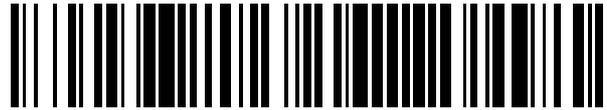


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 317**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**C12N 5/0781** (2010.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/US2013/028734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13131045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13754740 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2820125**

54 Título: **Expansión de linfocitos T reguladores reactivos a aloantígeno**

30 Prioridad:

**02.03.2012 US 201261606329 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.07.2018**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**TANG, QIZHI y  
BLUESTONE, JEFFREY, A.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 675 317 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

Expansión de linfocitos T reguladores reactivos a aloantígeno

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere en líneas generales a la fabricación de linfocitos T reguladores (Treg) para su uso en inmunoterapia. En particular, la presente divulgación se refiere a estrategias robustas para la expansión de Treg reactivos a aloantígeno *ex vivo*. Los Treg reactivos a aloantígeno producidos de esta manera son adecuados para inducción y/o mantenimiento de tolerancia inmunológica en receptores de trasplantes alogénicos.

**Antecedentes**

La mejora continua de los regímenes de inmunosupresión ha reducido sustancialmente la incidencia de rechazo agudo después de trasplante de un órgano sólido. Sin embargo, los resultados a largo plazo se han estancado parcialmente debido a la morbilidad y mortalidad asociadas con la inmunosupresión. La estrategia tradicional para la inmunosupresión ha enfatizado la supresión no específica de respuestas de linfocitos T.

El esclarecimiento más reciente de los linfocitos T reguladores (Treg) y su importancia en la regulación de las respuestas inmunitarias ha alentado la reconfiguración de los regímenes de inmunosupresión para favorecer el desarrollo y función de Treg con el objetivo final de inducir tolerancia del injerto (Waldmann et al., *J. Clin Immunol*, 28:716-725, 2008; Kang et al., *Am J Transplant*, 7:1457-1463, 2007; Walsh et al., *J Clin Invest*, 114:1398-1403, 2004; Yeung et al., *Transplant Proc*, 41:S21-26, 2009; Sanchez-Fueyo et al., *J Immunol*, 176:329-334, 2006; Sagoo et al., *Curr Opin Organ Transplant*, 13:645-653, 2008; y Long et al., *Transplantation*, 88:1050-1056, 2009). Múltiples modelos preclínicos han demostrado que la transferencia adoptiva de Treg puede mitigar el rechazo de injertos y, en combinación con regímenes de inmunosupresión de "apoyo Treg", puede inducir tolerancia a largo plazo (Kang et al., *Am J Transplant*, 7:1457-1463, 2007; Riley et al., *Immunity*, 30:656-665, 2009; Issa et al., *Expert Rev Clin Immunol*, 6:155-169, 2010; y Nadig et al., *Nat Med*, 16:809-813, 2010). Los regímenes de inmunosupresión de "apoyo Treg" ha incluido la reducción inicial de linfocitos T reactivos donadores. La globulina anti-timocito de conejo (rATG), un agente reductor de linfocitos T habitualmente usado en trasplante, parece reponer los Treg (Sewgobind et al., *Nephrol Dial Transplant*, 24:1635-1644, 2009), aumentando de ese modo la relación de Treg:linfocito T convencional (Tconv). Además, el sírolimus (SRL) suprime los linfocitos T efectores mientras impulsa el desarrollo de Treg (Demirkiran et al., *Transplantation*, 85:783-789, 2008; y Demirkiran et al., *Transplantation*, 87:1062-1068, 2009).

La mayoría de los protocolos normalmente expanden todos los Treg de forma no discriminatoria para producir células mencionadas como Treg policlonales (poliTreg). Sin embargo, los Treg específicos de aloantígeno (aloTreg) son más eficaces y más seguros que los Treg no específicos en entornos de trasplante porque proporcionan inmunosupresión específica en lugar de genérica (Golshayan et al., *Blood*, 109:827-835, 2007; y Raimondi et al., *J Immunol*, 184:624-636, 2010). En particular, los Treg reactivos de donador tienen el potencial de inducir tolerancia al órgano trasplantado sin impedir las respuestas inmunitarias convencionales. Por tanto, lo que se necesita en la técnica son métodos robustos para la expansión de aloTreg para su uso en promover la tolerancia de trasplantes y para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador.

También se citan:

Tang et al., *J Mol Cell Biol*, 4:11-21, 2011. Esta revisión se centra en el desarrollo de tratamiento para el trasplante usando Treg CD4+Foxp3+.

Documento WO 2010/129770. Esta divulgación describe métodos para expandir linfocitos T reguladores.

**Sumario**

La presente divulgación se refiere en líneas generales a la fabricación de linfocitos T reguladores (Treg) para su uso en inmunoterapia. En particular, la presente divulgación se refiere a estrategias robustas para la expansión de Treg reactivos a aloantígeno (aloTreg) *ex vivo*. Los aloTreg producidos de esta manera son adecuados para la inducción y/o mantenimiento de tolerancia inmunológica en receptores de trasplantes alogénicos.

La presente invención proporciona un método para la producción de linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador humanos, que comprende:

- a) cocultivar linfocitos B CD19+ de un donador humano con células de alimentación de leucemia humana CD40L+ irradiadas en condiciones eficaces para producir linfocitos B estimulados (sBc);
- b) cocultivar linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo de un destinatario humano con dichas sBc en condiciones eficaces para expandir de forma selectiva los linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador humanos; y
- c) restimular dichos Treg reactivos de donador por entrecruzamiento de CD3 y CD28 de dichos Treg reactivos de donador en condiciones eficaces para producir Treg reactivos de donador que son CD4+, Helios+ y Foxp3+;

en el que el donador es de HLA no coincidente en relación con el destinatario humano. La presente invención también proporciona composiciones que comprenden los Treg reactivos de donador restimulados producidos usando los métodos de la invención y medicamentos que comprenden  $10^7$  a  $10^{11}$  de los Treg reactivos de donador restimulados producidos usando los métodos de la invención para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de un aloinjerto de órgano sólido por el destinatario humano.

La presente divulgación proporciona métodos para la producción de linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador humanos, que comprenden: a) cocultivar linfocitos B CD19+ de un donador humano (primer sujeto humano) con células de alimentación de leucemia humana CD40L+ irradiadas en condiciones eficaces para producir linfocitos B estimulados (sBc); y b) cocultivar linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo de un destinatario humano (segundo sujeto humano) con las sBc en condiciones eficaces para expandir de forma selectiva linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador humanos. En algunas realizaciones, el donador humano no está relacionado con el destinatario humano. En algunas realizaciones, el donador humano es de HLA no coincidente en relación con el destinatario humano (por ejemplo, el donador es alogénico al destinatario o dicho de manera, el trasplante es un trasplante de órgano heterólogo). En algunas realizaciones, la falta de coincidencia de HLA comprende una falta de coincidencia en uno, dos, tres o cuatro de HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA- DR. Los métodos comprenden además la etapa c) restimular los Treg reactivos de donador por unión cruzada de CD3 y CD28 de los Treg reactivos de donador en condiciones eficaces para producir Treg reactivos de donador restimulados. Los Treg reactivos de donador son CD4+, Helios+ y Foxp3+. En algunas realizaciones, los Treg reactivos de donador son CD27+ y CD62L+. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además una etapa anterior a a) de asilar linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) crioconservadas obtenidas del destinatario humano. En algunas realizaciones, la etapa a) comprende cocultivar los linfocitos B y las células de alimentación en medio que comprende insulina, transferrina, interleucina-4 y ciclosporina A. en algunas realizaciones, las células de alimentación son células KCD40L. En algunas realizaciones, la etapa b) comprende cocultivar los sBc y los linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo en medio que comprende interleucina-2, después de haber irradiado los sBc. En algunas realizaciones, la etapa c) comienza 9-12 días después de que comience la etapa b). En algunas realizaciones preferidas, los aloTreg restimulados comprenden al menos 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1400 o 1600 veces más células que los linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo al inicio de la etapa b). También se proporcionan por la presente divulgación composiciones que comprenden un tampón fisiológicamente aceptable (por ejemplo, solución salina, PBS, etc.) y los Treg reactivos de donador restimulados producidos usando los métodos descritos anteriormente. También se describen métodos para tratar un receptor de trasplante de órgano, que comprende: administrar de  $10^7$  a  $10^{11}$  Treg reactivos de donador restimulados producidos usando los métodos descritos anteriormente a un destinatario humano de un trasplante de órgano heterólogo. También se proporcionan medicamentos para su uso en el tratamiento o la prevención del rechazo de un aloinjerto de órgano sólido por el destinatario humano, comprendiendo el medicamento: de  $10^7$  a  $10^{11}$  Treg reactivos de donador restimulados producidos usando los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el trasplante de órgano es un aloinjerto de órgano sólido seleccionado del grupo que consiste en aloinjerto cardíaco, pulmonar, cardíaco/pulmonar, renal, pancreático, renal/pancreático, de intestino y de hígado. En algunas realizaciones, el aloinjerto de órgano sólido es un aloinjerto de piel. En algunas realizaciones, los Treg reactivos de donador restimulados se administran en más de una ocasión (se administran repetidamente). En algunas realizaciones, los Treg reactivos de donador restimulados se administran en primer lugar después de que el destinatario haya recibido el trasplante de órgano heterólogo. En algunas realizaciones, los Treg reactivos de donador restimulados se administran antes y después de que el destinatario haya recibido el trasplante de órgano heterólogo. También se describen métodos que comprenden además someter al destinatario humano a un régimen inmunosupresor de apoyo Treg antes de la administración de los Treg reactivos de donador restimulados. El régimen de inmunosupresión de apoyo Treg puede comprender: administrar globulina anti-timocito de conejo al destinatario humano a una cantidad eficaz para conseguir la reducción de linfocitos. También se describen métodos que comprenden además administrar prednisona, micofenolato de mofetilo y tacrólimus al sujeto humano a dosis por debajo del tratamiento habitual. También se describen métodos que comprenden además administrar sirólimus al sujeto humano. En algunas realizaciones preferidas, la administración de los Treg reactivos de donador restimulados es eficaz para reducir la probabilidad de rechazo de trasplante agudo y/o crónico. En algunas realizaciones preferidas, la administración de los Treg reactivos de donador restimulados es eficaz para prolongar la supervivencia del aloinjerto de órgano sólido. En algunas realizaciones preferidas, la administración de los Treg reactivos de donador restimulados es eficaz para conseguir uno o más de los siguientes: aumento de los porcentajes de Treg sobre la medida inicial, aumento de la frecuencia de Treg reactivos de donador, aumento de la actividad de Treg reactivos de donador e inducción de perfiles de expresión génica de tolerancia en PBMC y/o tejido de trasplante.

Como se usa en este documento, la forma singular "uno", "una" y "el" "la" incluye referencias plurales salvo que se indique lo contrario.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona un diagrama de flujo de un proceso de fabricación de linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador ejemplar.

La figura 2 muestra la población CD4+CD25+CD127-/lo de células purificadas de PBMC del destinatario por FACS. La figura 2B muestra la magnitud de expansión de los Treg reactivos de donador que se puede conseguir con los métodos de la presente divulgación. La flecha indica el momento en que los Treg se exponen a estímulo policlonal (por ejemplo, microesferas conjugadas anti-CD3/CD28).

La figura 3A es un análisis citométrico de flujo de los Treg reactivos de donador expandidos y los linfocitos T convencionales reactivos de donador de control (Tconv). La figura 3B muestra el análisis de la región desmetilada específica de Treg (TSDR) de Treg reactivos de donador expandidos y Tconv y Treg policlonales (poliTreg) expandidos usando un estímulo policlonal (microesferas recubiertas anti-CD3/anti-CD28).

La figura 4A proporciona los resultados de un ensayo de especificidad de donador. Los Treg reactivos de donador se marcaron con CFSE y se restimularon como se indica. La figura 4B proporciona los resultados de un ensayo de supresión de reacción de linfocitos mixta (MLR). La cantidad valorada de Treg reactivos de donador y Treg expandidos de forma policlonal se mezcló con  $2,5 \times 10^4$  PBMC autólogas y  $1,25 \times 10^5$  PBMC donadoras irradiadas y se incubaron durante 6 días. Se añadió timidina tritiada durante al menos 16 horas. Se calculó la supresión de incorporación de timidina comparando los recuentos por minuto (CPM) en pocillos sin Treg.

La figura 5 muestra los resultados de un ensayo de frecuencia de linfocitos T reactivos de donador. Las PBMC del destinatario se marcaron con CFSE y se estimularon con sBc donadores durante 3,5 días. El cultivo se recogió, se tiñó para CD3, CD4, CD8, Foxp3 y Helios, y se analizó en un citómetro de flujo. Se usaron los perfiles CFSE de Tconv CD8, CD4+ y Treg para calcular las frecuencias de linfocitos T reactivos de donador en cada subconjunto.

La figura 6A y la figura 6B muestran PBMC y CD40L-sBc del mismo donador en comparación con su capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T alorreactivos en un MLR unidireccional. Las PBMC respondedoras se marcaron con CFSE antes de MLR y los cultivos se recogieron en el día 4 para el análisis citométrico de flujo. Se muestran los perfiles de dilución de CFSE representativos de linfocitos T CD4+ y CD8+ (figura 6A) y Treg CD4+FOXP3+HELIOS+ (figura 6B). Los datos son representativos de al menos 10 experimentos independientes. La figura 6C y la figura 6D muestran CD40L-sBc autólogos y CD40L-sBc alogénicos con diferente grado de falta de coincidencia de HLA con las células respondedoras en comparación con su capacidad de proliferación de la estimulación de Tconv CD4+, linfocitos T CD8+ y células Treg. Cada símbolo representa el mismo respondedor. Los resultados son un resumen de 15 combinaciones de estimulador y respondedor diferentes.

La figura 7A muestra la expansión de linfocitos B purificados en un cultivo de 10 días. La flecha indica el tiempo de restimulación. La figura 7B y la figura 7C muestran la expresión de HLA-DR, CD80 y CD86 en linfocitos B recién aislados y CD40L-sBc del día 10 comparados usando citometría de flujo. Se muestran histogramas superpuestos de muestra en la figura 7B y se muestran diagramas que resumen los resultados de experimentos independientes en la figura 7C. Los datos son un resumen de 6 experimentos independientes.

La figura 8A muestra sBc alogénicos usados para estimular Treg purificados por FACS en el día 0 y en el día 9. Se muestra la expansión factorial de Treg en el cultivo de 14 días en 6 experimentos independientes. La flecha indica el tiempo de restimulación. La figura 8B muestra alorreactividad de Treg expandidos determinados por marcaje de los Treg expandidos con CFSE antes de la restimulación con los mismos CD40L-sBc usados para la expansión (línea gruesa), microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28 (línea delgada) o CD40L-sBc singénicos (histograma sombreado). La figura 8C muestra Treg estimulados con CD40L-sBc durante 9 días y después se dividieron, con la mitad restimulados con CD40L-sBc del mismo donador y la otra mitad con microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28. Se muestra la expansión factorial en el día 14 de tres cultivos emparejados independientes ( $p=0,52$ , ensayo de la t bilateral para datos emparejados). La figura 8D y la figura 8E muestran los aspectos de cultivos de Treg en los días 9 (figura 8D) y 11 (figura 8E) después de estimulación primaria. Los datos representan los resultados de al menos 10 cultivos independientes. La figura 8F muestra los Treg estimulados con CD40L-sBc durante 9 u 11 días antes de la restimulación con microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28. Los cultivos se recogieron 5 días después de la restimulación y se comparó la expansión factorial total en 3 cultivos emparejados ( $p=0,0026$ , ensayo de la t bilateral para datos emparejados). La figura 8G muestra Treg estimulados con CD40L-sBc durante 11 días antes de la restimulación con microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28 de Invitrogen (símbolos abiertos) o Miltenyi Biotec (símbolos cerrados). Se muestran las expansiones celulares en el tiempo en 3 cultivos emparejados. Se usó ensayo de la t bilateral para datos emparejados para comparar la diferencia en la expansión factorial total en el día 16 ( $p=0,0258$ ).

La figura 9A y la figura 9B muestran los perfiles citométricos de flujo de cultivos de Treg no sincronizados (a) y sincronizados a CD4 (b). Los datos son representativos de al menos 14 experimentos independientes. La figura 9C muestra alorreactividad de Treg expandidos con estimulación con sBc alogénicos primarios y restimulación policlonal en el día 11 determinada como se describe en la figura 8B. Se muestra un ejemplo de histograma superpuesto. La figura 9D muestra un resumen de 7 cultivos independientes analizados como se describe en la figura 9C. Cada símbolo representa un cultivo de Treg independiente. La figura 9E muestra un resumen de supresión *in vitro* por Treg expandidos por dos rondas de estimulación con CD40L-sBc alogénicos (círculos rellenos, Alo-a, n=3), estimulación primaria con sBc alogénicos seguido por restimulación policlonal (círculos

vacíos, Alo-p, n=8) o dos rondas de estimulaciones policlonales (cuadrados vacíos, Poli, n=5). Los respondedores son PBMC del donador de Treg y los estimuladores son PBMC del donador de sBc. Los datos mostrados son la supresión media +/- ETM observada en 3 a 8 experimentos independientes. Se usó ANOVA bidireccional con ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para determinar la significación estadística de las diferencias. La supresión a relación 1:5 por diferentes grupos de Treg no es significativamente diferente. La supresión por poliTreg está significativamente disminuida en comparación con Treg Alo-a ( $p < 0,001$  a relación 1:25 y  $p < 0,01$  a relación 1:125) o cuando se comparan con Treg Alo-p ( $p < 0,0001$  a relación 1:25 y  $p < 0,001$  a relación 1:125). Los Treg Alo-a y Alo-p no son significativamente diferentes entre sí a todas las relaciones). La figura 9F muestra supresión por Treg expandidos por CD40L-sBc estimulados por PBMC del donador de sBc (círculos rellenos) o un tercer donador (triángulos vacíos). Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

La figura 10A, la figura 10B y la figura 10C muestran datos de ratones BALB/c. Rag2<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> trasplantados con piel humana y reconstituidos con PBMC alogénicas al donador de piel. Se analizaron micrografías de inmunofluorescencia por recuento de 4 a 6 campos visuales de alta energía por tinción para cada injerto. Entonces se compararon los resultados cuantitativos de cuatro grupos experimentales. Se usó ANOVA unidireccional con ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para determinar la significación estadística de las diferencias.

La figura 11A es un diagrama esquemático del modelo experimental y se muestra el procedimiento. La figura 11B muestra la re-constitución de PBMC determinada al final del experimento, que demuestra que la coinfusión de Treg no alteraba significativamente el grado de reconstitución de PBMC. La figura 11C muestra el peso corporal de los ratones BALB/c.Rag2<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> en cuatro grupos experimentales que se evaluaron para determinar el estado de salud general, lo que demuestra que la infusión de PBMC no inducía enfermedad de injerto contra hospedador.

La figura 12 es un diagrama esquemático de un proceso ejemplar de fabricación de Treg reactivas a aloantígeno.

### Descripción detallada

La presente divulgación se refiere en líneas generales a la fabricación de linfocitos T reguladores (Treg) para su uso en inmunoterapia. En particular, la presente divulgación se refiere a estrategias robustas para la expansión de Treg específicos de aloantígeno *ex vivo*. Los Treg específicos de aloantígeno producidos de esta manera son adecuados para la inducción y/o el mantenimiento de tolerancia inmunológica en destinatarios de trasplantes alogénicos.

La presente divulgación proporciona métodos para expandir selectivamente Treg reactivos de donador de 200 a 1 000 veces en menos de 20 días. Contrario al dogma de que las células dendríticas son más eficaces en expandir los linfocitos T, se descubrió que los linfocitos B humanos estimulados con ligando CD40 eran extremadamente potentes para inducir la proliferación de Treg. La figura 1 muestra el flujo de trabajo de la fabricación de Treg reactivos de donador. En resumen, el proceso empieza con la estimulación de linfocitos B donadores purificados con transfectantes K562-hCD40L certificados para un buen proceso de fabricación (GMP) irradiados de forma letal. Los linfocitos B donadores estimulados se irradiaron y se usaron para expandir selectivamente los Treg reactivos de donador a partir de Treg CD4+CD25+CD127lo aislados de sangre periférica del destinatario por clasificación celular activada por fluorescencia (figura 2A). En el día 9 a 12, los Treg que permanecían en el cultivo son casi todos reactivos de donador. Los Treg se restimulan con microesferas conjugadas anti-CD3 anti-CD28 para expandir adicionalmente las células durante 5 días adicionales. Este protocolo induce una robusta proliferación de Treg (figura 2B) y puede producir más de mil millones de Treg reactivos de donador a partir de una unidad de sangre. Los Treg expandidos son >95 % CD4+, >60 % Foxp3+, >90 % con promotor Foxp3 desmetilado, >90 % reactivos de donador y suprimen la proliferación de linfocitos T estimulados por donador cuando están presentes a una relación de 1:125 de Treg:PBMC respondedoras. Los Treg reactivos de donador (también mencionados en este documento como Treg específicos de aloantígeno o aloTreg) encuentran uso en métodos para promover la tolerancia de los trasplantes y para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador.

Una realización ejemplar implica el uso de Treg reactivos de donador en el contexto de un régimen de inmunosupresión de apoyo Treg como una estrategia para inducir tolerancia de un trasplante de hígado (Ltx). El tratamiento con Treg es útil para aumentar la probabilidad y/o acelerar el desarrollo de tolerancia. A causa de la frecuencia excepcionalmente alta de los Treg reactivos de donador, se necesita "reducción" del repertorio alorreactivo del hospedador e inmunosupresión adyuvante para crear un entorno más favorable para que los Treg controlen la aloinmunidad y para asegurar tolerancia al injerto a largo plazo (Wells et al., Nat Med, 5:1303-1307, 1999; Li et al., Curr Opin Immunol, 12:522-527, 2000; y Wells et al., Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 356:617-623, 2001). De forma importante, algunos fármacos de inmunosupresión favorecen el desarrollo de Treg y/o la supervivencia mientras que otros son neutros o antagonistas. Por tanto, en algunas realizaciones, la administración de Treg en entornos de trasplante de órganos se hace en combinación con la administración de regímenes de inmunosupresión de apoyo Treg.

Los hallazgos en la investigación de Treg en los últimos 15 años proporcionan un fundamento convincente para uso

terapéutico de Treg reactivos de donador en trasplante. La presente divulgación proporciona el primer ensayo clínico que implica la administración de Treg reactivos de donador a destinatarios de trasplante de órgano sólido. El desarrollo de un protocolo que cumpla la buena práctica de fabricación (GMP) para expandir de forma fiable Treg reactivos de donador humanos (ejemplo 1) ha hecho posible este esfuerzo. Adicionalmente, se desarrolla un conjunto de ensayos de control inmunitario para examinar las respuestas aloinmunitarias en pacientes de trasplante, que ha mejorado significativamente la sensibilidad y reproducibilidad en comparación con los ensayos descritos previamente.

## Ejemplos

La presente divulgación se describe en mayor detalle en los siguientes ejemplos que no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la divulgación reivindicada. Se entiende que las figuras adjuntas se consideran como partes integradas de la memoria descriptiva y la descripción de la divulgación. Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la divulgación reivindicada.

En la divulgación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: M (molar); mM (milimolar);  $\mu$ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu$ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos);  $\mu$ g (microgramos); pg (picogramos); l (litros); ml (mililitros);  $\mu$ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu$ m (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); V (voltios); PM (peso molecular); s (segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); °C (grados Celsius); ND (no realizado); NA (no aplicable); rpm (revoluciones por minuto); H<sub>2</sub>O (agua); aa (aminoácido); pb (par de bases); kb (kilo par de bases); kD (kilo dalton); ADNc (ADN copia o complementario); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNmc (ADN monocatenario); ADNbc (ADN bicatenario); dNTP (trifosfato de desoxirribonucleótido); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); qPCR (PCR cuantitativa); ARN (ácido ribonucleico); y RT-PCR (PCR con transcripción inversa). Abreviaturas adicionales incluyen: Ab (anticuerpo); alo (alógeno); CFSE (diacetato de carboxifluoresceína, éster de succinimidilo); FACS (clasificación celular activada por fluorescencia); GMP (buena práctica de fabricación); IHC (inmunohistoquímica); Ltx (trasplante de hígado); MELD (modelo para enfermedad hepática en fase final); MLR (reacción de linfocitos mixta); PBMC (células mononucleares de sangre periférica); poli (policlonal); rATG (globulina anti-timocito de conejo); sBc (linfocitos B estimulados); SOC (tratamiento habitual); SRL (sirólimus/rapamicina); tac (tacrólimus); Tconv (linfocitos T convencionales); Treg (linfocitos T reguladores); TSDR (región de desmetilación específica de Treg); Tx (trasplante); y UCSF (Universidad de California San Francisco).

## Ejemplo 1

### Producción de linfocitos T reguladores reactivos de donador

Este ejemplo proporciona un método ejemplar que cumple GMP para expandir de forma selectiva *ex vivo* hasta mil millones ( $10^9$ ) de Treg específicos de aloantígeno a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana en aproximadamente 2 semanas (véase la figura 1).

### Materiales y métodos

*Purificación y depósito de linfocitos T del destinatario.* Se purificaron PBMC de sangre completa o productos de leucocitaféresis de participantes usando centrifugación en densidad de ficoll. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en solución de crioconservación CS10 enfriada en hielo (BioLife Solutions) a 100-200 millones de células/ml/vial criogénico. Las células se congelaron en un congelador de velocidad controlada y se almacenaron en fase de vapor de nitrógeno líquido hasta su uso adicional.

*Purificación y depósito de linfocitos B del donador.* Se recogió el bazo o los ganglios linfáticos del donador de donadores cadavérico o PBMC de donadores vivos y se transportaron a la instalación GMP para su procesamiento en una suspensión de células individuales. Los linfocitos B se purificaron usando selección positiva de CD19 en un instrumento CliniMACS. Los linfocitos B CD19<sup>+</sup> purificados se depositaron por crioconservación hasta que se necesitaron para expansión de Treg.

*Preparación de células de alimentación.* Se transfectaron células de leucemia eritromieloblastoide humanas, K562 (ATCC N.º CCL-243), con un lentivirus para que expresaran CD40L, CD64 y HLA-DR0401 (K562-hCD40L o K40L) humano. Estas células no eran tumorigénicas en ratones inmunodeficientes. Las células de alimentación K40L se irradiaron con radiación  $\gamma$  a 100 Gy (10 000 rades) y se depositaron hasta su uso adicional.

*Activación de linfocitos B donadores depositados.* Se usó un protocolo modificado que cumple GMP (Zand et al., Am J Transplant, 5:76-86, 2005) para generar linfocitos B estimulados (sBc). Específicamente, se estimularon ~1-100 x  $10^6$  linfocitos B donadores purificados con microesferas anti-CD19 paramagnéticas en un CliniMACS (Miltenyi) con células K40L irradiadas con radiación  $\gamma$  y que cumplen GMP depositadas a una relación 1-2:1 (B:K40L) durante 7 días en un medio que contenía suero AB humano al 10 %, insulina, transferrina, IL-4 recombinante humana y ciclosporina A. En el día 7, el cultivo mezclado se volvió a estimular con células de alimentación K40L a una relación de 1-10:1 (B:K40L) durante 3 días. La expansión promedio fue de 10 a 20 veces. Los sBc se pasaron sobre ficoll para eliminar

las células muertas incluyendo las células K40L muertas. Se realizó un conjunto de ensayos de aseguramiento de la calidad sobre los sBc, que incluían un ensayo de reactivación de EBV basado en qPCR (Viracor) y citometría de flujo para determinar la pureza, así como expresión de HLA-DR, CD80 y CD86. Los sBc se irradiaron con radiación  $\gamma$  (10 Gy (1000 rades)) y se depositaron hasta su uso adicional.

*Expansión de Treg.* Se descongelaron PBMC del destinatario, se contaron y se tiñeron con anticuerpos conjugados de forma fluorescente de calidad clínica (Ab CD4-PerCP, Ab CD25-APC y Ab CD127-PE). Las células CD4+CD127lo/-CD25+ se purificaron de las PBMC teñidas por FACS (figura 2A). Los Treg purificados por FACS se mezclaron con sBc irradiados depositados a una relación de 4:1 de sBc:Treg en medio de crecimiento que comprendía medio Optimizer de calidad GMP (Invitrogen) que contenía complemento, GlutaMAX-1 CTS y suero AB humano al 2 %. En el día 2, se añadió IL-2 recombinante humana al cultivo a una concentración total de 300 UI/ml cuando se duplicó el volumen del medio. Los cultivos se alimentaron con medio fresco que contenía IL-2 en los días 5, 7 y 9 para mantener la concentración celular a  $2-3 \times 10^5$  células/ml. En el día 11 del cultivo, las células se volvieron a estimular con microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 a una relación de 1:1 para el resto del periodo de cultivo. Los cultivos se alimentaron en el día 1 y se recogieron en el día 16. Los Treg se expandieron de 200 a 1600 veces en el periodo de cultivo de 16 días.

Los Treg se resuspendieron en solución HypoThermosal y se mantuvieron a 4 °C mientras se esperaban los resultados de ensayos de liberación, la revisión de aseguramiento de la calidad y la aprobación. Tras la liberación del producto, los Treg se transportaron a la clínica para infusión. Se purificaron más de  $5 \times 10^6$  Treg de una unidad de sangre completa del destinatario. Con una estimación conservativa de expansión de 200 veces, se espera que se recojan al menos  $1 \times 10^9$  Treg reactivos de donador al final del periodo de expansión.

*Ensayos de liberación y criterios de liberación.* Los siguientes ensayos y criterios se usan antes de la liberación de Treg: viabilidad >99 %, citometría de flujo para CD4 >90 %, CD8 <5 %, CD19 <5 %, Foxp3 >60 % y TSDR >80 %. Ensayos microbianos negativos para bacterias, hongos, micoplasma y endotoxinas en el día de cultivo 12. El ensayo TSDR empleado es actualmente el ensayo más preciso y fiable para la pureza y la estabilidad de Treg. El ensayo de metilación confirma el porcentaje de células Foxp3+ determinadas por citometría de flujo. Adicionalmente, hay fuertes evidencias de que Foxp3 puede expresarse en linfocitos Tconv activados. Sin embargo, el locus Foxp3 TSDR está metilado en linfocitos Tconv activados mientras que está desmetilado en Treg genuinos.

*Ensayos posteriores a la liberación.* Se realizan los siguientes ensayos en cada producto para documentar completamente el fenotipo y la funcionalidad de las células: 1) análisis citométrico de flujo expandido usando dos paneles que consisten en CD4/Foxp3/CD27/CD62L y CD4/Foxp3/CD25/Helios; 2) ensayo de supresión específico de donador; 3) ensayo de especificidad de donador; 4) ensayo microbiano de 14 días a largo plazo; y 5) citocinas (IL-2, IFN-gamma e IL-17) inducidas por sBc donadores y PMA e ionomicina.

Las recientes evidencias experimentales sugieren que los Treg Foxp3+ son "plásticos" y pueden adquirir expresión de citocinas efectoras tales como IFN-gamma e IL-17 (Zhou et al., Curr Opin Immunol, 21:281-285, 2009; Zhou et al., Immunity, 30:646-655, 2009; y Hori et al., Curr Opin Immunol, 22:575-582, 2010). Es de ayuda distinguir dos tipos de destinos de los Treg versátiles, uno que provoca la pérdida de expresión de Foxp3 y la expresión concomitante de citocinas efectoras (exTreg) (Komatus et al., Proc Natl Acad Sci USA 106:1903-1908, 2009; Xu et al., J Immunol, 178:6725-6729, 2007; Osorio et al., Eur J Immunol, 38:3274-3281, 2008; Yang et al., Immunity, 29:44-56, 2008; y Zhou et al., Nat Immunol, 10:1000-1007, 2009) y el otro que da lugar a coexpresión de Foxp3 y citocinas efectoras (Treg efectores) (Tartar et al., J Immunol, 184:3377-3385, 2010; Beriou et al., Blood, 113:4240-4249, 2009; Radhakrishnan et al., J Immunol, 181:3137-3147, 2008; Oldenhove et al., Immunity, 31:772-786, 2009; Stroopinsky et al., Eur J Immunol, 39:2703-2715, 2009; Koch et al., Nat Immunol, 10:595-602, 2009; y Hvhannisyán et al., Gastroenterology, 140:957-965, 2011). Aunque los exTreg tienen baja o ninguna actividad supresora y pueden ser patógenos en entornos autoinmunitarios experimentales, es importante observar que se produce una producción de exTreg en hospedadores linforreducidos principalmente en condiciones experimentales extremas (Rubtsov et al., Science, 329:1667-1671, 2010). Además, en todas las condiciones, la mayoría de los exTreg no expresan citocinas efectoras incluso después de estimulación *in vitro* suprafisiológica con PMA e ionomicina. Los Treg reactivos de donador producidos usando el protocolo ejemplar tienen altos niveles de expresión de Foxp3, TSDR y Helios. Estas células se infunden en pacientes en inmunosupresión de apoyo Treg, por lo tanto, la probabilidad de que los Treg reactivos de donador infundidos se conviertan en efectores patógenos plenamente desarrollados *in vivo* es baja. En contraste con los exTreg, los Treg efectores han demostrado ser supresores en muchas condiciones experimentales. En particular, la producción de IFN-gamma por Treg ha demostrado ser esencial para su función supresora y protección contra el rechazo de aloinjertos (Sawitzki et al., J Exp Med, 201:1925-1935, 2005). Por tanto, se espera que la producción de citocinas efectoras por Treg Foxp3+ sea tolerógena en lugar de patógena. La infusión de Treg reactivos de donador que tienen alta expresión de Foxp3 estable basada en el ensayo TSDR en pacientes que experimentan inmunosupresión de apoyo Treg se espera que evite la conversión potencial de los Treg reactivos de donador en exTreg patógenos.

## Resultados

Expansión de Treg reactivos de donador. Los métodos descritos anteriormente usando linfocitos B donadores

estimulados con CD40L (sBc) como células presentadoras de antígeno (APC) son adecuados para la expansión selectiva de linfocitos T reguladores reactivos de donador partiendo de Treg CD4+CD127<sup>lo/-</sup>CD25+ purificados por FACS de PBMC del destinatario. El ensayo exhaustivo demostró que casi todas células vivas que permanecen en el cultivo de 8 a 10 días después de la estimulación son reactivas de donador. Las células entonces se expandieron adicionalmente por restimulación policlonal usando microesferas conjugadas anti-CD3 y anti-CD28. Los Treg se purificaron de PBMC usando FACS basado en el fenotipo de superficie celular CD4+CD127<sup>lo/-</sup>CD25+ como se describe previamente (Putman et al., Diabetes, 58:652-662, 2009). Los linfocitos B donadores se purificaron usando microesferas CliniMACS anti-CD19 (Miltenyi) y se estimularon con células K562 que cumplen GMP irradiadas que expresan CD40L humano. Las células K540L muertas se eliminaron de los sBc por centrifugación en gradiente de densidad de ficoll y los sBc purificados se irradiaron antes de añadirlos a los Treg purificados. Usando este protocolo, se consiguió una expansión de hasta 1600 veces de Treg. Dado que <10 % de los Treg son reactivos a un donador completamente no coincidente de HLA, una expansión global de 1600 veces se traduce en un aumento de > 16 000 veces en los Treg reactivos de donador en el periodo de cultivo de 16 días.

Se estableció una serie de protocolos para evaluar el fenotipo y las capacidades funcionales de los Treg reactivos de donadores reactivos. Los cultivos de Treg expandidos eran CD3+CD4+CD8-CD19-, Foxp3+, Helios+, CD27+ y CD62Lhi en comparación con linfocitos Tconv expandidos de forma similar (figura 2B). Casi todos los Treg expandidos por sBc donadores respondieron a restimulación con los sBc donadores, pero no a los sBc singénicos, lo que indica que son reactivos de estimulador (figura 4A). Los Treg expandidos por sBc donadores mostraron actividad supresora específica de donador potenciada en comparación con Treg expandidos de forma policlonal (figura 4B). Una cuestión importante es si los Treg reactivos de donador eran Treg estables o linfocitos T efectores que pudieran tener Foxp3 regulado de forma transitoria. La desmetilación del promotor de Foxp3 ha demostrado ser un fuerte marcador para Treg que expresa Foxp3 estable (Wang et al., Eur J Immunol, 37:129-138, 2007; y McClymont et al., J Immunol, 186:3918-3926, 2010). Más de un 94 % de los Treg reactivos de donador y menos de un 1 % de dsTconv, tienen promotor de Foxp3 desmetilado (figura 3B) determinado por un ensayo de región de desmetilación específica de Treg (TSDR) cuantitativo (Wieczorek et al., Cancer Res, 69:599-608, 2009). En conjunto, estos resultados demuestran que el protocolo ejemplar expande de forma viable los Treg reactivos de donador de calidad GMP. Los resultados del ensayo de liberación de una expansión típica se muestran en la figura 5.

## Ejemplo 2

### Trasplante de hígado usando Treg reactivos de donador e inmunosupresión de apoyo Treg

Este ejemplo describe un ensayo clínico de aumento de dosis para evaluar la seguridad de tratamiento con Treg reactivos de donador autólogos en destinatarios de trasplante de hígado (Ltx). Sin embargo, los métodos y composiciones de la presente divulgación no se limitan a este contexto. De hecho, se espera que los métodos y composiciones de la presente divulgación encuentren uso en el contexto de otros aloinjertos de órganos sólidos, así como en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador. Se espera que los Treg reactivos de donador y la inmunosupresión de apoyo Treg sean adecuados para inducir o mantener la tolerancia de aloinjertos seleccionados de, aunque sin limitación, aloinjertos cardiacos, pulmonares, cardiacos/pulmonares, renales, pancreáticos, renales/pancreáticos, intestinales y hepáticos.

Se administran dosis en aumento de Treg expandidos *ex vivo* usando linfocitos B donadores activados a destinatarios de Ltx junto con un régimen de inmunosupresión modificado diseñado para favorecer el desarrollo, persistencia y función de Treg. Este régimen está compuesto de inducción de globulina anti-timocito de conejo (rATG), dosificación reducida de corticoesteroides (Pred), micofenolato de mofetilo (MMF) y tacrólimus (tac), seguido por la introducción retardada de sirólimus (SRL). Se hace un seguimiento de los sujetos durante un año después del trasplante, durante el que se recogen datos clínicos junto con muestras de sangre periférica (PBMC y suero) y biopsia hepática y se analizan.

*Objetivos principales.* Se evalúan los siguientes resultados para destinatarios de Ltx *de novo* adultos: tasa de rechazo agudo de un año ("Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document," Hepatology, 25:658-663, 1997); tasa de rechazo crónico de un año ("Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction," Hepatology, 44:489-501, 2006); tasa de infección > grado tres meses después de infusión de Treg; tasa de complicaciones de herida > grado 3; tasa de anemia > grado 3, neutropenia, y/o trombocitopenia.

*Objetivos secundarios.* También se evalúan los siguientes resultados: aumento de los porcentajes de Treg sobre la medida inicial; aumento de la frecuencia de Treg reactivos de donador; aumento de la actividad de Treg reactivos de donador; y detección de perfiles de expresión génica de tolerancia en PBMC y/o tejido hepático.

*Población de pacientes y criterios de inclusión/exclusión.* El ensayo clínico abarca tres fases con criterios específicos de inclusión/exclusión en cada fase para maximizar la seguridad de los participantes.

*Fase Pre y Ltx.* Los pacientes se seleccionan de la lista de espera de Ltx que tienen enfermedad hepática en fase final, entre las edades de 20-70 años y tienen un valor MELD calculado de no más de 25 (Kamath et al., Hepatology,

33:464-470, 2001). El ensayo excluye específicamente destinatarios de Ltx con riesgo aumentado de rechazo agudo y enfermedad recidivante y limita la gravedad de la enfermedad hepática y la hipertensión portal y/o hiperesplenismo. En alguna realización, se seleccionan únicamente pacientes con Treg presentes en PBMC a más de 10/ $\mu$ l.

Los pacientes elegibles experimentan leucocitaféresis para aislar las PBMC, que se crioconservan para la posterior purificación y expansión de Treg. En el momento de tx y después de la verificación de la elegibilidad en curso del participante, se recoge el bazo y/o los ganglios linfáticos del donador junto con tejido de biopsia hepática y se depositan.

*Fase de inmunosupresión de apoyo Treg.* Los destinatarios de Ltx deben estar fuera del UCI e iniciar la inducción con rATG no después del día 3 tras tx. Reciben una dosis total de 3-4,5 mg/kg de con rATG para conseguir la reducción de linfocitos, definida como un recuento de CD3 < 50/mm<sup>3</sup>. Este intervalo de dosis se eligió para conseguir la reducción adecuada (Wong et al., Transpl Int, 19:629-635, 2006) minimizando al mismo tiempo la inmunosupresión. La cronología y la configuración de la administración de rATG se eligieron para evitar el potencial de sobreinmunosupresión y/o síndrome de liberación de citocinas/toxicidades sanguíneas en destinatarios medicamente inestables. Los pacientes se evalúan para su elegibilidad para cambiarlos a inmunosupresión basada en sirólimus (SRL) y deben tener una función normal del aloinjerto, así como una función renal, parámetros sanguíneos, curación de heridas y permeabilidad de la arteria hepática adecuados en las 4-6 semanas después de Ltx.

El régimen de inmunosupresión para los sujetos del estudio se diseñó específicamente para fomentar el desarrollo de Treg optimizando al mismo tiempo la seguridad de los participantes. Los participantes en el estudio empiezan con inmunosupresión de tratamiento habitual (SOC) con la mitad de la dosis de corticoesteroides y la mitad de la dosis de micofenolato de mofetilo (MMF). Se inicia el tratamiento con tacrólimus (Tac), que aborda los niveles reducidos de 6-8  $\mu$ g/l en comparación con SOC (10-15  $\mu$ l). No después del día 3 tras tx, los pacientes reciben un ciclo de rATG (3,0-4,5 mg/kg de dosis total) para reducir los linfocitos (recuento de CD3 <50/mm<sup>3</sup> o cuando se ha administrado la dosis máxima). Los participantes que están sin corticoesteroides se cambian a inmunosupresión basada en SRL entre las 4-6 semanas después de tx con inicio de SRL para abordar los niveles de 6-8  $\mu$ g/l y la reducción de tag hasta niveles de 3-5  $\mu$ g/l. Se interrumpe el MMF. Cuatro semanas después del cambio a IS basada en SRL (8-10 semanas después de tx), los participantes experimentan la evaluación final, incluyendo biopsia del aloinjerto para asegurar la elegibilidad para recibir infusión de Treg. Seis meses después de tx, se reduce adicionalmente SRL para abordar los niveles de 4-6  $\mu$ g/l.

**Tabla 2-1. Plan de inmunosupresión (IS) para pacientes con trasplante de hígado**

Día o semana	LTx con hospitalización para trasplante/IS de apoyo Treg				Cambio a sirólimus con seguimiento ambulatorio	
	D0	D3	D5	D/C	Sem5-10	Sem11-12
Pred (mg/d)	500	→	→	20	0	0
MMF (mg/d)	1000	→	→	1000	→→→ 0	0
Tac ( $\mu$ g/L)	0	6-8	6-8	6-8	→ 3 - 5	3 - 5
rATG (mg/kg)	0	3,0 - 4,5	3,0 - 4,5	3,0 - 4,5	0	0
SRL ( $\mu$ g/L)	0	0	0	0	→ 6 - 8	6 - 8
dsTreg	0	0	0	0	0	Infusión

*Fase de infusión de Treg:* aproximadamente 10-12 semanas después de Ltx, se evalúa a los participantes para su idoneidad para recibir Treg reactivos de donador. Los datos respecto a la cinética de la recuperación de linfocitos T después de rATG muestran números de linfocitos T estables entre las 4-12 semanas después de tx. Por lo tanto, la infusión de Treg a las 10-11 semanas después de tx es en el entorno de un sistema inmunitario reducido. Los participantes deben tener una función normal del aloinjerto en el contexto de inmunosupresión basada en SRL estable.

En paralelo con la conversión de inmunosupresión, se expanden linfocitos B donadores durante 10 días y después se usan para expandir los Treg durante 16 días adicionales (ejemplo 1). Los Treg reactivos de donador expandidos que pasan todos los criterios de liberación están disponibles para infusión entre las 10-11 semanas después de tx.

Después de la infusión de Treg, se recoge sangre en los días 1, 3, 7 y 28 para estudios mecanicistas. Las evaluaciones de laboratorio clínico continúan semanalmente durante 4 semanas adicionales. Si los ensayos de hígado permaneces estables, las evaluaciones de laboratorio clínico se retornan al SOC para el resto del estudio. Se extrae sangre adicional a un 1 después de Ltx para estudios mecanicistas y se realiza una biopsia hepática por protocolo adicional 1 año después de Ltx para análisis histológicos e inmunohistoquímicos detallados.

*Plan de aumento de dosis:* los pacientes elegibles no reciben infusión de Treg o reciben una única infusión de Treg reactivos de donador a tres niveles de dosis: 50, 200 y 800 millones. La progresión de un grupo al siguiente se basa en la aparición de toxicidad limitante de la dosis.

**Tabla 2-2. Comparación con el tratamiento habitual actual**

Semana	rATG + SRL				Tratamiento habitual			
	Sem1	Sem5	Sem13	Sem24	Sem1	Sem5	Sem13	Sem24
Pred (mg/d)	500 → 20	0	0	0	1000 → 20	7,5	5,0	5,0
MMF (mg/d)	1000	1000 → 0	0	0	2000-3000	2000	1500	1000
Tac (µg/l)	6-8	6 - 8 → 3 - 5	3 - 5	3 - 5	10 - 12	10 - 12	8 - 10	6 - 8
rATG (mg/kg)	3,0 - 4,5	0	0	0	0	0	0	0
SRL (µg/l)	0	0 → 6 - 8	6 - 8	4 - 6	0	0	0	0

**Ejemplo 3**

**5 Análisis inmunológico**

Este ejemplo describe análisis que se hacen sobre sangre periférica y tejidos hepáticos para evaluar los efectos de inmunosupresión de apoyo Treg y tratamiento con Treg sobre respuestas aloinmunitarias. Se espera que el tratamiento con Treg reactivos de donador junto con inmunosupresión de apoyo Treg tenga un impacto medible sobre la frecuencia de sensibilidad de Treg reactivos de donador y linfocitos T anti-donador. Adicionalmente, se espera que el régimen terapéutico ejemplar descrito en el ejemplo 2 de lugar a un desarrollo anterior de una característica distintiva de tolerancia inmunitaria que lo que se produce con regímenes de inmunosupresión convencionales (SOC). los análisis incluyen uno o más de los siguientes: 1) análisis funcional y fenotípico de linfocitos T; 2) característica distintiva de expresión génica de tolerancia en PBMC y muestras de biopsia por protocolo; y 3) análisis histológicos de muestras de biopsia por causa, así como por protocolo.

*Análisis de fenotipo y función de linfocitos T.* se usa citometría de flujo de múltiples parámetros (MFC) para realizar el perfil de subpoblaciones de leucocitos, determinar las frecuencias de linfocitos T reactivos de donador, evaluar la supresión específica de donador por Treg y realizar el perfil de la expresión de genes y citocinas inducidos por antígeno de donador. En conjunto, estos análisis permiten la evaluación de la contribución de cuatro mecanismos conocidos de tolerancia inmunitaria - eliminación, desviación, anergia/desgaste y regulación.

*Frecuencia de linfocitos T reactivos de donador.* Este ensayo se usa para determinar la frecuencia de linfocitos Tconv CD4+ reactivos de donador, linfocitos T CD8+ y Treg. Las muestras de PBMC depositadas se comparan a partir de pretrasplante/trasplante, preTreg/posconversión de SRL, en los días 1, 3, 7 y 28 después de la infusión de Treg, y un año después del trasplante. Se espera un aumento en los Treg reactivos de donador después de la infusión, especialmente en las cohortes que reciben 200-800 x 10<sup>6</sup> dsReg.

*Ensayo de supresión in vitro.* Este ensayo se usa para evaluar la supresión por Treg aislados de pretrasplante, preinfusión de Treg/posconversión de SRL, en los días 1 y 28 después de la infusión de Treg, y un año después del trasplante de hígado en momentos específicos. Se usan PBMC sometidas a leucocitaféresis antes del trasplante como respondedores mezcladas con Treg aisladas de diversos momentos específicos. Los cultivos se estimulan con PBMC donadoras irradiadas para evaluar la supresión específica de donador o con anti-CD3 y anti-CD28 para evaluar la supresión no específica.

*Citometría de flujo de múltiples parámetros (MFC).* Se usa MFC para determinar el porcentaje de subconjuntos de leucocitos en sangre periférica usando paneles de anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio. Las muestras recogidas de los paneles y de los marcadores se resumen en la tabla 3-1.

**Tabla 3-1. Paneles y marcadores de citometría de flujo de múltiples parámetros.**

Panel	N.º de células	Marcadores							
Subconjuntos de leucocitos	0,25 m	CD45	CD14	CD3	CD19	CD56	CD16	CD4	CD8
Linfocitos T efectores/de memoria/virgenes	0,5 m	CD3	CD4	CD8	CD45RA	CD27	CD28	CD38	HLA-DR
Treg	1 m	CD3	CD4	CD25	CD127	Foxp3	Helios		
Citotoxicidad	1 m	CD3	CD19	CD4	CD8	CD56	CD16	Perforina	GzB
TCR	1 m	CD3	TCRab	CD19	Vd1	Vd2			
Linfocitos B	0,5 m	CD3	CD19	CD20	CD27	CD38			

*Ensayo de activación/diferenciación de linfocitos T.* Se estimulan linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ de pretrasplante, preTreg/posconversión de SRL, en los días 1, 3, 7 y 28 después de la infusión de Treg y un año después del trasplante usando sBc donadores durante 3,5 días. La muestra recogida en los momentos específicos pretrasplante, preTreg/posconversión de SRL los días 1, 3, 7, y 28 después de la infusión de Treg se analiza para la expresión génica de citocinas usando matrices de qPCR y secreción de citocinas en el sobrenadante usando un ensayo Luminex de 42 muestras. Las muestras recogidas en pretrasplante y un año después del trasplante se usan para analizar los perfiles de expresión génica usando micromatriz génica y la citocina en el sobrenadante se analiza usando un ensayo Luminex de 42 muestras. Usando ensayos de qPCR, se espera que se observen cambios en la

expresión génica estimulada por sBc donadores en pacientes con trasplante de hígado. Este ensayo permite determinar alternancias en los perfiles de expresión génica estimulada por antígeno de donador.

5 *Análisis de expresión génica.* Se analizan muestras de sangre periférica usando micromatrices con un subconjunto estrecho previamente identificado de genes que representan los biomarcadores más prometedores actualmente disponibles para detectar tolerancia funcional después del trasplante de hígado (Martínez-Llordella et al., J Clin Invest, 118:2845-2867, 2008).

10 *Análisis histológico e inmunohistoquímica combinada (mIHC).* Se realiza histología extensiva y análisis de mIHC de muestras de biopsia según protocolo obtenidas pretrasplante y un año después del trasplante de hígado. Los análisis histológicos evalúan 40 características histopatológicas para determinar la integridad del tejido y el grado de inflamación como se muestra en la tabla 3-2.

**Tabla 3-2. Marcadores de inmunohistoquímica combinada**

Panel de mIHC	Fundamento
C4d/CD31	La disminución en los depósitos de C4d en la microvasculatura hepática se asocia con tolerancia a Ltx. Se determina si el tratamiento con Treg da lugar a disminución en los depósitos de C4d
003/ $\gamma\sigma$ -1/ $\gamma\sigma$ -2	La relación del sistema portal de $\gamma\sigma$ -1/ $\gamma\sigma$ -2 > 1,0 está asociada con tolerancia operativa. Se determina si el tratamiento con Treg remueve esta característica distintiva
CD3/CD45RO /CD45RA	Se controla la relación relativa de linfocitos T vírgenes a memoria; se ensaya si el tratamiento con Treg da lugar a una reducción en los linfocitos T CD3+/CD45RO+ (de memoria) basados en el sistema portal
CD4/Tbet/GATA-3/IL-17/FoxP3	Se controla la polarización de linfocitos CD4+ dentro del aloinjerto para determinar si un aumento de supuestos linfocitos T reguladores contribuye a la tolerancia.
IL10/TGF $\beta$ /HLADR	Se controla la expresión de citocinas inmunomoduladoras por células que expresan HLA-DR en el hígado, tal como células de Kupffer y linfocitos B.
CK19/CD31 /HLADR	La regulación por aumento de HLA-DR sobre el epitelio biliar (CK19+) y el endotelio vascular (CD31+) hace que estas células sean dianas de rechazo inmunitario. Se determina si el tratamiento con Treg evita la inducción de DR.

15 **Ejemplo 4**

**Fabricación de calidad clínica y ventaja terapéutica de linfocitos T reguladores humanos reactivos a aloantígeno en trasplante**

20 Este ejemplo demuestra un proceso de fabricación que puede generar miles de millones de linfocitos T reguladores (Treg) reactivos a aloantígeno humanos en cultivos a corto plazo usando reactivos que cumplen GMP. El proceso usa linfocitos B alogénicos activados por CD40L para expandir de forma selectiva Treg reactivos a aloantígeno seguido por restimulación policlonal para aumentar el rendimiento. Los Treg expandidos de 200 hasta 1600 veces, eran altamente reactivos a aloantígeno, y expresaban el fenotipo de Treg estables. Los Treg expandidos por aloantígeno eran de 5 a 25 veces más potentes que los Treg expandidos de forma policlonal *in vitro* y eran más eficaces en controlar las lesiones del aloinjerto *in vivo* en un modelo de ratón humanizado de trasplante de piel.

30 **Materiales y métodos**

*Fuentes de células.* Se reclutaron donadores normales y dieron su consentimiento para donación de sangre completa. Cuando se requirieron grandes cantidades de células, se obtuvieron productos de aféresis no identificados de donadores normales del UCSF Blood Center. Las PBMC se aislaron usando un gradiente de densidad de ficoll Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Pittsburgh, PA) y se usaron recientes o después de crioconservación en medio de congelación CryoStor CS10 (BioLife Solutions, Bothell, WA) usando dispositivos CoolCell™@ (BioCision, Mill Valley, CA). Se obtuvieron bazo de donadores de órganos cadavéricos con el consentimiento de investigación. Todos los procedimientos se aprobaron por el comité sobre investigación humana de la University of California San Francisco y el hospital Guy del King's College Londres.

40 *Generación de células de alimentación que expresan CD40L.* Se produjeron vectores lentivíricos que codifican CD40L (NM\_000074), CD64 (BC032634), DRA (BC071659) y DRB 040133 como se describe previamente<sup>34</sup>. Estos vectores se usaron para transducir células K562 para generar una línea celular KT64-CD40L.HLADR0401 y se usó FACS para generar clones de células individuales como se describe previamente<sup>35</sup>. Se verificó la expresión estable de los clones expandidos por citometría de flujo usando anticuerpos contra CD40L, HLA-DR y CD64 de BD Biosciences, San José, CA.

*Generación de CD40L-sBc.* Los linfocitos B se enriquecieron de PBMC o bazo usando el kit de enriquecimiento de linfocitos B humanos intactos (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los linfocitos B enriquecidos se cultivaron con células 3T3 o K562 irradiadas (40Gy) que expresan CD40L humano como describe anteriormente<sup>36</sup>. Para algunos experimentos,

se cultivaron esplenocitos disociados con células que expresan CD40L sin enriquecimiento previo de linfocitos B. los CD40L-sBc se irradiaron (30Gy) y se usaron para estimular los Treg o se crioconservaron en medio de congelación CryoStor CS10 hasta su uso. Para las expansiones que cumplen GMP, se purificaron linfocitos B de sangre periférica usando selección positiva para CD19 en un CliniMACS (Miltenyi Biotech, Alemania), se estimularon con células K-CD40L irradiadas (100Gy) en medio X-VIV015 que contiene transferrina (Lonza, Walkersville, MD) complementado con suero AB humano al 10 % (Valley Biomedical, Winchester, PA), IL-4 de calidad GMP (Miltenyi), y Ciclosporina A (Teva Pharmaceuticals, North Wales, PA).

*MLR.* Las PBMC respondedoras marcadas con CFSE (Invitrogen) 1,25  $\mu$ M se estimularon con CD40L-sBc alogénicos (dos sBc por PBMC) o con PBMC alogénicas irradiadas (5 estimuladores por respondedor). Los cultivos se recogieron después de 84 a 96 horas, se tiñeron con anti-CD3 PerCP (BD), anti-CD4 PE-Cy7 (BD), anti-CD8 APC-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA), tinte de viabilidad fijable efluor 506 (eBioscience, San Diego, CA). Las células entonces se fijaron y permeabilizaron usando un conjunto de tampón de fijación/permeabilización FOXP3 (eBioscience) antes de tinción con anti-FOXP3-Alexa Fluor 647 (eBioscience) y anti-HELIOS PE (BioLegend). Se realizó citometría de flujo sobre Fortessa (BD) y se hizo el análisis usando el programa informático FACSdiva (BD) o FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

*Expansión de Treg.* Los Treg se aislaron usando BD FACSAria II (BD) basándose en el fenotipo de superficie celular de CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>/CD25<sup>+</sup> y se realizaron expansiones policlonales de Treg como se describe previamente<sup>28</sup>. La clasificación de cumplimiento clínico utilizó GMPc mAb generados y proporcionados amablemente por Noel Warner (BD). Para las expansiones de Treg reactivos a aloantígeno, los cultivos se mantuvieron en medio de expansión de linfocitos T OpTmizer (Invitrogen) complementado con GlutaMAX (Invitrogen) al 1 %, penicilina/estreptomina y suero AB humano al 2 % o medio X-VIVO15 complementado con suero AB humano al 10 %. Los Treg purificados por FACS se mezclaron con CD40L-sBc a una relación 4:1 de sBc a Treg. Los cultivos se mantuvieron con medio que contenía 300 UI/ml de IL-2 humana hasta el día 9 o 11, cuando las células se restimularon con nuevos sBc irradiados a una relación de 4 sBc por Treg o con microesferas recubiertas anti-CD3/anti-CD28 a una relación 1:1 de microesfera a célula. Los cultivos se suministraron 3 días después y se recogieron en día 5 después de la restimulación.

*Citometría de flujo.* Se evaluó el fenotipo de los Treg expandidos usando tres paneles citométricos de flujo. El primer panel consistía en anti-CD8 FITC, anti-CD4 PerCP, anti-CD3 PE y anti-CD19APC. El segundo panel consistía en anti-CD4 PerCP, anti-CD62L PE, anti-CD27 APC y anti-FOXP3 Alexa Fluor 488 (BioLegend, Clon 206D). el tercer panel consistía en anti-CD4 PerCP, anti-CD25 APC, anti-HELIOS PE (BioLegend) y anti-FOXP3 Alexa Fluor 488. Se usaron IgG1 de ratón Alex Fluor 488 e IgG1 de ratón PE (BioLegend) para controlar la tinción de FOXP3 y HELIOS, respectivamente. Las células teñidas se analizaron en un FACSCalibur y los datos se analizaron usando FlowJo. Los CD40L-sBc se analizaron en un citómetro de flujo AccuriC6 (BD) después de tinción con anti-HLA-DR PE, anti-CD80 FITC, anti-CD86 PerCP-Cy5.5 y anti-CD19 APC. Los datos se analizaron usando el programa informático Cflow PLUS (BD). Los anticuerpos eran de BD Biosciences salvo que se indique lo contrario.

*Ensayo de especificidad de Treg.* Los Treg expandidos se marcaron con CFSE 1,25  $\mu$ M y se estimularon con CD40L-sBc alogénicos o autólogos, microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28 o se dejaron sin estimular en medio que contenía 30 UI/ml de IL-2. Después de 72 horas, las células se recogieron y se tiñeron con anti-CD4 APC (BD) y yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo AccuriC6.

*Ensayos de supresión in vitro.* Las cantidades valoradas de Treg expandidos se mezclaron con  $3 \times 10^4$  PBMC del donador de Treg en placas de 96 pocillos de fondo en V por triplicado. Las células se estimularon con PBMC irradiadas del donador de sBc durante 7 días y se usó la incorporación de  $3[H]$  timidina durante las 16-20 horas finales de cultivo para medir la proliferación. Los cultivos que no contenían Treg expandidos se usaron como controles. Se calculó el porcentaje de supresión como:  $[1 - (\text{media de cpm de PBMC con Treg}/\text{media de cpm de PBMC sin Treg})] \times 100$ .

*Ensayo de metilación de TSDR.* Se asiló el ADN genómico de  $0,5 \times 10^6$  Treg expandidos usando reactivos permitidos de Epiontis GmbH (Berlín, Alemania) de acuerdo con el protocolo establecido por Epiontis GmbH<sup>37</sup>. El ensayo se realizó por triplicado y se calcularon los porcentajes de TSDR metilado como:  $[\text{media de los números de copia de ADN no metilado}/(\text{media de números de copia de ADN no metilado} + \text{media de números de copia de ADN metilado})] \times 100$ . Para cultivos expandidos usando mujeres donadoras, los porcentajes del cálculo anterior se multiplicaron por 2 para corregir la inactivación del cromosoma X.

*Evaluación in vivo de la función de Treg en modelo de ratón humanizado de trasplante de piel.* Se criaron ratones BALB/c.Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> (Charles River) y se mantuvieron en la Biological Services Unit del King's College Londres en condiciones sin patógenos específicos. Se obtuvo piel humana sin identificar de pacientes que habían experimentado abdominoplastia rutinaria y mamoplastia de reducción con el consentimiento informado y la aprobación ética. La piel se trasplantó en ratones BALB/c.Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> de 8-12 semanas de edad y se dejó que injertara durante 6 semanas antes de la inyección de  $10 \times 10^6$  PBMC humanas de CD25 reducida con HLA no coincidente. A algunos ratones se les coinyectó  $2 \times 10^6$  Treg policlonales o reactivos a aloantígeno expandidos ex vivo. Se realizaron inspecciones visuales y táctiles de los injertos dos veces a la semana. El análisis histológico de

los injertos se realizó seis semanas después de las inyecciones de PBMC. En la duración total de estos experimentos, se inyectaron 100 µg de mAb purificado anti-Gr1 de ratón (Bio X Cell, West Lebanon, NH) por vía intraperitoneal cada 4-5 días para reducir los granulocitos de ratón. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales y la Home Office Animals Scientific Procedures Act (1986). Se fijaron secciones congeladas (de 6 a 8 µm) de injertos de piel humana con paraformaldehído al 5 % y se tiñeron con anticuerpos contra los antígenos humanos ki67 (clon 4A1, Abcam, Cambridge, MA), CD45 (clon HI30, eBioscience), CD3 (A0452, Dako, Dinamarca), FOXP3 (clon 259D/C7, eBioscience), involucrina (clon SY5, Sigma) y CD31 (ab28364, Abcam), seguido por incubación con anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo y se montaron con reactivo Prolong Gold Anti-fade con 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen). Las muestras se sometieron a análisis cuantitativo usando microscopia de fluorescencia contando de cuatro a seis campos visuales no solapantes. Las lecturas individuales de los portaobjetos estuvieron enmascaradas a las condiciones de tratamiento.

*Estadística.* Se realizaron análisis estadísticos con la ayuda del programa informático Prism GraphPad.

## 15 Resultados

*Los linfocitos B estimulados con CD40L son potentes estimuladores de Treg reactivos a aloantígeno.* Se han usado previamente PBMC alogénicas, células dendríticas (DC), linfocitos B recientes y linfocitos B estimulados con CD40L (mencionados como CD40L-sBc) para estimular de forma selectiva la expansión de células reactivas a aloantígeno humanas<sup>13-16</sup>. Sin embargo, se conoce poco acerca de la capacidad relativa de estos subconjuntos de células en la estimulación de los Treg. Una comparación de las potencias relativas de las PBMC irradiadas, los linfocitos B recién aislados y los CD40L-sBc en una reacción de linfocitos mezclados (MLR) unidireccional demostró que los CD40L-sBc eran los estimuladores más potentes. Usando un ensayo de dilución de tinte CFSE para controlar la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, se descubrió que pueden detectarse robustas respuestas proliferativas después de 3,5 días de estimulación con CD40L-sBc y se observó únicamente una débil respuesta después de estimulación usando PBMC irradiadas (figura 6A). Sincronizando adicionalmente los Treg CD4+FOXP3+HELIOS+, se descubrió que los CD40L-sBc estimulaban la proliferación vigorosa de los Treg en estos cultivos MLR (figura 6B). los linfocitos B de sangre periférica recién aislados no estimulaban la proliferación de linfocitos T, coherente con los informes previos<sup>23</sup>. Para determinar si la proliferación era en respuesta a aloantígenos expresados en CD40L-sBc, se comparó la capacidad estimuladora de los CD40L-sBc autólogos y los CD40L-sBc alogénicos con grados variables de faltas de coincidencias de HLA con los linfocitos T respondedores. Se descubrió que, para las mismas PBMC que responden, las frecuencias de los linfocitos T convencionales (Tconv) CD4+ que responden y los Treg se correlacionaban positivamente con los números de faltas de coincidencia de HLA-DR y las frecuencias de linfocitos T CD8+ que responden positivamente correlacionados con los números de ausencia de coincidencia de HLA-AB (figura 6C y 6D). De forma interesante, las frecuencias de los Treg que responden fueron coherentemente mayores que las de Tconv CD4+ y linfocitos T CD8+. Estos resultados demostraron que los CD40L-sBc eran potentes estimuladores de los Treg reactivos a aloantígeno y promovían la exploración de la utilidad de CD40L-sBc en expansión selectiva de Treg reactivos a aloantígeno para uso clínico.

*Generación de células de alimentación que expresan CD40L que cumplen la buena práctica de fabricación (GMP).* Una línea celular que expresa CD40L humana que cumple GMP, KT64-CD40L.HLADR0401 (abreviada como K-CD40L) se generó para posibilitar la fabricación de Treg para uso clínico. Se usó transducción lentivírica para expresar CD40L en la línea celular de mieloleucemia K562, que se ha usado como vehículo para vacunas contra el cáncer y como células presentadoras de antígeno artificiales en la fabricación de linfocitos T terapéuticos para aplicaciones clínicas<sup>24-27</sup>. La expresión de CD40L es esencial para la generación de CD40L-sBc. La expresión de CD64 y HLADR0401 no interfiere con la actividad de CD40L, permitiendo al mismo tiempo que la línea celular se use para otras aplicaciones que incluyen expansiones de linfocitos T específicos de antígeno y policlonales. Dos rondas de estimulación con las células K-CD40L en los días 0 y 7 junto con el suministro constante de IL-4 dio lugar a una expansión de 10 a 50 veces de los linfocitos B purificados de sangre periférica o bazos (figura. 7A). Cuando se comparan con los linfocitos B recién aislados, los CD40L-sBc expresaban cantidades significativamente mayores de HLADR, CD80 y CD86 (figura 7B y 7C), coherente con su potencia potenciada en la estimulación de linfocitos T alogénicos. Aunque hubo un aumento coherente de la expresión de HLA-DR, CD80 y CD86 en CD40L-sBc, los niveles variaron de un donador a otro. Sin embargo, los CD40L-sBc generados de múltiples donadores podían inducir MLR y expansión de Treg, lo que sugiere que la potencia del CD40L-sBc no estaba estrictamente correlacionada con los niveles absolutos de las moléculas coestimuladoras y MHC de clase II, siempre que se cumpliera un umbral.

*CD40L-sBc inducen de forma robusta la expansión de Treg reactivos a aloantígeno.* Se ensayaron las condiciones para la estimulación óptima de Treg reactivos a aloantígeno usando CD40L-sBc. Se conoce un protocolo para la expansión clonal de Treg usando dos rondas de estimulación (días 0 y 9) de Treg CD4+CD127lo/-CD25+ purificados por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) con microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28<sup>28</sup>. Para expandir Treg reactivos a aloantígeno, se siguió un protocolo similar, pero las microesferas se remplazaron con CD40L-sBc irradiados en los días 0 y 9. Se consiguió una expansión de 50 a 300 veces en el día 14 usando este protocolo (figura 8A). Al final del cultivo (día 14), los Treg expandidos eran muy sensibles a los mismos CD40L-sBc usados para estimular la expansión de Treg, pero no lograban responder a los propios CD40L-sBc (figura 8B). Este resultado demostró un notable enriquecimiento de los Treg reactivos a los aloantígenos expresados por los CD40L-

sBc usados para estimular la expansión de Treg. De hecho, en el día 9 después de la estimulación primaria, los Treg ya eran altamente reactivos a los CD40L-sBc, que es similar a lo observado en el día 14, lo que sugiere que podría no ser necesario enriquecer adicionalmente la alorreactividad durante la restimulación. Dada la robusta expansión de poliTreg usando estimulación anti-CD3 y anti-CD28<sup>28</sup> y la facilidad de normalización e implementación con protocolos basados en microesferas, el remplazo de CD40L-sBc con microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28 durante la restimulación puede dar lugar a expansiones comparables. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas en las expansiones globales de Treg entre restimulaciones con sBc y microesferas (figura 8C). Por lo tanto, se adoptó el protocolo de estimulación primaria de sBc seguida por restimulación policlonal con microesferas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28.

Una unidad de sangre produce un promedio de 5 millones de Treg después de purificación por FACS. Por lo tanto, usando el protocolo de la figura 8, pueden producirse entre 250 millones a 1500 millones de Treg reactivos a aloantígeno basándose en una expansión de 50 a 300 veces. Se estimó que las cantidades de Treg necesarias para la eficacia en el trasplante en seres humanos están en el intervalo de 300 millones a varios miles de millones de células<sup>20</sup>. Para asegurar la producción constante de más de 300 millones de Treg reactivos a aloantígeno, se exploraron condiciones modificadas para mejorar la expansión de Treg. Se observó que, a diferencia de los poliTreg activados en el día 0 con microesferas, los Treg estimulados por CD40L-sBc siguieron agrupándose y expandiéndose en el día 9 después de la estimulación inicial (figura 8D). Esta observación sugirió que los CD40L-sBc eran más potentes que las microesferas recubiertas con mAb que dan lugar a activación prolongada de los Treg. La restimulación de linfocitos T activados podría dar lugar a muerte celular inducida por activación, limitando de este modo la expansión óptima. Por lo tanto, la restimulación se retardó hasta el día 11 cuando las células se disociaron de los grupos y se volvieron más pequeñas (figura 8E). El retardo de la restimulación mejoró significativamente la expansión global (figura 8F). Además de la cronología de la restimulación, se descubrió que la fuente de las microesferas usadas para la restimulación afectaba enormemente a la tasa de expansión de Treg (figura 8G). Globalmente, optimizando la cronología de restimulación y los reactivos de restimulación, los Treg reactivos a aloantígeno se expandían de forma rutinaria de 200 a 1600 veces, produciendo de forma fiable más de  $1 \times 10^9$  Treg reactivos a aloantígeno en un periodo de 16 días.

*Caracterización in vitro de Treg expandidos por CD40L-sBc.* Se descubrió que los Treg expandidos con el protocolo de CD40L-sBc eran CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> con contaminación mínima con linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos B CD19<sup>+</sup> (figura 9A). La mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> eran FOXP3<sup>+</sup>HELIOS<sup>+</sup> y coexpresaban CD27 y CD62L (figura 9B), distinto del patrón expresado en linfocitos Tconv expandidos de forma similar (figura 9B). Finalmente, los Treg expandidos tenían >80 % de región desmetilada específica de Treg desmetilado. De forma colectiva, el fenotipo de los Treg expandidos usando CD40L-sBc alogénicos sugirió que eran Treg diferenciados estables.

Para determinar la reactividad de los Treg expandidos hacia los CD40L-sBc alogénicos usados para la estimulación primaria, los Treg recogidos en el día 16 se restimularon con los mismos CD40L-sBc. De promedio, un 87,5 % (intervalo de un 72,5 a un 95,2 %) de los Treg expandidos por aloantígeno proliferaron en respuesta a la restimulación por los mismos sBc, similar a la proliferación inducida usando microesferas anti-CD3 y anti-CD28 (promedio de un 88,8 %, intervalo de un 73,6 a un 96 %), lo que sugiere que la inmensa mayoría de los Treg eran reactivos a los aloantígenos expresados por los CD40L-sBc (figura 9C y 9D).

Coherente con estos datos fenotípicos y el reconocimiento potenciado de aloantígenos, los Treg expandidos eran muy supresores cuando se activaban *in vitro* por PBMC del mismo donador que los CD40L-sBc (figura 9E). Una comparación paralela de los Treg expandidos por aloantígeno y los Treg expandidos de forma policlonal demostró que los Treg reactivos a aloantígeno donadores eran de 5 a 25 veces más potentes en suprimir MLR que los poliTreg (figura 9E). Los Treg expandidos por restimulación con CD40L-sBc o con microesferas anti-CD3 y anti-CD28 tienen actividad idéntica en suprimir MLR (figura 9E), lo que demuestra que la restimulación policlonal no alteraba su alorreactividad o actividad supresora *in vivo*. También se comparó la actividad supresora estimulada por PBMC del mismo donador de los CD40L-sBc o un tercer donador. Los Treg expandidos con sBc alogénicos eran de 9 a 27 veces más supresores cuando se estimulaban por la PBMC pertinente que cuando se estimulaban por células de una tercera parte (figura 9F). En conjunto, los resultados muestran que los Treg expandidos por CD40L-sBc tenían reactividad altamente enriquecida y actividad supresora hacia los aloantígenos expresados por los linfocitos B usados para su expansión.

*Los Treg reactivos a aloantígeno son superiores en proteger los aloinjertos de piel in vivo.* Usando un modelo de lesión mediada aloinmunitaria de aloinjertos de piel humana (figura 11A)<sup>13</sup>, se comparó la función protectora de los Treg reactivos a aloantígeno y los poliTreg. A ratones BALB/c.Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> se les trasplantó piel humana de un donador HLA-DR0401<sup>+</sup> y se permitió que los injertos se curaran durante 6 semanas antes de la transferencia adoptiva de PBMC alogénicas reducidas de células CD25<sup>+</sup> en solitario o en combinación con diferentes preparaciones de Treg singénicos a una relación 5:1 de células efectoras:linfocitos Treg. Los donadores de PBMC eran HLA-DR0401<sup>-</sup> y los Treg reactivos a aloantígeno de estos donadores se expandieron usando CD40L-sBc HLA-DR0401<sup>+</sup>. Los injertos se controlaron hasta el rechazo o hasta un máximo de 6 semanas después de la reconstitución de las PBMC cuando los injertos se recogieron para análisis histológico. Los niveles de injerto de leucocitos humanos en los bazos fueron similares en los tres grupos de ratones que recibieron PBMC humanas en solitario o en combinación con Treg (figura 11B). Ningún animal desarrolló síntomas xenogénicos de enfermedad de

injerto contra hospedador confirmado por el mantenimiento de un peso corporal estable (figura 11C).

En comparación con los injertos de piel en animales de control que no recibieron PBMC (tabla 4-1), los injertos de piel en el grupo de PBMC en solitario mostraron intensos infiltrados de células mononucleares CD45<sup>+</sup> humanas en las uniones dermoepidérmicas con aumento concomitante en la proliferación de queratinocitos, pérdida de involucrina en el estrato espinoso superior y el granuloso, y vascularización disminuida como se indica por la reducción en las células CD31<sup>+</sup> agrupadas en la dermis (tabla 4-1). Estos cambios revelaron inflamación activa de piel y pérdida de integridad dermoepidérmica mediada por los leucocitos humanos alogénicos. Como se informa en un estudio previo<sup>13</sup>, todos estos parámetros inflamatorios en los injertos se redujeron por coinyección de poliTreg, que se correlaciona con un aumento en células FOXP3<sup>+</sup> (tabla 4-1). Sorprendentemente, los injertos de piel en ratones que recibieron Treg reactivos a aloantígeno estaban casi completamente protegidos de las características histológicas de las lesiones de los injertos y no eran distinguibles de aquellos en injertos de control excepto por la infiltración de células FOXP3<sup>+</sup> en las uniones dermoepidérmicas (tabla 4-1). El análisis cuantitativo de estos hallazgos histológicos demostró una reducción significativa en queratinocitos Ki67<sup>+</sup>, un aumento en células endoteliales vasculares CD31<sup>+</sup>, que se correlaciona con relaciones significativamente mayores de células FOXP3<sup>+</sup> a CD3<sup>+</sup> en injertos de ratones a los que se ha inyectado Treg reactivos a aloantígeno en comparación con los de ratones tratados con poliTreg (tabla 4-1). Estos resultados demostraron que los Treg reactivos a aloantígeno eran más eficaces en controlar el daño al aloinjerto *in vivo* que la cantidad equivalente de poliTreg. A una relación de 5:1 de efectores:Treg, los Treg reactivos a aloantígeno protegieron completamente los injertos de piel de cambios patológicos inducidos por las células efectoras.

**Tabla 4-1. Fenotipo de Treg reactivos a aloantígeno expandidos**

Marcador	CD3+	CD4+	FOXP3+	TSDR	HELIOS+	CD62L+ CD27+	CD8+	CD19+
Media	97,1	97,1	83,0	94,0	88,2	85,4	0,5	0,2
DT	2,6	1,9	10,8	15,5	6,6	6,4	0,2	0,2
N	14	14	14	10	14	10	14	14

**Referencias**

1. Wood, K.J. y Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 199-210 (2003).
2. Walsh, P.T., Taylor, D.K. y Turka, L.A. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 114, 1398-1403 (2004).
3. Waldmann, H., Adams, E. y Cobbold, S. Reprogramming the immune system: co-receptor blockade as a paradigm for harnessing tolerance mechanisms. *Immunol Rev* 223, 361-370 (2008).
4. Tang, Q., Bluestone, J.A. y Kang, S.M. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *J Mol Cell Biol* 4, 11-21 (2011).
5. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352 (2005).
6. Sagoo, P., Lombardi, G. y Lechler, R.I. Regulatory T cells as therapeutic cells. *Curr Opin Organ Transplant* 13, 645-653 (2008).
7. Trzonkowski, P., et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol* 133, 22-26 (2009).
8. Brunstein, C.G., et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117, 1061-1070 (2010).
9. Di Ianni, M., et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 117, 3921-3928 (2011).
10. Marek-Trzonkowska, N., et al. Administration of CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells Preserves beta-Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care* 35, 1817-1820 (2012).
11. Sanchez-Fueyo, A., et al. Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol* 176, 329-334 (2006).
12. Tsang, J.Y., et al. Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 118, 3619-3628 (2008).
13. Sagoo, P., et al. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune

- skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 3, 83ra42 (2011).
14. Peters, J.H., Hilbrands, L.B., Koenen, H.J. y Joosten, I. Ex vivo generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4(pos)CD25(high) T cells for immunotherapy. *PLoS One* 3, e2233 (2008).
- 5 15. Koenen, H.J., Fasse, E. y Joosten, I. CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells. *J Immunol* 174, 7573-7583 (2005).
- 10 16. Banerjee, D.K., Dhodapkar, M.V., Matayeva, E., Steinman, R.M. y Dhodapkar, K.M. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 108, 2655-2661 (2006).
- 15 17. Tu, W., et al. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood* 112, 2554-2562 (2008).
18. Koenen, H.J., et al. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112, 2340-2352 (2008).
- 20 19. Baron, U., et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37, 2378-2389 (2007).
20. Tang, Q. y Lee, K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transplant* 17, 349-354 (2012).
- 25 21. Hoffmann, P., et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol* 39, 1088-1097 (2009).
22. Hippen, K.L., et al. Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci Transl Med* 3, 83ra41 (2011).
- 30 23. Chen, L.C., Delgado, J.C., Jensen, P.E. y Chen, X. Direct expansion of human allospecific FoxP3+CD4+ regulatory T cells with allogeneic B cells for therapeutic application. *J Immunol* 183, 4094-4102 (2009).
24. Ye, Q., et al. Engineered artificial antigen presenting cells facilitate direct and efficient expansion of tumor infiltrating lymphocytes. *Journal of translational medicine* 9, 131 (2011).
- 35 25. Butler, M.O., et al. Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells. *Sci Transl Med* 3, 80ra34 (2011).
- 40 26. Smith, B.D., et al. K562/GM-CSF immunotherapy reduces tumor burden in chronic myeloid leukemia patients with residual disease on imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 16, 338-347 (2010).
27. Borrello, I.M., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-secreting cellular immunotherapy in combination with autologous stem cell transplantation (ASCT) as postremission therapy for acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 114, 1736-1745 (2009).
- 45 28. Putnam, A.L., et al. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 58, 652-662 (2009).
- 50 29. Golovina, T.N., et al. CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *J Immunol* 181,2855-2868 (2008).
30. Cobbold, S. y Waldmann, H. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 10, 518-524 (1998).
- 55 31. Kendal, A.R., et al. Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. *J Exp Med* 208, 2043-2053 (2011).
32. Sagoo, P., Lombardi, G. y Lechler, R.I. Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ transplantation. *Frontiers in immunology* 3, 184 (2012).
- 60 33. Novak, E.J., Liu, A.W., Nepom, G.T. y Kwok, W.W. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest* 104, R63-67 (1999).
- 65 34. Parry, R.V., Rumbley, C.A., Vandenbergh, L.H., June, C.H. y Riley, J.L. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 171, 166-174 (2003).

35. Suhoski, M.M., et al. Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 981-988 (2007).
- 5 36. Zand, M.S., et al. A renewable source of donor cells for repetitive monitoring of T- and B-cell alloreactivity. *Am J Transplant* 5, 76-86 (2005).
37. Wieczorek, G., et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 69, 599-608 (2009).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador humanos, que comprende:
  - 5 a) cocultivar linfocitos B CD19+ de un donador humano con células de alimentación de leucemia humana CD40L+ irradiadas en condiciones eficaces para producir linfocitos B estimulados (sBc);
  - b) cocultivar linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo de un destinatario humano con dichos sBc en condiciones eficaces para expandir de forma selectiva los linfocitos T reguladores (Treg) reactivos de donador humanos; y
  - 10 c) restimular dichos Treg reactivos de donador por entrecruzamiento de CD3 y CD28 de dichos Treg reactivos de donador en condiciones eficaces para producir Treg reactivos de donador que son CD4+, Helios+ y Foxp3+;

en el que el donador es de HLA no coincidente en relación con el destinatario humano.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa c) comienza 9-12 días después de que comience la etapa b).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dichos Treg reactivos de donador son CD27+, CD62L+.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además una etapa antes de a) de aislar linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) criopreservadas obtenidas de dicho destinatario humano.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la etapa a) comprende cocultivar dichos linfocitos B y dichas células de alimentación en medio que comprende insulina, transferrina, interleucina-4 y ciclosporina-A.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la etapa b) comprende cocultivar dichos sBc y dichos linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo en medio que comprende interleucina-2 después de haber irradiado dichos sBc.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dichos Treg reactivos de donador restimulados comprenden de 200 veces a 2000 veces más células que dichos linfocitos T CD4+, CD25+, CD127-/lo al inicio de la etapa b).
- 35 8. Una composición que comprende los Treg reactivos de donador restimulados producidos usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un tampón fisiológicamente aceptable.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que los Treg expandidos son >95 % CD4+, >60 % Foxp3+, >90 % con promotor de Foxp3 desmetilado, >90 % reactivos de donador y suprimen la proliferación de linfocitos T estimulada por el donador cuando están presentes a una relación 1:125 de Treg:PBMC respondedoras.
- 40 10. Un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención del rechazo de un aloinjerto de órgano sólido por el destinatario humano, comprendiendo dicho medicamento: de  $10^7$  a  $10^{11}$  Treg reactivos de donador restimulados producidos usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 45 11. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho aloinjerto de órgano sólido se selecciona del grupo que consiste en aloinjertos cardiacos, pulmonares, cardiacos/pulmonares, renales, pancreáticos, renales/pancreáticos, hepáticos, intestinales y de piel.
- 50 12. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11, en el que dicho medicamento es eficaz para reducir la probabilidad de rechazo agudo y/o crónico.
13. El medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que dicho medicamento es eficaz para conseguir uno o más del grupo que consiste en aumento de los porcentajes de Treg sobre la medida inicial, aumento de la frecuencia de Treg reactivos de donador, aumento de la actividad de Treg reactivos de donador e inducción de los perfiles de expresión génica de tolerancia en PBMC y/o tejido trasplantado.
- 55 14. El medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que dicho medicamento se administra al destinatario humano después de que el destinatario humano haya experimentado un régimen de inmunosupresión de apoyo Treg que comprende globulina de conejo anti-timocito en una cantidad eficaz para conseguir la reducción de linfocitos.
- 60 15. El medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en el que el medicamento se administra al destinatario humano simultáneamente con prednisona, micofenolato de mofetilo y tacrólimus a dosis por debajo del tratamiento habitual.
- 65 16. El medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el

medicamento se administra al destinatario humano simultáneamente con sirólimus.

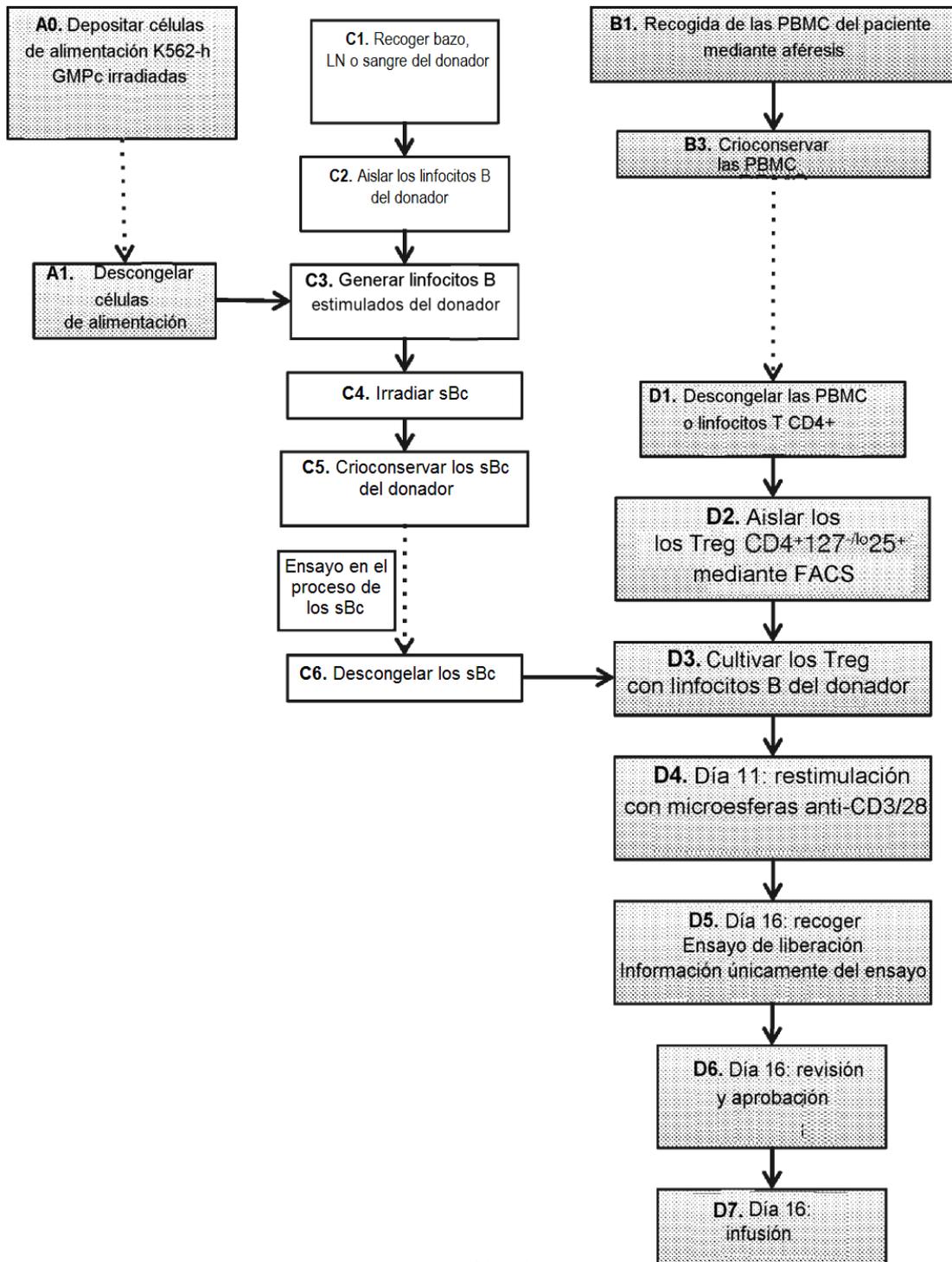
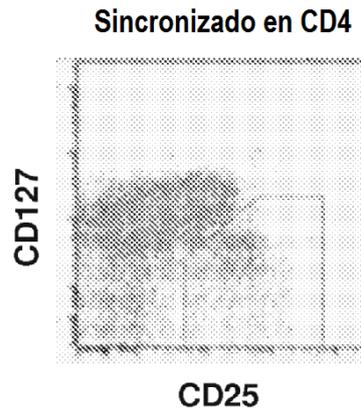
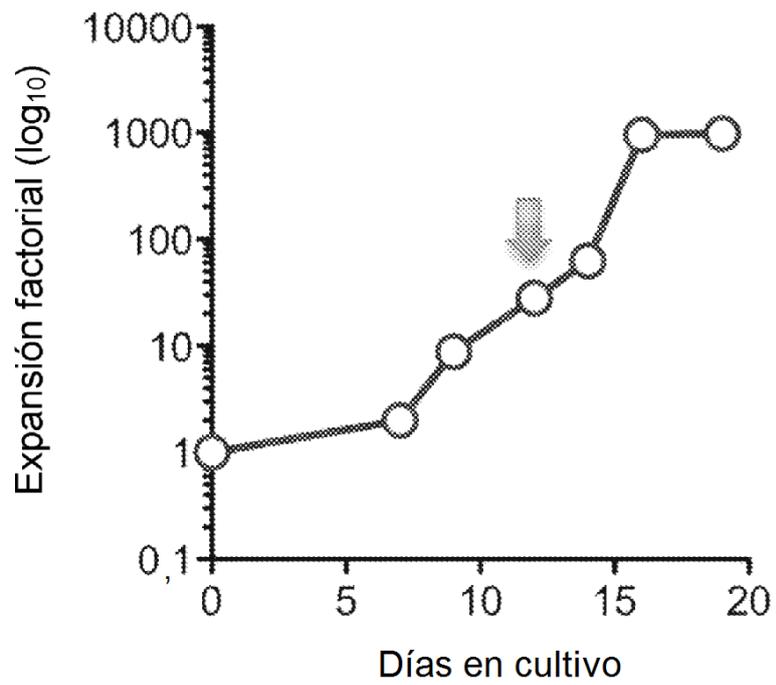


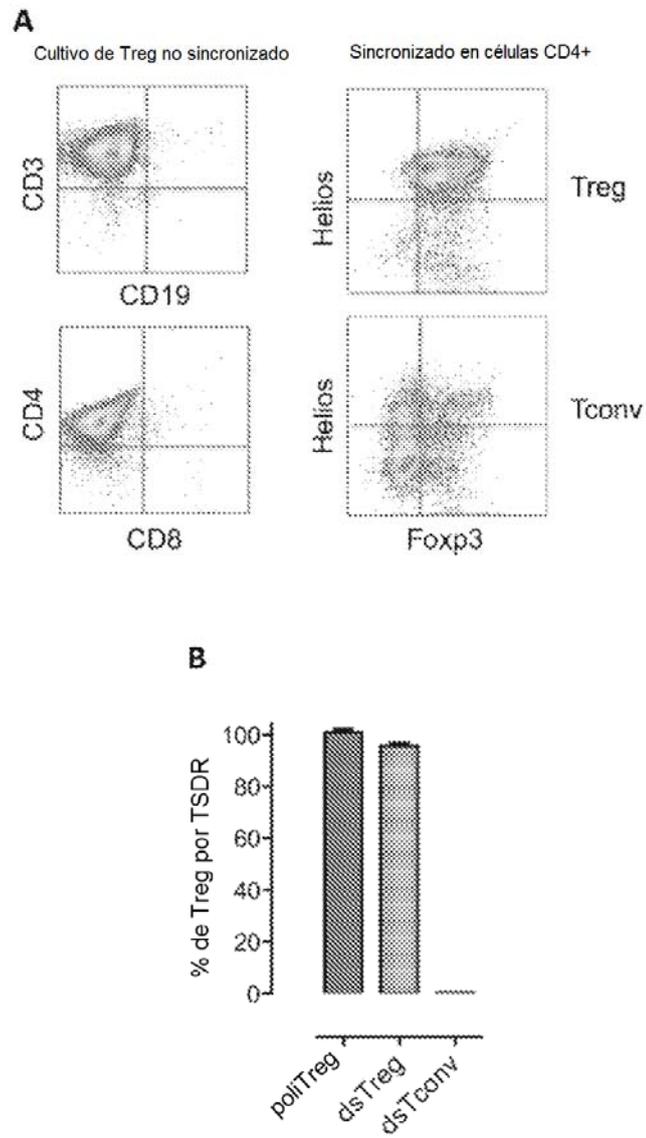
FIG. 1



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 3**

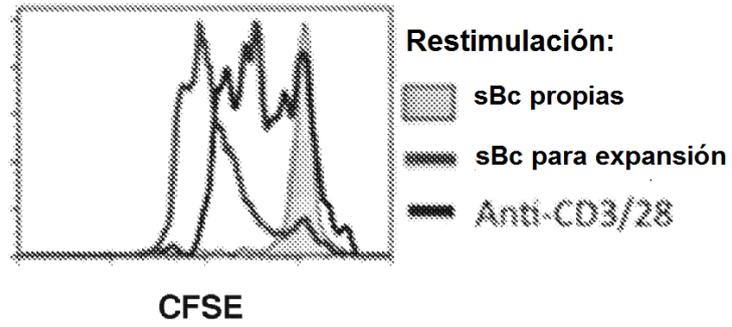


FIG. 4A

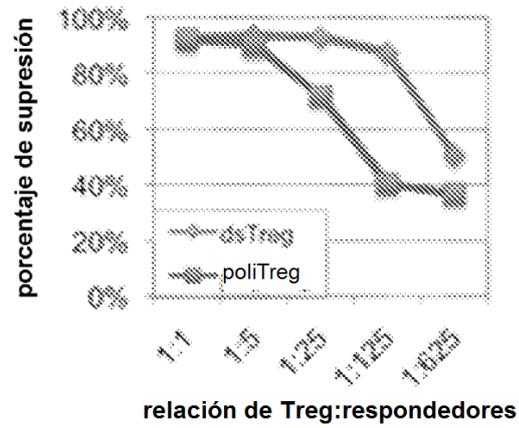
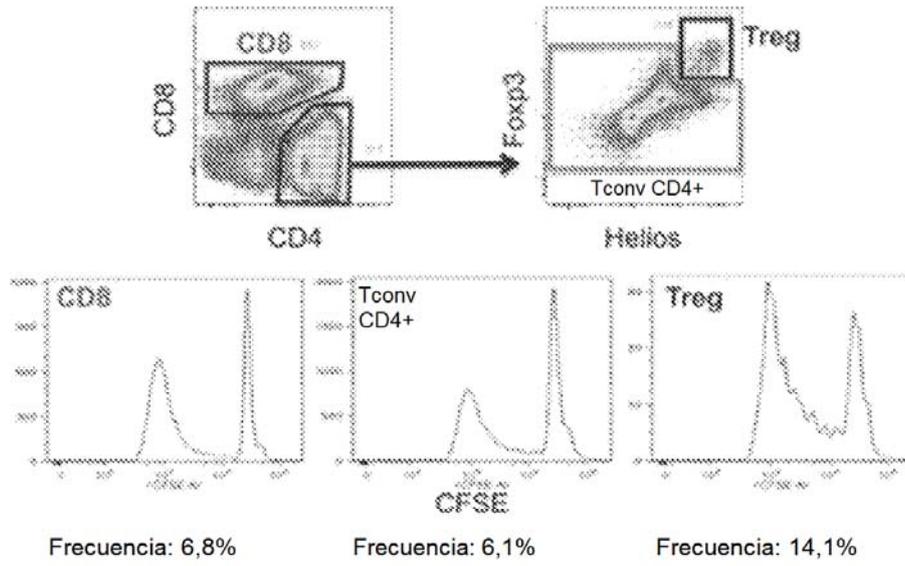
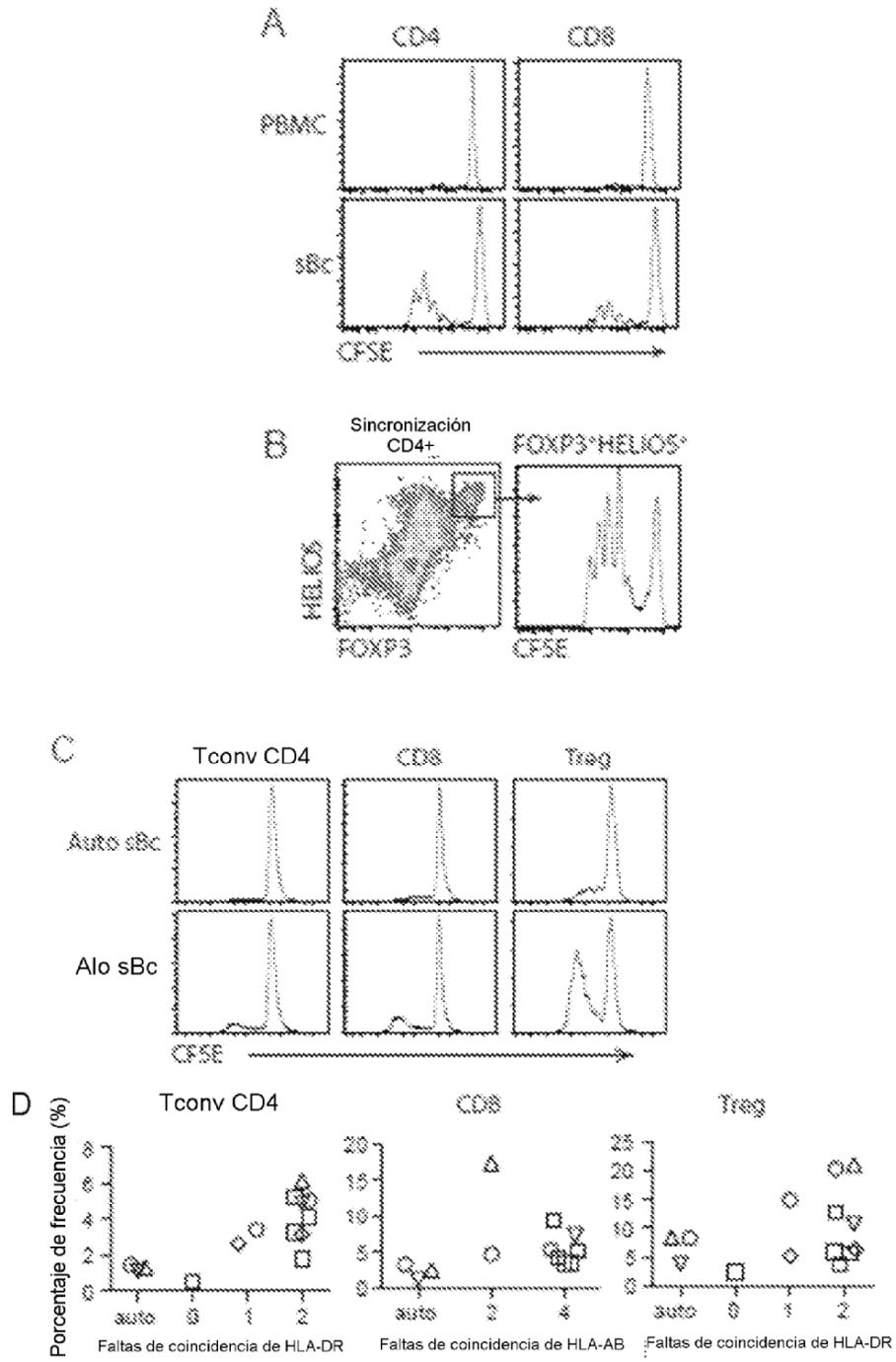


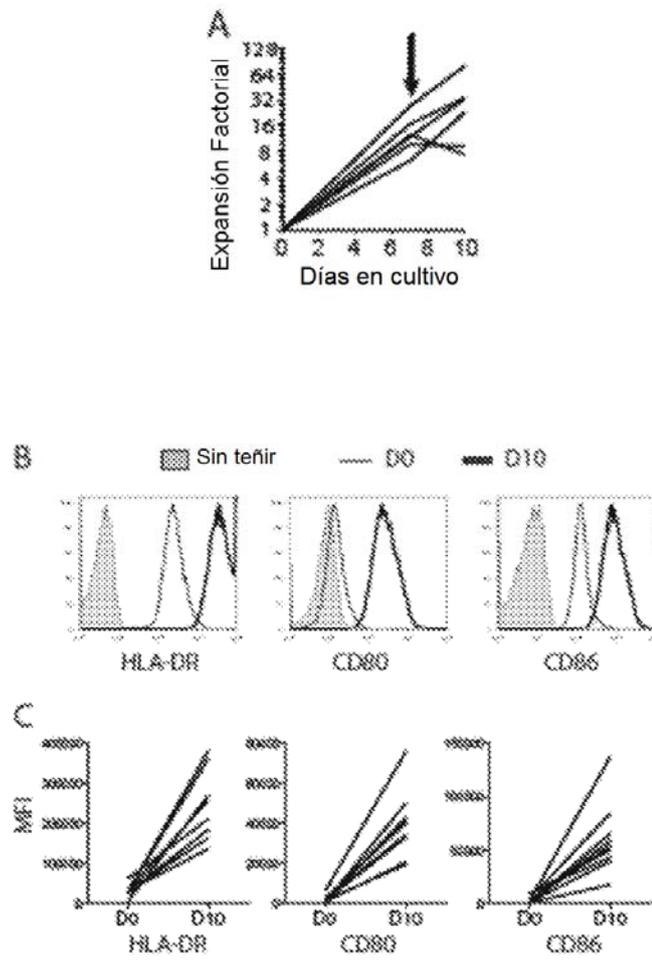
FIG. 4B



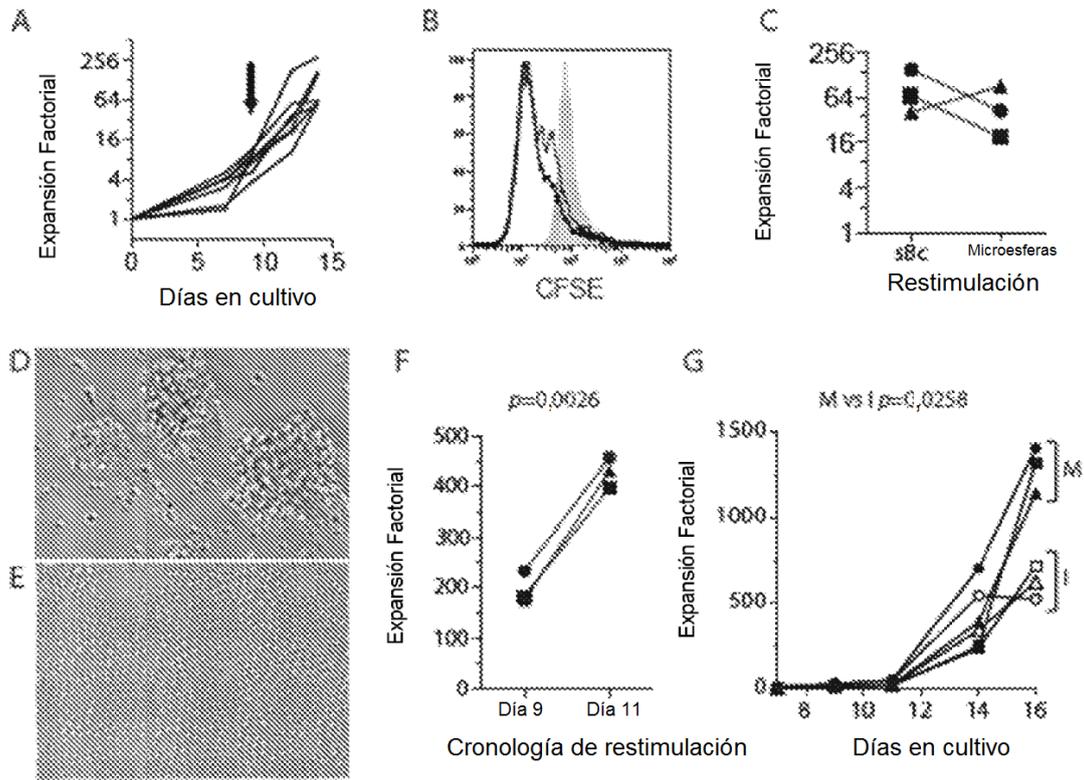
**FIG. 5**



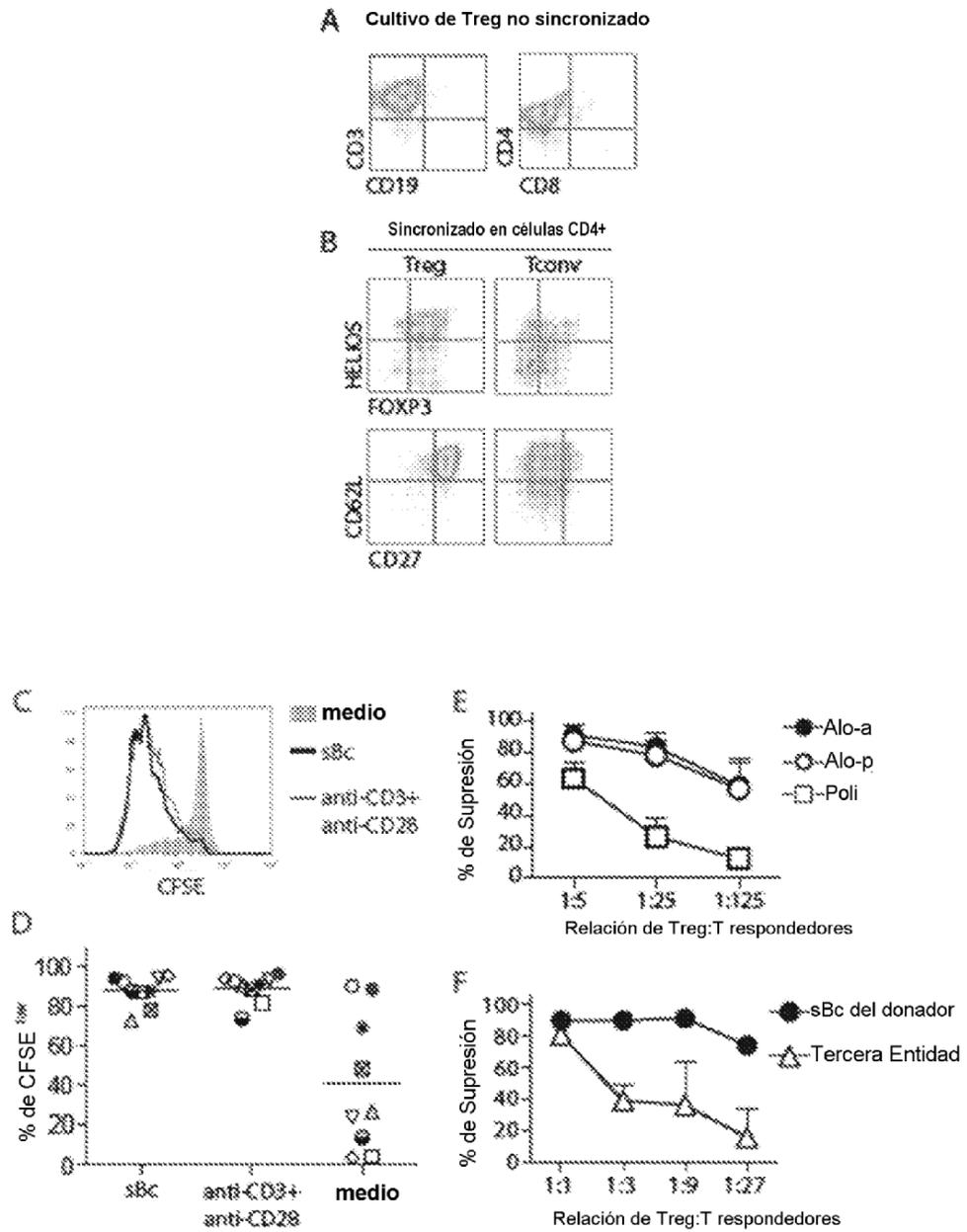
**FIG. 6**



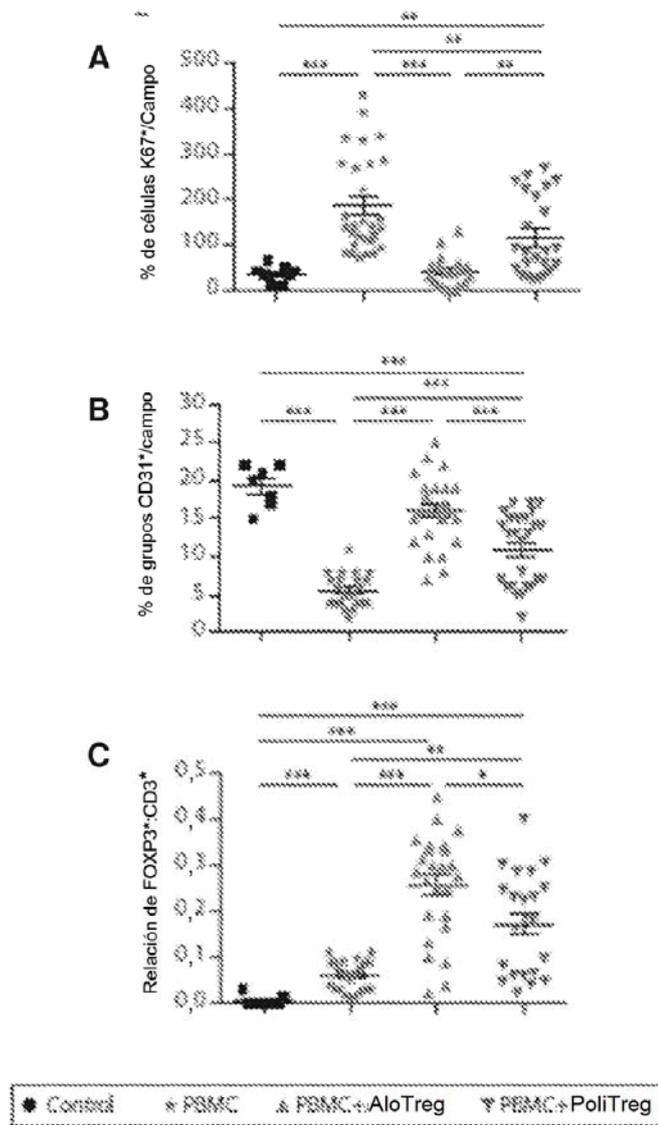
**FIG. 7**



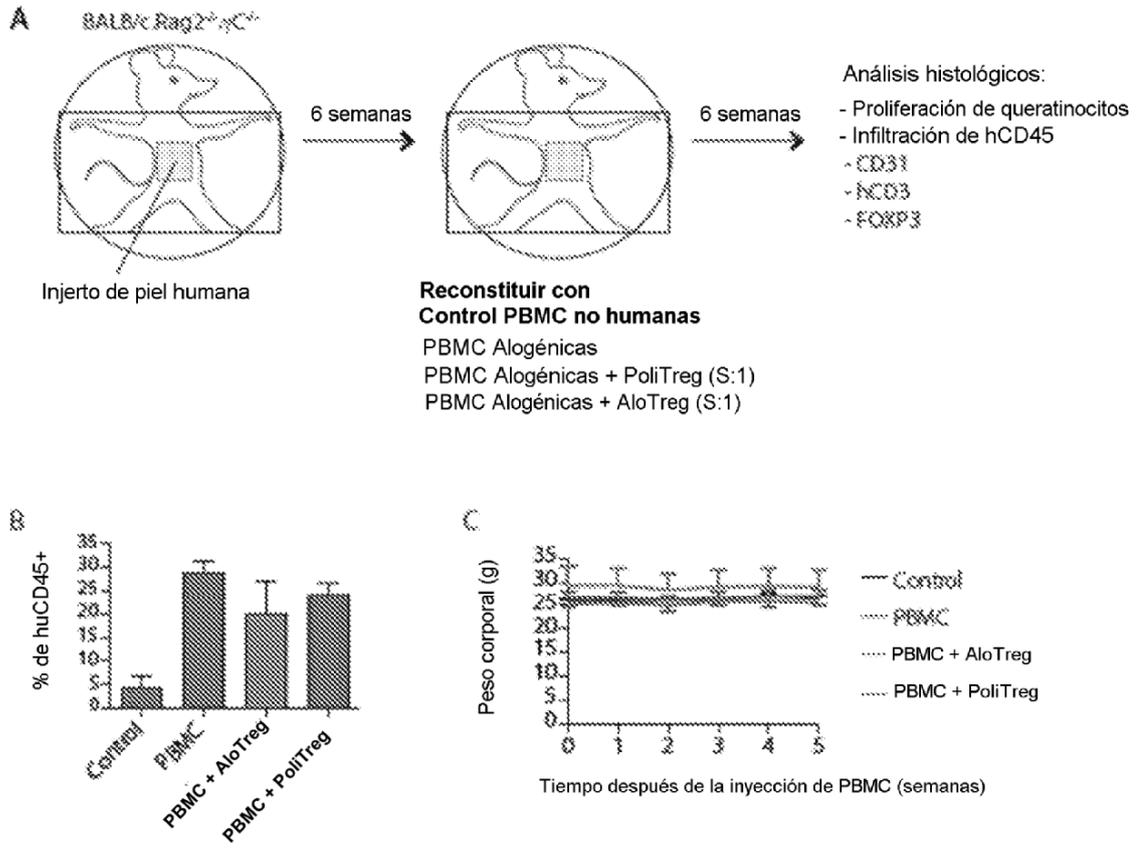
**FIG. 8**



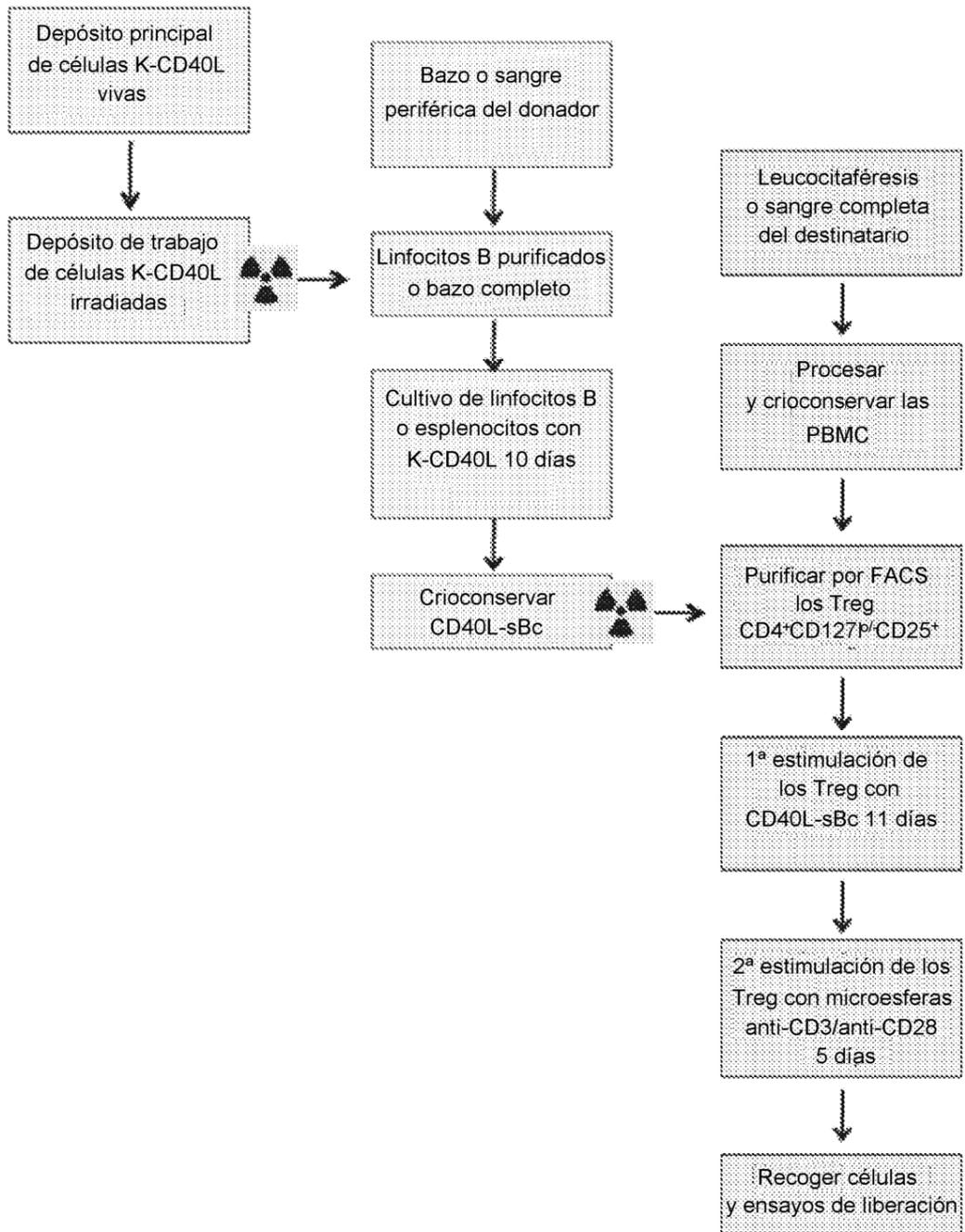
**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**