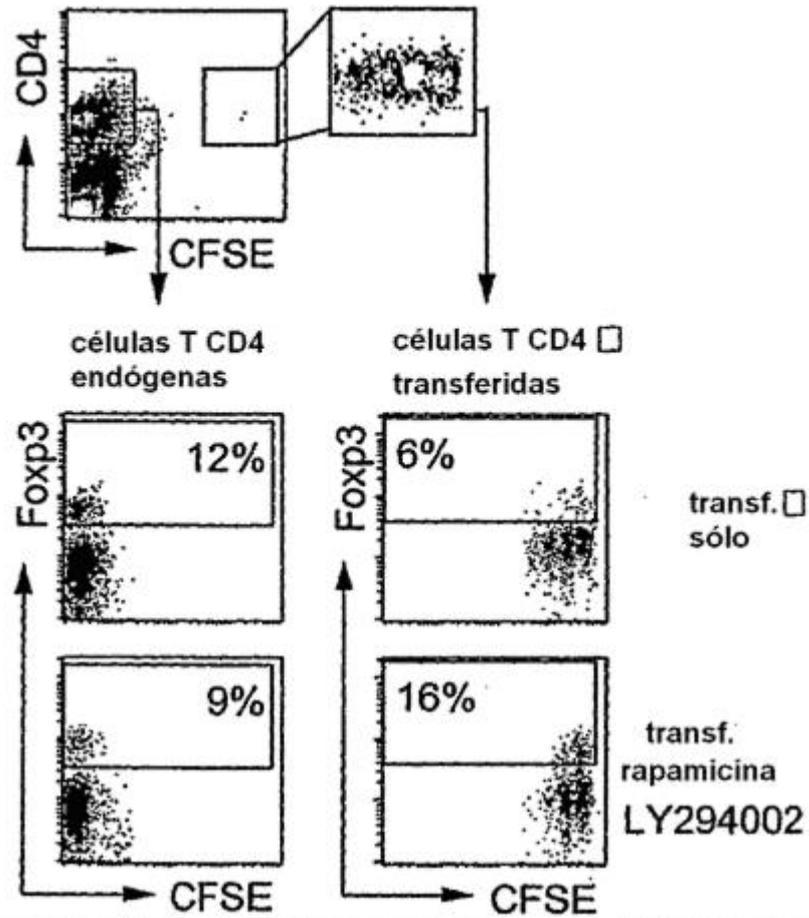


Figura 11

a



b

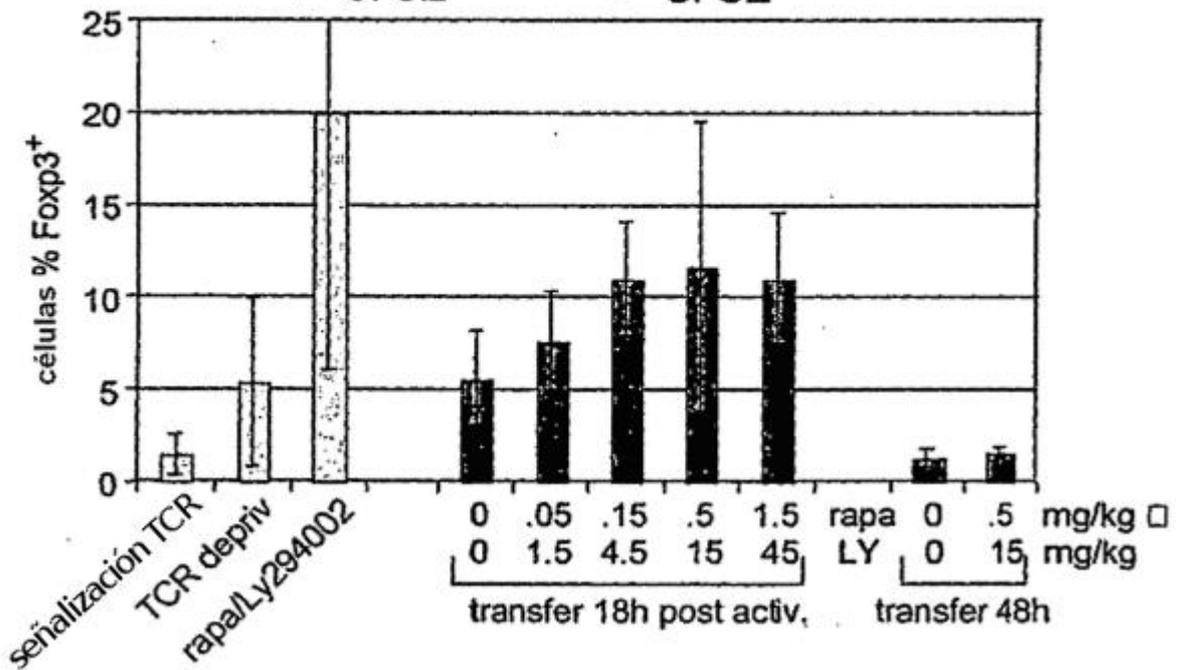


Figura 12

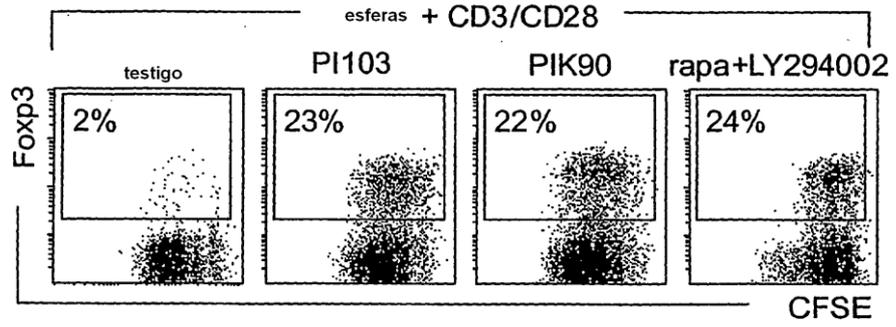


Figura 13

