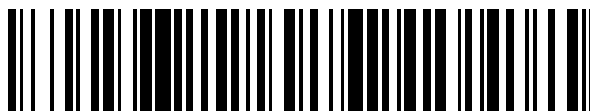


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 073**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015** **PCT/EP2015/057257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015** **WO15150491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015** **E 15713503 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019** **EP 3126377**

54 Título: **Un péptido donante aislado derivado de MHC y su uso**

30 Prioridad:

01.04.2014 EP 14163081

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITE DE NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUILLONNEAU, CAROLE;
ANEGON, IGNACIO y
PICARDA, ELODIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 073 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

Un péptido donante aislado derivado de MHC y su uso

Campo

La invención pertenece al campo de la inmunoterapia

5 Antecedentes

El trasplante alogénico de humano a humano sigue siendo el mejor tratamiento para reemplazar los órganos que han fallado después de la enfermedad. La incompatibilidad entre las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las células receptoras y donantes es la principal barrera para el éxito a largo plazo del trasplante de órganos. La inducción de tolerancia al aloinjerto se ha convertido en un objetivo principal y ciertas estrategias de tolerancia están comenzando a aplicarse clínicamente (1). Se ha descrito que diferentes poblaciones de Tregs son capaces de inducir tolerancia a los órganos alogénicos. La mayoría de estas Tregs (células T reguladoras) son Tregs CD4⁺, mientras que Tregs CD8⁺ están menos definidas (2).

Se ha descrito previamente que el bloqueo de coestimulación de la interacción CD40-CD40L, una de las estrategias más eficientes para prolongar la supervivencia del aloinjerto de órganos (3), induce las células Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (llamadas Tregs CD8⁺CD40lg) con una potente capacidad supresora (2, 4-6). Se ha demostrado que las Tregs CD8⁺CD40lg específicas del donante, pero no las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} naturales transfirieron tolerancia a los receptores de trasplante vírgenes. Además, estas células actuaron de una manera inusual ya que la supervivencia del aloinjerto dependía de su secreción de interferón-γ (IFN-γ) para mejorar la expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por las células dendríticas (DC) y las células endoteliales del injerto (EC) (5). También se ha demostrado recientemente que la actividad supresora de las Tregs CD8⁺CD40lg se realizó principalmente en presencia de DCs plasmocitoides (pDCs) y que la proteína 2 similar al fibrinógeno (FGL2) estuvo implicada en la supresión (6).

El requisito para una interacción TCR en la conformación de la población de células T reguladoras es un debate activo y continuo (2, 7). Algunos estudios sugieren que la especificidad y diversidad de la TCR son críticas para la función *in vivo* y la potencia de las Tregs CD8⁺ (2, 7-13). Diferentes modelos para las Tregs CD4⁺ han demostrado que las Tregs específicas de antígeno son supresores más potentes que las células Tregs sin restricción (2, 14). También se sabe para las Tregs CD4⁺ que la diversidad de TCR es crítica para la selección y diferenciación del timo y su impacto en la generación y función de las Tregs se ha descrito recientemente (15). La secuenciación de alto rendimiento ha demostrado que las Tregs vírgenes con alta diversidad de TCR se expanden de manera más eficiente, son más adaptables y más eficientes para suprimir la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) tras la transferencia adoptiva que las Tregs restringidas por TCR (13, 16). Utilizando Immunoscope®, se ha demostrado previamente que las Tregs CD8⁺CD40lg acumularon un repertorio sesgado hacia el elemento Vβ11 (5), lo que sugiere la posibilidad de una expansión clonal. Hasta la fecha, se sabe poco sobre las características de reconocimiento de esta población Treg, o de las poblaciones Treg CD8⁺ en general. El papel exacto de la interacción TCR/MHC/péptido en la actividad de las Treg sigue siendo, por lo tanto, un tema de debate.

Además, todavía existe una gran necesidad de proporcionar estrategias terapéuticas eficientes basadas en la supresión mediada por las Tregs de la respuesta inmune contra el trasplante (tal como los anticuerpos específicos del donante que se asocian con el rechazo mediado por anticuerpos), evitando así la necesidad de utilizar fármacos inmunosupresores no específicos que tienen el inconveniente de aumentar la tasa de ataque de enfermedades oportunistas (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales o fúngicas) y aumentar la mortalidad de pacientes trasplantados.

Ballet C. *et al.* describe el péptido 33 de la secuencia NREEYARFSDVGEYR (SEQ ID NO: 2) pero no describe su uso como un fármaco (18).

Compendio

45 Como se define mediante las reivindicaciones, la presente invención se refiere a:

- un método *in vitro* o *ex vivo* para generar una población de Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, que comprende una etapa de cultivar una población de Tregs CD8⁺ con un medio de cultivo que comprende un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 en presencia de una población de células dendríticas plasmocitoides.
- 50 - un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso como fármaco.
- un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso en la inducción de tolerancia en un paciente que lo necesita y

- un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente que lo necesite.

Descripción detallada

Los inventores han investigado si la especificidad fina de TCR de las Tregs de CD8⁺CD40lg influye en la función de Treg y la supervivencia del aloinjerto y han demostrado así por primera vez en el trasplante que las Tregs CD8⁺CD40lg inducidas reconocieron un péptido dominante (llamado Du51) derivado de una región polimórfica de las moléculas MHC donantes de clase II. Este péptido expandió las Tregs CD8⁺ en presencia de pDCs, al menos *ex vivo*, e indujo tolerancia en receptores trasplantados vírgenes sin tratamiento adicional.

Además, los inventores generaron un tetrámero específico y demostraron *ex vivo* e *in vivo* la tolerancia dominante ejercida por las Tregs CD8⁺CD40lg específicas de antígenos. Finalmente, demostraron que este péptido fue reconocido por las Tregs que expresan TCRs específicos de Vβ11 y Vβ18. Estos TCR comprendían un repertorio Vβ11 privado pero restringido en el bazo y el injerto, pero un repertorio Vβ18 privado y diverso en el bazo y un repertorio Vβ18 más restringido en el injerto, que aseguran la supresión eficiente de las respuestas inmunes aloreactivas.

Péptidos

Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido” se refiere a un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producido de manera natural o sintéticamente, sin una longitud específica. El término péptido no excluye modificaciones post-traduccionales que incluyen, pero no se limitan a fosforilación, acetilación, glicosilación y similares. El término también se aplica a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural y los polímeros de aminoácidos que se producen de manera no natural.

Por un péptido “aislado”, se entiende que el péptido está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos, u otras impurezas proteicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de un péptido aislado contiene el péptido en una forma altamente purificada, es decir, de al menos aproximadamente 80% pura, al menos aproximadamente 90% pura, al menos aproximadamente 95% pura, más del 95% pura, tal como 96%, 97%, o 98% o más pura, o más del 99% pura. Una manera de mostrar que una preparación proteica particular contiene un péptido aislado es por la aparición de una sola banda después de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de la preparación de proteínas y la tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Alternativamente, otras técnicas de química analítica tales como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o la espectrometría de masas (MS) también se pueden utilizar para determinar la pureza. Un péptido que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificado.

Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden producir mediante métodos de síntesis de péptidos automatizados convencionales o mediante expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y fabricar proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden sintetizar en disolución o sobre un soporte sólido según las técnicas convencionales. Están disponibles comercialmente varios sintetizadores automáticos y se pueden utilizar según protocolos conocidos como se describe en Stewart y Young; Tam *et al.*, 1983; Merrifield, 1986 y Barany y Merrifield, Gross y Meienhofer, 1979. Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden sintetizar también mediante tecnología de fase sólida que emplea un sintetizador de péptidos ejemplar tal como un Model 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier péptido dado; generado mediante síntesis de péptidos automatizada o mediante métodos recombinantes se puede determinar utilizando análisis de HPLC de fase reversa. La autenticidad química de cada péptido se puede establecer por cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica. Como una alternativa a la síntesis de péptidos automatizada, se puede emplear la tecnología de DNA recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de elección se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión como se describe a continuación. Se prefieren especialmente los métodos recombinantes para producir péptidos más largos (polipéptidos).

Métodos para obtener una población de células T reguladoras

La presente memoria descriptiva describe un método *in vitro* o *ex vivo* para generar una población de Tregs CD8⁺CD45R^{low}, que comprende una etapa de cultivar una población de Tregs CD8⁺ con un medio de cultivo que comprende un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 en presencia de una población de células dendríticas plasmacitoides.

En una realización, pDCs son pDCs maduros.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “medio de cultivo” se refiere a cualquier medio capaz de soportar el crecimiento y la diferenciación de las células T en células T reguladoras. Típicamente, consiste en un medio base

que contiene nutrientes (una fuente de carbono, aminoácidos), un tampón de pH y sales, que se pueden suplementar con factores de crecimiento y/o antibióticos. Típicamente, el medio base puede ser un medio RPMI 1640, DMEM, IMDM, X-VIVO o AIM-V, todos los cuales son medios estándar disponibles comercialmente.

5 Las formulaciones de medios preferidos que apoyarán el crecimiento y la diferenciación de las células T vírgenes en células T reguladoras incluyen medios químicamente definidos (CDM). Como se utiliza en la presente memoria, el término "medio químicamente definido" (CDM) se refiere a una disolución nutritiva para el cultivo de células que contiene solo componentes específicos, preferiblemente componentes de estructura química conocida. Un medio químicamente definido es un medio libre de suero y un medio libre de alimentador.

10 La etapa de cultivar una población de Tregs CD8⁺ con el péptido descrito en la presente memoria en presencia de una población de pDCs se llevará a cabo durante el tiempo necesario requerido para la presentación de dicho péptido por los pDCs a las Tregs CD8⁺.

Típicamente, el cultivo de una población de Tregs CD8⁺ con el péptido descrito en la presente memoria en presencia de una población de pDCs se llevará a cabo desde 1 día a 1 semana o más.

15 En una realización particular, el método puede comprender una etapa adicional de aislamiento de la población de células T reguladoras así generadas.

Composiciones farmacéuticas:

Un agente terapéutico descrito en la presente memoria como se describió anteriormente se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tal como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas.

20 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inconveniente cuando se administran a un mamífero, especialmente a un humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno sólido no-tóxico, semi-sólido o líquido, diluyente, material de encapsulado o formulación auxiliar de cualquier tipo.

25 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden formular para administración tópica, oral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular disoluciones salinas, isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

35 Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar como una función de varios parámetros, y en particular como una función del modo de administración utilizado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un
40 amplio rango desde 0,01 hasta 1000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto que se va a tratar. Un medicamento contiene típicamente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de
45 0,0002 mg/Kg a aproximadamente 20 mg/Kg de peso corporal por día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/Kg hasta 7 mg/Kg de peso corporal por día.

Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad efectiva de un polipéptido descrito en la presente memoria se puede disolver o dispersar en un vehículo farmacéuticamente aceptable o un medio acuoso.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones incluyendo aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o como sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, hidróxido amónico, de calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

El vehículo puede ser también un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y anti fúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, mono estearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado a vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución estéril filtrada previamente del mismo.

También se contempla la preparación de disoluciones más, o altamente concentradas para la inyección directa, donde el uso de DMSO como disolvente se prevé que dé como resultado una penetración extremadamente rápida, entregando altas concentraciones de los agentes activos en un área pequeña.

Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones son fácilmente administradas en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se puede tamponar adecuadamente y el diluyente líquido se volvió primero isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, el medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podía disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, pág. 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación tendrá lugar necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que se va a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, pastillas y otros sólidos para la administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

Métodos terapéuticos y sus usos:

En la presente memoria se describen métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para su uso en la inducción de tolerancia inmune en un paciente que lo necesite.

En la presente memoria se describen métodos y composiciones para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente que lo necesite.

En la presente memoria se describe un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso como fármaco.

En la presente memoria se describe un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso en la inducción de la tolerancia en un paciente que lo necesite.

En la presente memoria se describe un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso en la prevención o reducción del rechazo del trasplante en un paciente que lo necesite.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “tolerancia inmune” se refiere a un estado de falta de respuesta del sistema inmune a sustancias o tejidos que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune. Los péptidos descritos en la presente memoria son útiles para lograr la tolerancia o tolerancia parcial frente al trasplante tras el trasplante de dicho trasplante. Como se utiliza en la presente memoria, “una tolerancia parcial” es una tolerancia inmune parcial que da como resultado una respuesta inmune reducida.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término “respuesta inmune” incluye la respuesta inmune mediada por células T y/o mediada por células B. Ejemplos de respuestas inmunes incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citoquina y citotoxicidad celular, además, el término respuesta inmune incluye respuestas inmunes que están indirectamente afectadas por la activación de células T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humerales) y la activación de células sensibles a citoquinas, por ejemplo, macrófagos. Células inmunes implicadas en la respuesta inmune incluyen linfocitos, tales como células B y células T (células CD4⁺, CD8⁺, Th1 y Th2); células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células presentadoras de antígenos profesionales tales como células dendríticas); células asesinas naturales; células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos, y granulocitos.

15 Por ejemplo, las respuestas inmunes están implicadas en el rechazo del trasplante, así como en el resultado fisiológico concomitante de dichas respuestas inmunes tales como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis de injerto crónica o vasculitis.

20 En consecuencia, los pacientes tratados con un péptido descrito en la presente memoria en comparación con los pacientes no tratados, muestran las siguientes características fisiológicas: a) una disminución del nivel de respuesta inmune frente al trasplante (se cree que está mediado, al menos en parte, por las respuestas inmunes mediadas por células B, más particularmente anticuerpos específicos de donantes); b) un retraso en la aparición o progresión de una respuesta inmune contra el trasplante; o c) un menor riesgo de la aparición o progresión de una respuesta inmune contra el trasplante.

25 Por “paciente en necesidad del mismo” se entiende un individuo que sufre o es susceptible de sufrir rechazo de trasplante para ser tratado. Los individuos que se van a tratar en el marco descrito en la presente memoria son mamíferos, preferiblemente seres humanos.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término “prevenir o reducir el rechazo de trasplante” se entiende que abarca la prevención o inhibición del rechazo del trasplante inmune, así como el retraso del inicio o de la progresión del rechazo del trasplante inmune. El término también pretende abarcar la prolongación de la supervivencia de un trasplante en un paciente, o la reversión del fracaso de un trasplante en un paciente. Además, el término también pretende abarcar la mejora de un síntoma de un rechazo del trasplante inmune, que incluye, por ejemplo, mejorar una complicación inmunológica asociada con el rechazo inmune como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis de injerto crónica o vasculitis.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término “rechazo de trasplante” abarca el rechazo agudo y crónico de trasplantes. Un “rechazo agudo” es el rechazo por parte del sistema inmune de un receptor de trasplante de tejido cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente extraño. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del tejido trasplantado por las células inmunes del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido trasplantado. La aparición del rechazo agudo es rápida y generalmente se produce en humanos unas pocas semanas después de la cirugía de trasplante. Generalmente, el rechazo agudo se puede inhibir o suprimir con fármacos inmunosupresores tales como rapamicina, ciclosporina y similares. Un “rechazo crónico” se produce generalmente en humanos dentro de varios meses o años después del injerto, incluso en presencia de inmunosupresión exitosa del rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos.

40 El término “trasplante” y variaciones del mismo se refiere a la inserción de un trasplante (también llamado injerto) en un receptor, si el trasplante es singénico (donde el donante y el receptor son genéticamente idénticos), alogénico (donde el donante y el receptor son de orígenes genéticos diferentes, pero de las mismas especies), o xenogénico (donde el donante y receptor son de especies diferentes). Así, en un escenario típico, el huésped es un humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un humano de los mismos o diferentes orígenes genéticos. En otro escenario, el injerto se deriva de una especie diferente de aquella en la que se trasplanta, incluidos los animales de especies filogenéticamente ampliamente separadas, por ejemplo, un corazón de babuino que se trasplanta a un huésped humano.

50 En una realización el donante del trasplante es un humano. El donante del trasplante puede ser un donante vivo o un donante fallecido, a saber, un donante cadavérico.

En una realización, el trasplante es un órgano, un tejido o células.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “órgano” se refiere a un órgano vascularizado sólido que realiza una función específica o un grupo de funciones dentro de un organismo. El término órgano incluye, pero no se limita a, corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, piel, útero, hueso, cartílago, intestino delgado o grueso, vejiga, cerebro, mama, vasos sanguíneos, esófago, trompa de Falopio, vesícula biliar, ovarios, páncreas, próstata, placenta, médula espinal, extremidades incluyendo superior e inferior, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra, útero. Como se utiliza en la presente memoria, el término “tejido” se refiere a cualquier tipo de tejido en humanos o animales, e incluye, pero no se limita a, tejido vascular, tejido de la piel, tejido hepático, tejido pancreático, tejido neural, tejido urogenital, tejido gastrointestinal, tejido esquelético incluyendo huesos y cartílagos, tejido adiposo, tejido conectivo incluyendo tendones y ligamentos, tejido amniótico, tejido coriónico, duramadre, pericardio, tejido muscular, tejido glandular, tejido facial, tejido oftálmico.

En una realización particular descrita en la presente memoria, el trasplante es un alotrasplante cardíaco.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “células” se refiere a una composición enriquecida para células de interés, preferiblemente una composición que comprende al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 65% de dichas células.

En ciertas realizaciones las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas multipotentes derivadas de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical; o pluripotentes (es decir, células madre embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPS)) o células diferenciadas derivadas de células madre multipotentes de diferentes linajes celulares como cardiomiocitos, células beta-pancreáticas, hepatocitos, neuronas, etc...

En una realización, la composición celular se utiliza para el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT) y, por lo tanto, comprende células madre hematopoyéticas multipotentes, generalmente derivadas de la médula ósea, la sangre periférica o la sangre del cordón umbilical.

Las HSCT pueden ser curativas para pacientes con leucemia y linfomas. Sin embargo, una importante limitación de la HCT alogénica es el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), que se produce en forma severa en aproximadamente el 30-50% de los humanos que reciben esta terapia.

Los péptidos descritos en la presente memoria son útiles en la inducción de la tolerancia inmune y por lo tanto en la prevención o reducción de la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

En consecuencia, en una realización, el paciente que lo necesita se ve afectado con una enfermedad seleccionada del grupo formado por leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfóide aguda (ALL); leucemia mieloide crónica (CML); síndrome de mielodisplasia (MDS) / síndrome mieloproliferativa; linfomas tales como los linfomas de Hodgkin y non-Hodgkin, leucemia linfática crónica (CLL) y mieloma múltiple.

La presente descripción se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente descripción.

Figuras

Figura 1: Análisis de la activación de las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en respuesta de la estimulación del péptido derivado del donante. (A) Las Tregs CD8⁺ se co-cultivaron durante 6 días con pDCs maduras con CpG singénicos en presencia de péptidos. Para cada experimento, el porcentaje de Tregs CD25 positivas después de 6 días de cocultivo con pDCs solamente, recibió el valor 1. El valor medio 1 es igual a 32,85 ± 1,98%. Los resultados se expresaron como la relación ± SEM entre el porcentaje de células CD25 positivas después de la estimulación del péptido y el porcentaje de células CD25 positivas en la condición de control sin péptido. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 frente a la condición de control (valor 1,0). n= 4 a 18 para cada péptido. (B) Análisis de la activación de Treg en respuesta a derivados peptídicos más cortos Du51. En la izquierda, se detallan 18 derivados de Du51 y clasifican para una longitud de secuencia de aminoácidos, de 9 aminoácidos a 15 aminoácidos. El cuadro resalta los aminoácidos que no coinciden entre el donante y el receptor. En la derecha, la activación de Treg en respuesta a los derivados Du51 se analizaron mediante la expresión de CD25. Las Tregs CD8⁺ se cocultivaron durante 6 días con pDCs maduras con CpG singénicas en presencia de cada péptido. Las barras representan la relación entre el porcentaje de células CD25 positivas después de la estimulación peptídica y el porcentaje de células CD25 positivas en las condiciones de control sin péptido. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 frente a la condición de Du51. n= 3 a 14 para cada péptido.

Figura 2: Potencial supresor *in vitro* e *in vivo* de Tregs CD40lgCD8⁺ específicas de Du51. (A) La proliferación de células T CD4⁺CD25⁺ LEW.1A marcadas con CFSE vírgenes (vía directa) o el receptor cargado con aloantígenos LEW.1A (vía indirecta). pDCs se analizaron después de 6 días de cultivo, en ausencia o presencia de Tregs CD8⁺CD40lg tetrámero⁻ o tetrámero⁺, total, de LEW.1A vírgenes en una relación 1:1 efector:supresor. La proliferación de las células T CD4⁺CD25⁺ solo fue de ~80% y se le dio el valor 100 en cada experimento. Los gráficos

representan la media $\pm$ SEM de la proliferación de las células T CD4⁺CD25⁻ relativa. * $p < 0,05$. $n = 4$. (B) $2,5 \times 10^6$ Tregs CD8⁺CD40lg total o tetrámero⁻ se inyectaron intravenosamente en receptores irradiados subletalmente (LEW.1A) el día anterior al alotrasplante cardíaco (LEW.1W). La supervivencia del injerto se evaluó mediante palpación abdominal de los latidos cardíacos. $p < 0,01$ para Tregs CD8⁺CD40lg total ($n = 4$) frente a Tregs CD8⁺CD40lg tetrámero⁻ ($n = 3$).

Figura 3: inducción de la tolerancia después de la infusión del péptido Du51 *in vivo*. (A) Los receptores fueron no tratados ($n = 9$), tratados con 5 inyecciones únicas intravenosas de 0,5 mg de péptido a los días -6, -3 pre-injerto, día 0, +3 y +7 post-injerto ($n = 4$), o tratado con infusión continua de péptido mediante mini bombas osmóticas i.p (ALZET), administrando desde el día 7 y durante 28 días, ya sea 20,83 $\mu\text{g/hora}$ solo (Du51 0,5 mg/día: $n = 8$) o combinado con un mAb anti-CD8 agotador (OX8) ($n = 6$) o un mAb anti-MHC de clase I (OX18) ($n = 5$), o 40,66 $\mu\text{g/hora}$ en la combinación de cepas LEW.1W/LEW.1A (Du51 1 mg/día: $n = 5$) o BN/LEW.1A (Du51 1 mg/día (BN/1A): $n = 4$). ** $p < 0,01$ 0,5 mg/día de Du51 frente a animales no tratados y péptido de control 0,5 mg/día. * $p < 0,05$ 0,5 mg/día de Du51 + mAb anti-CD8 agotadora frente a 0,5 mg/día de Du51. *** $p < 0,001$ 1 mg/día de Du51 frente a animales no tratados. ** $p < 0,01$ 1 mg/día de Du51 frente a 1 mg/día de Du51 en una combinación BN/1A. * $p < 0,05$ 1 mg/día de Du51 frente a 0,5 mg/día de Du51. (B) La producción de aloanticuerpos se evaluó en animales vírgenes ($n = 3$), singénicos injertados ($n = 3$), injertados sin tratar ($n = 3$), tratado con CD40lg ($n = 3$), tratado con Du51 a largo plazo ($n = 2$) y tratado con Du51 rechazado ($n = 4$). Los sueros se recogieron < 30 días después del rechazo o > 120 días después del trasplante. Los sueros se incubaron con esplenocitos de donantes y se analizaron por citometría de flujo para la producción de Abs de IgG, IgG1, IgG2a o IgG2b. Los gráficos representan MFI $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (C) Los bazos se recuperaron después del rechazo o en el día 120 y las poblaciones de células se tiñeron y analizaron por citometría de flujo. Los gráficos representan el número absoluto de cada subpoblación en el bazo total o ($n = 12$), tratado con Du51 a largo plazo ($n = 2$) o receptores tratados con Du51 rechazado ($n = 5$). (D) Bazo de receptores vírgenes ($n = 4$), tratados con Du51 a largo plazo ($n = 2$) o tratados con Du51 rechazado ($n = 4$) se incubaron con tetrámeros de RT1.A^u/Du51 marcados con estreptavidina conjugada con PE y APC. Los resultados se representan en los gráficos para el porcentaje de células de tetrámero⁺ entre Tregs CD8⁺ y el número absoluto de Tregs CD8⁺ tetrámero⁺ en el bazo $\pm$ SEM.

Figura 4: Transferencia de tolerancia mediada por esplenocitos después de la monoterapia con péptido Du51. A. Los receptores LEW.1A fueron irradiados (4,5 Gy) subletalmente en el día -1 y recibieron aloinjertos cardíacos e inyecciones intravenosas de $1,5 \cdot 10^8$ esplenocitos de receptores supervivientes o animales vírgenes al día 0. La supervivencia del injerto se monitorizó mediante palpación abdominal. B. La producción de aloanticuerpos IgG se evaluó en receptores no tratados, vírgenes ($n = 3$), que habían rechazado su injerto ($n = 3$) y primeros receptores de transferencia spl a largo plazo más de 120 días después del trasplante.

Ejemplo: El alopéptido MHCII⁺ induce tolerancia

Material y métodos

Modelos de animales y trasplantes cardíacos: Los alotrasplantes de corazón se llevaron a cabo entre ratas macho LEW.1W (RT1.A^u como donantes) incompatibles con MHC enteras y ratas machos LEW.1A (RT1.A^a como receptores) como se describió anteriormente (5). Los experimentos fueron aprobados por el comité ético regional para la experimentación con animales.

Transferencia de genes mediada por adenovirus: El Ad que codifica la porción extracelular de CD40 de ratón unido a los dominios constantes de IgG1 humana (AdCD40lg) y el adenovirus recombinante no codificante (Ad) Add1324, así como el procedimiento de administración del intrainjerto, se han descrito previamente (5). Brevemente, se inyectaron lentamente partículas adenovirales ($2 \cdot 10^{10}$ partículas infecciosas) en 3 puntos en las paredes ventriculares cardíacas.

Bibliotecas de péptidos: Se diseñaron bibliotecas de péptidos superpuestos de 16-mer con 4 aminoácidos de recubrimiento para cubrir las secuencias polimórficas completas de MHC-I RT1.A^u (dominios alfa 1, 2 y 3), MHC-II RT1.B^u (todos los dominios) y MHC-II RT1.D^u (dominios alfa 2 y beta 1) como se publicó previamente (17-19) y fabricado por GL Biochem Ltd (Shanghai, China). Los péptidos liofilizados se disolvieron en 0,4% de DMSO estéril/agua estéril y se almacenaron a -80°C . Como péptidos de control, utilizamos *in vitro* varios péptido alogénicos no activantes #7, 26 y 39 e *in vivo*, utilizamos el péptido #31.

Los péptidos superpuestos de 9 a 15-mer degenerados con 1 a 2 aminoácidos de recubrimiento se diseñaron para cubrir la secuencia del péptido de 16-mer aislado positivamente y sintetizado por GL Biochem Ltd (Shanghai, China).

Se demostró mediante HPLC analítico de fase reversa que todos los péptidos eran $> 95\%$ homogéneos y se confirmó la secuencia de aminoácidos. Los péptido se diluyeron en RMPI-1640 completo a una concentración de 120 $\mu\text{g/ml}$.

Purificación de las células: Las células T se purificaron como se describió previamente (6). Brevemente, los esplenocitos totales se empobrecieron con una mezcla de células T anti- $\gamma\delta$ (V65), células anti-CD45RA (OX33), células NK anti-CD161 (3.2.3) y monocitos anti-CD11b/c (OX42) utilizando perlas magnéticas (Dyna). Las células T enriquecidas se macaron con anti-CD45-RC-biotina (OX22) y estreptavidina-PE-Cy7, anti-CD8 α -PE (OX8), anti-

TCR $\alpha\beta$ -Alexa 647 (R73) y anti-CD25-FITC (OX39) mAbs. Las células T CD8⁺CD45RC^{low} y las células T CD4⁺CD25⁻ se clasificaron después de la activación de las células TCR $\alpha\beta$ ⁺ con FACSaria (BD Biosciences, Mountain View, CA). La pureza de las poblaciones clasificadas fue mayor del 99%.

- Las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) se purificaron como se describió previamente (6). Brevemente, los esplenocitos recuperados después de la digestión con collagenasa se purificaron adicionalmente mediante empobrecimiento negativo con células T anti-TCR (R73 y V65) y células B anti-CD45RA (OX33) mAbs. Las células enriquecidas se marcaron con anti-CD45R-PE (His24), anti-CD4-APC (OX35), anti-TCR-FITC (R73) y anti-CD45RA-FITC (OX33). Las pDCs, definidas como células CD45R y CD4 positivas, se clasificaron después de la activación en células FITC negativas.
- 10 Reacción linfocitaria mixta: Para los ensayos de cocultivo de MLR, pDCs de LEW.1A de ratas vírgenes ($1,25 \times 10^4$ células), Tregs CD8⁺CD40lg singénicas (5×10^4 células) y 120 $\mu\text{g/ml}$ de péptidos alogénicos se colocaron por triplicado en 200 μl de medio de RPMI-1640 completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 6 días a 37°C, 5% de CO₂. Las pDCs se maduraron con 0,5 μM de CpG ODN 1826.
- 15 Para ensayos de supresión directa de MLR, las células T CD4⁺CD25⁻ marcadas con CFSE de origen LEW.1A (5×10^4 células) y pDCs alogénicas aisladas de LEW.1W clasificadas de animales donantes ($1,25 \times 10^4$ células) se sembraron por triplicado durante 6 días en un volumen final del 200 μl de medio de RPMI-1640 completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo con células Treg CD8⁺CD45RC^{low} vírgenes recién purificadas clasificadas con FACS, células Treg CD8⁺CD40lg expandidas con péptidos (5×10^4 células), Tregs CD8⁺CD40lg DU51 tetramero+ o -. Para ensayos de supresión indirecta de MLR, los esplenocitos aislados de LEW.1W de animales donantes se congelará-descongelarán para inducir la apoptosis. Las células apoptóticas se cultivaron después durante una noche con pDCs aisladas de LEW.1A de animales receptores (proporción 8:1) a $0,65 \times 10^6$ pDCs/mL. pDCs cargado con aloantígenos se lavaron finalmente y se sembraron como se describió anteriormente para el MLR directo.
- 20 Para estimulaciones de anti-CD3/anti-CD28, placas de 96 pocillos de fondo redondo se recubrieron con anti-CD3 (1 $\mu\text{g/mL}$, BD Pharmingen) y anti-CD28 (10 $\mu\text{g/mL}$) mAbs durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂, después se lavaron y se añadieron $5 \cdot 10^4$ células Treg CD8⁺CD40lg a cada pocillo en 200 μL de RPMI-1640 completo durante 1, 2, 3 y 6 días.
- 25 La proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ vírgenes marcadas con CFSE y fenotipo de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA) después de la activación de las células TCR⁺CD4⁺ o TCR⁺CD8⁺ entre las células vivas (DAPI negativo).
- 30 Tinción extracelular e intracelular: Para la tinción extracelular, las células se tiñeron con las siguientes mAbs: anti-TCR $\alpha\beta$ (R73, Alexa Fluor 647-conjugado), anti-CD8 α (OX8, PE-Cy7-conjugado, ebiosciences), anti-CD4 (W3,25, PE-Cy7-conjugado), anti-CD45RC (OX22, FITC-conjugado), anti-CD28 (JJ319, marcado con biotina), anti-CD71 (OX26, marcado con biotina), Vb11 anti-ratón (KT11, marcado con biotina, AbD Serotec) anti-CD25 (OX39, marcado con biotina) y anti-MHC-II (OX6, marcado con biotina).
- 35 Para la tinción intracelular, las células se tiñeron después para Foxp3 (marcado con biotina, ebiosciences) utilizando el conjunto BD citofix/citoperm (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante.
- Todas las mAbs biotiniladas se visualizaron utilizando estreptavidina-PerCP.Cy5.5 (BD Biosciences). Se utilizó un citofluorímetro FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA) para medir la fluorescencia, y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Inc. USA, versión 7.6.5). Las células se clasificaron por su morfología y las células muertas se excluyeron mediante la selección de las células viables negativas DAPI.
- 40 Ensayos de citoquina: IFN- γ , IL-10 se midieron en los sobrenadantes de cocultivos utilizando ELISA de BD Biosciences OptEIA, IL-12 y TGF β utilizando ELISA de Invitrogen y R&D System respectivamente.
- 45 Producción de complejos RT1-A^a-péptido biotinilado: Brevemente, RT1-A^a de cadena pesada y la β 2microglobulina (β 2m) se clonaron en pET24 y se produjo en Escherichia coli BL21-DE3. Las proteínas recombinantes se produjeron como cuerpos de inclusión, disueltas en urea 8M y se replegaron *in vitro* como se describió previamente para complejos HLA-A2/péptido humanos (61). RT1-A^a, β 2m y el péptido Du51 se replegaron en L-arginina 0,4M, Tris 0,1M pH8, EDTA 2mM, glutatión reducido 5mM, y glutatión oxidado 0,5 mM durante 5 días a 4°C. La disolución se concentró después y el tampón cambió en la membrana de amicon 10 Kd (Millipore, Bedford, MA). Los complejos MHC/péptido replegado se biotinilaron con la enzima BirA (Avidity, Denvers CO) durante 5 horas a 30°C y se desalaron en una columna de desalación Hiprep 26/10 (GE Healthcare). Los complejos MHC/péptido se purificaron después mediante cromatografía de intercambio de anión de Q-sefarsa. La biotinilación se probó por tetramerización con estreptavidina (Sigma Aldrich) a una relación molar de 4:1.
- 50 Tetramerización y tinción: La tetramerización de RT1.A^a/Du51 se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante la adición de estreptavidina-PE (Jackson ImmunoResearch) o estreptavidina-APC (BD Biosciences) a una relación molar de 4:1, en cuatro alícuotas iguales añadidas a intervalos de 15 minutos. Igualmente, el tetramero de control RT1.A^a/MTF-E (ILFPSSERLISNR) se conjugó con streptavidina-BV421 (Biolegend) y representó el 1,6+/-0,7% de la tinción no específica entre las células específicas de Du51. Estos tres reactivos se mezclaron y se añadieron a células cultivadas a 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 1 hora a 4°C. Las células se tiñeron adicionalmente para CD8 y CD45RC y la
- 55

fluorescencia se analizó en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA). Las células se clasificaron primero por su morfología y las células muertas se excluyeron mediante la selección de células negativas DAPI.

Tratamiento de los péptidos *in vivo*: Los péptidos de 16-mer se disolvieron en 0,4% de DMSO/PBS antes de la inyección. Para el primer protocolo, dosis únicas del péptido (500 µg/inyección) se inyectaron intravenosamente a diferentes puntos de tiempo antes y después del trasplante a los días -6, -3, 0, +3 y +7 en receptores LEW.1A injertados. En el segundo protocolo, mini bombas osmóticas (ALZET, Cupertino, CA, USA) se implantaron por vía intraperitoneal (i.p) en receptores y se administraron de manera continua 20,83 o 41,66 µg/hora de péptidos de 16-mer durante 14 días. Una primera bomba se implantó en el día -7 antes del trasplante y se reemplazó por una segunda en el día +7, permitiendo administrar de 14 a 28 mg de péptido por animal durante 28 días consecutivos. Se inyectó un mAb anti-CD8α reductor (OX8, IgG1, 3 mg/Kg) o un mAb anti-MHC de clase Ia y Ib (OX18, 3 mg/Kg) i.p. dos veces una semana desde el día -7 hasta el rechazo. Los aloinjertos se monitorizaron diariamente mediante palpación y el rechazo del aloinjerto se definió como el cese completo del latido cardíaco palpable.

Transferencia celular adoptiva: Las transferencias celulares se realizaron mediante inyección intravenosa de Tregs purificadas totales clasificadas o CD8⁺CD40lg tetrámero⁻ de Du51 en receptores LEW.1A subletalmente irradiados (irradiación de 4,5 Gy de cuerpo entero) en el día antes del trasplante. Los esplenocitos totales ($1,5 \cdot 10^8$ células) se transfirieron adoptivamente de manera intravenosa el día antes del trasplante de corazón en receptores LEW-1A vírgenes que han recibido irradiación de 4,5 Gy de cuerpo entero el mismo día. Los receptores recibieron esplenocitos de las ratas tratadas con Du51 (definido como primer spl transferido) o de ratas vírgenes (spl-transferido virgen) o sin células (irradiado no tratado).

Análisis morfométrico del injerto cardíaco: El tercio superior del injerto se fijó en paraformaldehído y se embebió en parafina. Secciones coronales de cinco µm se tiñeron con hematoxilina-eosina-safrón. Los tejidos se analizaron por un patólogo (K.R.) que desconocía los grupos y el rechazo crónico se evaluó como se describió anteriormente (63).

Detección de aloanticuerpos específicos del donante: Los aloanticuerpos se analizaron por citofluorimetría como se describió en otra parte (28). Brevemente, después de la digestión con colagenasa D y la lisis de glóbulos rojos, las células alogénicas del bazo se incubaron con suero inactivado por calor diluido (1/8), y después con anticuerpos IgG anti-rata de cabra conjugados con FITC (cadena específica H + L) (Jackson Laboratories), MAb de IgG1 anti-rata de ratón (MCA 194, Serotec), IgG2a (MCA 278, Serotec) o IgG2b (MCA 195, Serotec). La unión de anticuerpos se reveló utilizando IgG anti-ratón de cabra F(ab)² acoplado con FITC (Jackson Laboratories). Las células se analizaron utilizando un citofluorímetro FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA) y los resultados se expresaron como fluorescencia de canal medio para cada suero.

Análisis estadístico: Para el ensayo de activación del péptido, se hizo una prueba de rango de signo de Wilcoxon, que compara la mediana de la columna a un valor hipotético de 1,0. La significancia estadística para la expresión TCR de Vβ11, fenotipo de células activadas, expresión de citoquina, ensayo de proliferación y tinción del tetrámero se evaluó mediante el ensayo Mann Whitney de doble cola. La supervivencia del injerto se analizó mediante el ensayo log-rank de Kaplan-Meier. El ensayo ANOVA de dos vías y el ensayo posterior de Bonferroni se utilizaron para el análisis de anticuerpos específicos del donante y la caracterización fenotípica de esplenocitos. Los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism 5.04 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para el análisis de diversidad, Kruskal-Wallis y la prueba múltiple de comparación de Dunn se realizaron utilizando GraphPad Prism 6.0c. Un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo.

Resultados

Activación de Tregs CD8⁺CD40lg *in vitro*.

Para identificar el reconocimiento de TCR de los complejos alogénicos de MHC/péptido por las Tregs CD8⁺CD40lg y la posterior activación de su función, tuvimos que seleccionar un marcador específico de activación que permita el análisis por citometría de flujo después de la exposición a la estimulación antigénica. Por lo tanto, seleccionamos moléculas expresadas en diferentes puntos de tiempo por las Tregs CD8⁺CD40lg tras la estimulación con anticuerpos policlonales anti-CD3 y anti-CD28.

La expresión de moléculas en Tregs CD8⁺CD40lg recién aisladas ha sido previamente evaluada por Q RT-PCR (5) y demostrada que, entre estas moléculas, CD25 e IFNγ eran marcadores que distinguían las Tregs CD8⁺CD40lg de otras poblaciones celulares. Analizamos mediante citometría de flujo a los días 0, 1, 2, 3 y 6 su expresión de CD71, CD25 y IFNγ.

Confirmamos, a día 0, que las Tregs CD8⁺CD40lg expresaban bajos niveles de CD71 ($0,83 \pm 0,1\%$), CD25 ($12,74 \pm 6,1\%$), e IFNγ ($5,57 \pm 3,3\%$). Después de la estimulación policlonal, la expresión de CD71, CD25 e IFNγ aumentó significativamente desde el primer día y se mantuvo estable en el tiempo con respectivamente $82 \pm 4,5\%$, $98,1 \pm 1,9\%$ y $91,7 \pm 7\%$ de células positivas a día 6.

En conclusión, identificamos tres marcadores de interés a las Tregs CD8⁺CD40lg con baja expresión basal y regulación positiva significativa tras la estimulación. Dado que CD25 fue el marcador con regulación positiva mayor y

más temprano y dado que fue un marcador previamente descrito por nosotros y otros (5, 12), seleccionamos este marcador para evaluar la activación de las Tregs CD8⁺CD40lg para los aspectos restantes de este estudio.

Células Tregs CD8⁺CD40lg reconocieron dos péptidos derivados de MHC de clase II de donantes.

En el modelo de aloinjerto cardíaco no compatible con MHC de rata, los donantes (RT1^u) y los receptores (RT1^a) no coinciden para todas las moléculas de MHC. Por lo tanto, alineamos las secuencias de aminoácidos (aa) de MHC I y II de donantes y receptores y diseñamos 82 péptidos de 16-mer superpuestos que coinciden con los dominios polimórficos de las moléculas de MHC I y II de donantes (17-19). Los péptidos se agruparon primero en grupos de 6 a 8 péptidos (30 µg/ml de cada péptido) y se probó en un ensayo *in vitro* donde las pDCs receptoras singénicas inmaduras o maduras y las Tregs CD8⁺CD40lg clasificadas de receptores con aloinjerto a largo plazo tratados con CD40lg se cocultivaron durante 3 o 6 días. Con pDCs inmaduras, no observamos activación significativa de las Tregs CD8⁺CD40lg al día 3 o al día 6 con cualquiera de los grupos de péptidos alogénicos. Después de la estimulación con pDCs maduras y grupos de péptidos alogénicos observamos al día 3 una ligera regulación positiva de la expresión de CD25 de una pequeña población de Tregs CD8⁺CD40lg, y al día 6, una significativa regulación positiva de la expresión de CD25 después de la estimulación alogénica. Estos resultados sugirieron que algunos péptidos alogénicos fueron eficazmente reconocidos por las Tregs CD8⁺CD40lg y que este reconocimiento condujo a una mayor expresión de CD25. También demostró que las pDCs deben ser maduras en nuestro ensayo.

Luego probamos la capacidad estimuladora de los 82 alopéptidos individuales en presencia de pDCs singénicos maduros vírgenes y las Tregs CD8⁺CD40lg se purificaron de sobrevivientes a largo plazo en un cultivo de 6 días (Figura 1A). Observamos que dos péptidos inducían una regulación positiva altamente significativa de la expresión de CD25 en la superficie celular de las Tregs CD8⁺CD40lg: péptido #31 (llamado Bu31, 1,67±0,09 veces frente a sin péptido, p<0,0001), cuya secuencia se superpone con la secuencia del péptido #32 (p<0,05), y el péptido #51 (llamado Du51, 2,07±0,18 veces frente a sin péptido, p<0,001). Du51 indujo una regulación positiva más fuerte de la expresión de CD25 comparado con Bu31, lo que sugiere que Du51 es el péptido dominante reconocido por las Tregs CD8⁺CD40lg, mientras que Bu31 es sub-dominante. Estos resultados demostraron que las Tregs CD8⁺CD40lg específicas de antígeno reconocieron principalmente dos péptidos, Bu31 (YLRYSDDVGEYRAVTE) y Du51 (NREEYARFSDVGEYR), derivados respectivamente de la cadena β1 de las moléculas RT1.B^u y RT1.D^u del MHC donante de clase II.

Las Tregs CD8⁺CD40lg reconocieron un péptido alogénico de 15-mer inusualmente largo.

Para determinar la secuencia del péptido donante dominante natural reconocido por las Tregs CD8⁺CD40lg específicas de antígeno, utilizamos una biblioteca de péptidos degenerados, que varían desde péptidos de 9-mer con un aminoácido recubierto a péptidos de 15-mer con dos o más aminoácidos recubiertos derivados de Du51 dominante de 16-mer (marcado #51-1 a #51-18) (Figura 1B y Tabla 1). Este diseño de biblioteca se basó en resultados previos e informes publicados (20-23) y se probó en el mismo ensayo *in vitro* descrito anteriormente. Curiosamente, las bibliotecas de péptidos aleatorias han establecido que las moléculas RT1-A^a de MHC de clase I de rata mostraron una fuerte preferencia por péptidos de 9 a 15 mer que llevan una arginina (R) en el extremo C (23).

Tabla 1: Lista de péptidos utilizados en el presente estudio:

Nombre	Secuencia	Longitud (aminoácidos)	SEQ ID NO:
Du51	NREEYARFSDVGEYR	16	2
51-1	NREEYARFD	9	11
51-2	REEYARFDS	9	12
51-3	EEYARFSD	9	13
51-4	EYARFSDV	9	14
51-5	YARFSDVGE	9	15
51-6	ARFSDVGE	9	16
51-7	RFSDVGEY	9	17
51-8	FDSDVGEYR	9	18
51-9	YARFSDVGE	10	19

51-10	EYARFDSVDVG	10	20
51-11	EYARFDSVDGE	11	21
51-12	YARFDSVDGEY	11	22
51-13	YARFDSVDGEYR	12	23
51-14	EYARFDSVDGEY	12	24
51-15	EEYARFDSVDGE	12	25
51-16	EEYARFDSVDGEY	13	26
51-17	EEYARFDSVDGEYR	14	27
51-18	REEYARFDSVDGEYR	15	1

Ninguno de los péptidos derivados #51-1 a #51-8 de 9-mer fue capaz de inducir la activación de las Tregs CD8⁺CD40lg equivalente a la observada con el Du51 de 16-mer. Sin embargo, fuimos capaces de inducir una regulación positiva mucho más fuerte y significativa de CD25 con el péptido derivado de 15-mer (51-18) (2,04±0,3 veces frente a sin péptido) que le falta la asparagina (N) en el extremo de N. A diferencia de otros derivados, la regulación positiva de CD25 inducida por el péptido #51-18 no fue significativamente diferente de la inducida por Du51 (Figura 1B).

En conjunto, estos resultados mostraron que un péptido natural de 15-mer derivado de MHC de clase II dominante (REEYARFDSVDGEYR) se presentó a las Tregs CD8⁺CD40lg y que dicha presentación indujo la activación de las células específicas.

Las células Tregs CD8⁺CD40lg activadas por Du51 mostraron un fenotipo modificado y suprimieron eficazmente las células T activadas específicas de antígenos.

El fenotipo de las Tregs CD8⁺CD40lg activadas por Du51 se analizó 6 días después de la estimulación. Previamente demostramos que las Tregs CD8⁺CD40lg actuaban a través de la secreción de altos niveles de IFN γ , que a su vez inducían la expresión de IDO por DCs y las ECs de injerto y esta acción fue necesaria para la inducción de tolerancia *in vivo* (5). Según estos resultados, observamos que la estimulación de las Tregs CD8⁺ por el péptido en presencia de pDCs condujo a un aumento significativo de la expresión de IFN γ , muy probablemente por las Tregs CD8⁺CD40lg activadas. En el mismo sobrenadante del cultivo, observamos una disminución de la producción de IL-12, probablemente de origen pDC, pero ninguna modificación de la expresión de IL-10 y TGF β que podría producir tanto las Tregs CD8⁺CD40lg como los pDCs. También observamos una regulación positiva de CD71, CD28 y MHC de clase II, pero ninguna modificación de la expresión de Foxp3 después de 6 días de la estimulación peptídica.

Previamente demostramos que las Tregs CD8⁺CD40lg, en presencia de pDCs alogénicas o pDC singénica y un lisado de células donantes, podían suprimir la proliferación de las células CD4⁺CD25⁻ efectoras singénicas, lo que muestra que las Tregs CD8⁺CD40lg actúan a través de la vía directa e indirecta de aloreconocimiento, y que son células supresoras más eficientes que las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} vírgenes (6). Aquí, investigamos si las Tregs CD8⁺CD40lg estimuladas por Du51 podían suprimir eficazmente la proliferación de células T efectoras después de 6 días de cocultivo y mantener así su actividad supresora, en comparación con las Tregs CD8⁺CD40lg estimuladas con un péptido de control no activante. Llevamos a cabo un ensayo MLR estimulando las Tregs CD8⁺CD40lg durante 6 días en presencia de pDCs singénicos y Du51 o péptidos no activantes. Las Tregs CD8⁺CD40lg estimuladas con péptidos se clasificaron después utilizando FACS Aria y se añadieron en un ensayo MLR directo de pDCs alogénicos clasificados y células T efectoras CD4⁺CD25⁻ marcadas con CFSE singénico. Planteamos la hipótesis de que las Tregs CD8⁺CD40lg expandidas ejercerían una regulación espectadora de la proliferación de las células T CD4⁺CD25⁻ efectoras estimuladas por la vía de aloreconocimiento directo, que se midió 6 días después (24, 25). En ausencia de las Tregs, el 80,5% de las células T efectoras CD4⁺CD25⁻ proliferaron. La adición de Tregs estimuladas con Du51 dio como resultado una inhibición significativa de la proliferación de las células T efectoras en comparación con las Tregs estimuladas por péptidos no activantes. Así, las Tregs CD8⁺CD40lg específicas de antígeno Du51 mantuvieron una actividad supresora eficiente después de la activación *in vitro* y las Tregs que permanecieron sin estimular durante 6 días perdieron su actividad supresora y comenzaron a morir por negligencia.

La identificación de las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} específicas de Du51 utilizando el tetrámero de MHC de clase I reveló su enriquecimiento en receptores tratados con CD40lg.

Un desafío importante en el trasplante sigue siendo la identificación de las Tregs específicas de antígeno, ya que representan una población supresora más potente y hasta ahora se han identificado muy pocos epítomos naturales. Además, hasta la fecha, en la configuración de ratas y trasplantes, no había herramientas disponibles para visualizar

y detectar directamente las poblaciones de Tregs CD8⁺ específicas de antígenos. Con ese fin, generamos un tetramero de MHC de clase I RT1.A³/Du51 que se marcó con ficoeritrina (PE) y alofocianina (APC) y tiñó poblaciones específicas en el bazo e injerto.

Las células se tiñeron primero con una mezcla de tetrameros RT1.A³/Du51 conjugados con PE y conjugados con APC, junto con un tetramero de control RT1.A³/MTF-E marcado con BV421. Esta estrategia de doble fluorocromo, descrita previamente para las células T efectoras CD8⁺ específicas de antígeno, permite la discriminación de la tinción de la señal y el ruido, como Tregs CD8⁺ específicas se unirán igualmente a cada versión de tetramero de RT1.A³/Du51 mientras que los elementos aleatorios no (26). Entre los sucesos teñidos positivos dobles, las células no específicas de péptidos pueden visualizarse y excluirse a medida que se unen a un tetramero de control que lleva la misma cadena pesada RT1.A³ pero con un péptido irrelevante asociado. Las células se tiñeron secundariamente con CD8-PeCy7 y CD45RC-FITC para identificar las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} o las células T CD8⁺CD45RC^{high}. Con dicha estrategia, pudimos identificar 2,19±0,6% en el bazo y 1,16±0,25% en el injerto de las células específicas de Du51 entre las Tregs CD8⁺CD40Ig. En la población de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} esplénicas vírgenes, evaluamos la frecuencia precursora a 0,73±0,2%, demostrando que incluso 120 días después del trasplante y tratamiento con CD40Ig, la frecuencia aumentó todavía alrededor de 3 veces y qué en animales vírgenes, fuimos capaces de identificar un conjunto de Tregs específicas de donantes. Esta diferencia era cierta cuando se observaba el porcentaje y el número absoluto de Tregs CD8⁺CD40Ig positivas de tetramero o células T CD8⁺CD45RC^{low} vírgenes en el bazo (0,624±0,128 frente a 0,173±0,071 respectivamente para el porcentaje y 623800±127700 frente a 172600±70500 para el número absoluto en el bazo, p<0,05). Hubo también significativamente más células específicas de Du51 entre las Tregs CD8⁺CD40Ig que entre las células T CD8⁺CD45RC^{high} de animales tratados con CD40Ig o vírgenes, en término del porcentaje de células positivas entre cada población y el porcentaje o número absoluto en el bazo total, y el porcentaje en el injerto. No hubo diferencia entre las células T CD8⁺CD45RC^{low} y CD8⁺CD45RC^{high} de animales vírgenes en el bazo. Curiosamente, las células positivas de tetramero se localizaron tanto en el injerto como en el bazo dentro del subconjunto CD8^{high} de las Tregs CD8⁺CD45RC^{low}.

En conjunto, estos resultados demostraron que fuimos capaces de generar un tetramero RT1A³/Du51 funcional para detectar Tregs CD8⁺ específicas de aloantígenos, una población que aumentó significativamente tras el trasplante y el tratamiento con CD40Ig.

Capacidad supresora superior de las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} específicas de Du51 mediada por las vías directa e indirecta de aloreconocimiento y requerimiento para la inducción de la tolerancia *in vivo*.

Demostramos previamente la capacidad supresora de las Tregs CD8⁺CD40Ig estimuladas con Du51. En este experimento, queríamos estudiar la capacidad supresora de las Tregs CD8⁺CD40Ig específicas del tetramero RT1A³/Du51 recién clasificado (Figura 2A). Las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} vírgenes, las Tregs CD8⁺CD40Ig totales, las Tregs CD8⁺CD40Ig del tetramero RT1A³/Du51 negativo (tet⁻) y del tetramero RT1A³/Du51 positivo (tet⁺) se clasificaron e incubaron durante 6 días con pDCs alógenicos (vía directa) o pDCs singénicos cargados con aloantígenos (vía indirecta) y células T CD4⁺CD25⁻ singénicas marcadas con CFSE vírgenes. En este ensayo, las Tregs CD8⁺CD40Ig específicas del tetramero RT1A³/Du51 se activaron mediante la unión del tetramero (datos no mostrados y (27)). Como se describió previamente, las Tregs CD8⁺CD40Ig totales suprimían más eficazmente la proliferación de las células T CD4⁺CD25⁻ efectoras inducidas tanto por la vía directa como indirecta de presentación del aloantígeno que las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} vírgenes (Figura 2A). Curiosamente, observamos una diferencia significativa entre el potencial supresor de las Tregs CD8⁺CD40Ig del tet⁺ frente al tet⁻ mediado por la vía directa de aloreconocimiento, siendo las Tregs CD8⁺CD40Ig de tet⁺ el subconjunto celular supresor más potente (Figura 2A). Aunque no es significativo, pero con una tendencia estadística (p=0,0571), se obtuvo la misma diferencia con respecto a la vía de presentación indirecta del aloantígeno (Figura 2A). Además, la supresión de la proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ se logró más eficazmente con Tregs específicas de Du51 cuando se induce por vía de presentación de aloantígeno indirecta, en lugar de directa. Curiosamente, las Tregs CD8⁺CD40Ig del tet⁻ no específicas tienden a ser menos supresoras que las Tregs CD8⁺CD40Ig totales, destacando la importante contribución de las Tregs CD8⁺ específicas de Du51 en la capacidad supresora general del conjunto de Tregs CD40Ig totales. Estos resultados sugirieron que las Tregs CD8⁺ específicas del antígeno Du51 son la subpoblación de Treg más eficaz del conjunto de Tregs CD8⁺CD40Ig total.

Para estudiar la relevancia *in vivo* del efecto supresor diferencial *ex vivo* observado para las Tregs CD8⁺CD40Ig específicas de Du51, llevamos a cabo experimentos de transferencia celular adoptiva. Las Tregs CD8⁺CD40Ig totales o Tregs CD8⁺CD40Ig del tetramero negativo (tet⁻) RT1A³/Du51, se clasificaron y transfirieron de manera adoptiva en receptores irradiados injertados vírgenes (Figura 2B). A diferencia de las Tregs CD8⁺CD40Ig totales, las Tregs CD8⁺CD40Ig de tet⁻ (que se agotaron en células específicas del antígeno Du51) fueron incapaces de inhibir el rechazo del aloinjerto, lo que demuestra el papel crucial de las Tregs CD8⁺CD40Ig específicas de antígeno en la actividad tolerogénica del conjunto total de Tregs CD8⁺CD40Ig que previene el rechazo del aloinjerto y promueve la tolerancia infecciosa.

La inducción de la tolerancia mediante el tratamiento con péptidos *in vivo* se correlacionó con una mayor proporción de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} y la inhibición total de las respuestas de anticuerpos anti-donantes.

Para determinar aún más el potencial del péptido inmuno-dominante identificado en la generación *in vivo* de las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} y en la supervivencia del aloinjerto, los animales se trataron por separado utilizando dos protocolos diferentes de administración de péptidos sin ningún otro tratamiento. En el primero, los animales recibieron cinco inyecciones intravenosas (i.v) de 500 µg de péptido (Figura 3A). Observamos que las inyecciones del péptido de control o de Du51 no fueron suficiente para inducir una prolongación significativa de la supervivencia del aloinjerto (respectivamente, 11 y 9,5 días, n=4) (Figura 3A). En el segundo, para mejorar la eficacia del tratamiento, y porque dichos pequeños péptidos se eliminan rápidamente del cuerpo del receptor, probamos mini bombas osmóticas con un suministro intra-peritoneal constante de 20,8 µg de péptido por hora durante 28 días, comenzando el día -7 antes del trasplante. Curiosamente, este protocolo permitió una prolongación significativa de la supervivencia del aloinjerto (p<0,01 en comparación con el péptido de control y el no tratado) con un 25% de supervivencia del aloinjerto indefinida utilizando Du51 en comparación con el péptido de control (Figura 3A). Para probar que la tolerancia inducida por la infusión del péptido era dependiente de las células T CD8⁺ y de la presentación de MHC de clase I, co-tratamos el receptor con una infusión de péptido y co-tratamos al receptor con una infusión de péptidos y un mAb anti-CD8 (OX8) o un mAb anti-MHC de clase I (OX18) de bloqueo (Figura 3A) como se describió previamente (5). La administración de ambos anticuerpos abolió por completo la supervivencia del aloinjerto, lo que indica que se requería el reconocimiento de las MHC de clase I/antígeno por las células T CD8⁺ en el establecimiento de la tolerancia obtenida por infusión de péptidos.

Curiosamente, la dosis aumentada de Du51 administrada mediante una bomba osmótica que suministra 41,6 µg de péptido por hora indujo una supervivencia indefinida del aloinjerto en el 80% de los receptores de corazones donantes de Lewis 1W (LEW.1W) (Figura 3A). Sin embargo, los injertos de un tercio de Brown Norway (BN) fueron rápidamente rechazados el día 7 después del trasplante (Figura 3A), lo que demuestra que la infusión del péptido Du51 induce tolerancia específica donadora mediada por las Tregs CD8⁺.

Se analizaron los corazones y bazo injertados de receptores de rechazo o supervivencia a largo plazo tratados con el péptido Du51 en busca de signos de rechazo crónico, presencia de anticuerpos anti-donantes, proporción de Tregs totales y Tregs CD8⁺CD45RC^{low} de tetrámero positivo, y la supresión *in vitro* hacia las células T efectoras CD4⁺ (Figuras 3B, C, D). El análisis anatomopatológico del injerto de receptores a largo plazo no mostró signos de rechazo crónico según una puntuación previamente establecida (28). Además, observamos una tendencia a un aumento en el porcentaje y el número absoluto de células T CD8⁺ totales, en particular Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en el bazo (Figura 3C), así como Tregs específicas del tetrámero positivo Du51 (Figura 3D) en receptores tratados con el péptido Du51 sobreviviente a largo plazo en comparación con receptores no tratados o receptores tratados con Du51 que rechazaron su injerto temprano. Estos resultados sugieren que las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} fueron inducidas/amplificadas por el tratamiento con el péptido *in vivo*, mientras otros subconjuntos no lo fueron, y podían ser responsables de la inducción de la tolerancia. Confirmamos que estas Tregs CD8⁺CD45RC^{low} activadas inducidas por el péptido mostraron actividad supresora *ex vivo* ya que inhiben eficazmente la proliferación de células T CD4⁺ efectoras de la misma manera que las Tregs CD8⁺CD40Ig recién purificadas. Finalmente, observamos una inhibición total de la producción de aloanticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b en receptores tratados con Du51 sobreviviente a largo tiempo en comparación con ratas no tratadas o receptores tratados con Du51 que rechazaron su injerto temprano, que podía correlacionarse con la ausencia de rechazo crónico (28) (Figura 3B).

Tolerancia infecciosa después de la monoterapia con Du51.

Para evaluar el potencial supresor dominante de las células reguladoras inducidas implicadas en la supervivencia del aloinjerto a largo plazo generado por 1 mg/día de tratamiento *in vivo* con el péptido Du51. Para hacerlo, llevamos a cabo experimentos de transferencia celular adoptiva utilizando esplénocitos de receptores de larga duración en receptores injertados vírgenes subletalmente irradiados, como hemos hecho antes (5) (Figura 4A). La primera transferencia adoptiva de 150.10⁶ esplénocitos en receptores injertados irradiados ingenuos secundarios dio como resultado una prolongación significativa de la supervivencia del aloinjerto del 50% de los receptores, demostrando la inducción de las células reguladoras dominantes capaces de inhibir el rechazo del aloinjerto en receptores irradiados recientemente injertados. Investigamos el estado anatomopatológico del injerto de los primeros receptores de esplénocitos a largo plazo transferidos adoptivamente y se observó una ausencia completa de lesiones y obstrucciones vasculares (es decir, sin signos de rechazo crónico). Finalmente, observamos una total inhibición de la producción de aloanticuerpos totales IgG, IgG1 e IgG2b en los primeros receptores transferidos adoptivamente sobrevivientes a largo plazo en comparación con ratas no tratadas que muestran una elevada producción de aloanticuerpos y comparable a las ratas vírgenes, que podía correlacionarse con la ausencia de rechazo crónico (28) (Figura 4B).

Discusión

Nuestro conocimiento actual sobre cómo las Tregs reconocen los péptidos y el papel de este reconocimiento es muy limitado y se basa principalmente en modelos de ratones transgénicos que utilizan la transferencia de genes TCR de Treg CD4⁺ (8, 11) o en las Tregs CD8⁺ restringidas a Qa-1 murinas implicadas en enfermedades autoinmunes y cáncer y cuyo repertorio de Qa-1-péptido se ha descrito en los últimos años (29). Sin embargo, estos estudios sugieren que las Tregs específicas de antígenos influyen de manera crucial en el resultado del trasplante a largo plazo y contribuyen al establecimiento de la tolerancia (30). Estudios recientes han caracterizado péptidos reconocidos por las Tregs CD8⁺ durante el cáncer (un péptido derivado de la hemo oxigenasa-1), autoinmunidad

(péptido derivado de V β) o incluso embarazo (péptido derivado del antígeno minoritario) pero no durante el trasplante (2). El trasplante es un entorno particular para identificar el antígeno reconocidos por la Tregs, ya que la presencia del injerto es una fuente continua de aloantígenos, que sin duda es esencial para la función y el mantenimiento de las poblaciones reguladoras y, por lo tanto, para la supervivencia del órgano injertado (31). El reconocimiento de los aloantígenos en el contexto de la regulación, nosotros y otros hemos demostrado que ocurre principalmente por la vía indirecta de presentación, y en particular con el apoyo de las pDCs (6, 30, 32).

En este informe, demostramos por primera vez que las Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, a través de la vía indirecta de presentación, puede reconocer un alopéptido dominante, llamado Du51, (y un subdominio) derivado del dominio β 1 de las moléculas del donante natural de MHC de clase II. Estos péptidos comparten el 80-90% de homología con las moléculas humanas HLA de clase II y, por lo tanto, se podían utilizar para detectar las Tregs CD8⁺ específicas en humanos. Por el uso de un tetrámero específico de MHC-I, mostramos que las Tregs CD8⁺CD45RC^{low} específicas de Du51 se enriquecieron en receptores sobrevivientes a largo plazo tratados con CD40lg, expresaron una cadena V β 11 restringida parcial, mostraron una fuerte actividad supresora *ex-vivo* y jugaron un papel crucial en la inducción de la tolerancia tras la transferencia adoptiva. Finalmente, se demostró que el péptido Du51 inducía la prolongación de la supervivencia del aloinjerto *in vivo*, induciendo las Tregs CD8⁺ específicas del donante.

Aquí, describimos que el péptido Du51 mostró una inusual longitud de 15 aminoácidos y que péptidos más cortos probados no pudieron inducir un reconocimiento significativo por las Tregs CD8⁺CD40lg. La mayoría de la literatura se ha centrado en péptidos cortos (8-10 aminoácidos) unidos a MHC de clase I, aunque se sabe que el 5-10% de los péptidos son péptidos más largos (más de 10 aminoácidos) que pueden ser presentados por moléculas MHC de clase I (33, 34). Hasta el momento, dichos péptidos se han identificado para modelos CTL y se derivan principalmente de antígenos virales. A nuestro entender, proporcionamos la primera descripción de un péptido de 15 aminoácidos que puede ser estructuralmente reconocido por las Tregs CD8⁺, como se muestra con nuestros tetrámeros RT1A^a/Du51. Estudios recientes sugirieron que estos péptidos largos conducen a un reconocimiento TCR más centrado en el péptido (35) y que los TCR reconocen péptidos de MHC de clase I de una longitud preferencial (36). Se sabe que la molécula de MHC de clase I de rata RT1A^a se adapta a péptidos particularmente largos, con residuos de posición clave como Gln, Met o Leu en P2, Phe en P3, Pro en P4 y Arg en el extremo C (21, 22). Speir *et al.* han demostrado previamente en un modelo de antígeno de histocompatibilidad menor transmitido por la madre (MTF-E) de 13 restos que los restos de anclaje importantes (en particular, la arginina en la posición 13 (P13)) permitieron la unión con una conformación abultada considerable (37). También observamos que Du51 mostraba una Arg en el extremo C-terminal y, por lo tanto, podía ayudar para la acomodación de RT1A^a del péptido. Curiosamente, algunos de los péptidos que probamos fueron también probados por Ballet *et al.* en células T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas de animales no tratados rechazados (incluyendo el péptido dominante Du51) en el mismo modelo de aloinjerto cardíaco no coincidente (LEW.1W a LEW.1A) que nosotros (18). Ellos encontraron dos péptidos inmunodominantes, nombrados por nosotros como péptido #47 y péptido #55, todos derivados de moléculas LEW.1W de RT1D^u, implicadas en el rechazo agudo de injertos de los receptores LEW.1A no modificados. De manera importante, el péptido Du51 no estaba implicado en el rechazo agudo en su modelo y los dos péptidos inmunodominantes identificados por Ballet *et al.* no fueron reconocidos por nuestras Tregs CD8⁺CD40lg, lo que sugiere que las Tregs y las no-Tregs no reconocen los mismos antígenos.

Pudimos producir un tetrámero RT1A^a/Du51, que además de ser una herramienta valiosa para realizar un seguimiento de las células específicas de antígeno, se puede utilizar también para determinar la especificidad y afinidad fina de TCR. Con este tetrámero, identificamos en animales vírgenes un conjunto de precursores de Tregs específicos de antígenos de ~0,73%, que se expandió alrededor de tres veces en 120 días después del trasplante y el tratamiento con CD40lg. Esta frecuencia precursora se correlacionó con las observaciones de Leavenworth *et al.* realizadas en un modelo de artritis en ratones donde analizaron la aparición de las Tregs CD8⁺ específicas del tetrámero Qa-1-Hsp60_{p216} y Qa-1.R72A-Qdm y describieron una frecuencia virgen de respectivamente ~1,65% y 0,46% de las células T CD8⁺ positivas para cada una (38). Estas observaciones sugirieron que la frecuencia precursora de las células específicas de antígeno en una población de Treg debía ser superior que la frecuencia de células T no Treg de un determinado antígeno reactivo.

Mediante el uso de este tetrámero de MHC-I, comparamos la capacidad supresora de las Tregs CD8⁺CD40lg específicas y no específicas de Du51 *ex vivo* en un ensayo de cocultivo e *in vivo* a través de la transferencia adoptiva de las Tregs CD8⁺CD40lg de tetrámero⁻ (empobrecido en Tregs CD8⁺CD40lg de tetrámero⁺). Demostramos *ex vivo* el potencial supresor superior de las Tregs CD8⁺CD40lg del tetrámero⁺ sobre el tetrámero⁻, que inhibe significativamente la proliferación de las células T efectoras CD4⁺ estimuladas tanto por la vía directa como indirecta de presentación, y más eficientemente en el entorno del aloreconocimiento indirecto. Estos resultados están de acuerdo con varios estudios que demuestran el potencial supresor superior de las Tregs de especificidad indirecta *in vitro* (39, 40). *In vivo*, observamos un rápido rechazo del aloinjerto en receptores irradiados injertados vírgenes transferidos con las Tregs CD8⁺CD40lg de tetrámero⁻ en comparación con los receptores transferidos de manera adoptiva con las Tregs CD8⁺CD40lg totales. En una manera similar, la transferencia adoptiva de las Tregs CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ de tet⁻ (empobrecido en las Tregs específicas del tetrámero Qa-1/Hsp60_{p216}) no pudo evitar el desarrollo de artritis autoinmune en un modelo de ratón (38). También, Tsang *et al.* mostraron un papel crucial de las Tregs CD4⁺ de aloespecificidad indirecta en la tolerancia del trasplante, demostrando que solo la transferencia adoptiva de las Tregs CD4⁺ transducidas con TCR de especificidad tanto directa como indirecta, y no solo las Tregs CD4⁺ de especificidad directa, pueden inhibir el rechazo del aloinjerto cardíaco (11).

También hemos analizado diferentes marcadores expresados potencialmente por células T reguladoras específicas de antígeno. Foxp3 no parece ser un marcador interesante de las Tregs CD8⁺CD40lg no estimuladas o estimuladas con péptido, aunque después de varias rondas de estimulación fuerte con anti-CD3/anti-CD28/IL-2, fuimos capaces de detectar niveles sustanciales de Foxp3 (datos no mostrados). Encontramos también una mayor producción de IFN γ y una menor expresión de IL-12 después de la estimulación específica de péptido. IFN γ ya fue mostrado por nosotros como una citoquina crucial en nuestro modelo (6).

Con respecto al repertorio de las Tregs CD8⁺CD40lg inducidas, mostramos previamente que estas células utilizaron preferentemente un TCR que recombinó la cadena V β 11 y mostró un CDR3 β de 9 aminoácidos en el bazo, sugiriendo la expansión de una población oligoclonal de Tregs (5). Sin embargo, la secuenciación de alrededor de 700 CDR3 β en seis animales de larga supervivencia demostró que las Tregs CD8⁺CD40lg de v β 11 totales mostraban un repertorio relativamente diverso en el bazo. Sin embargo, se encontró una secuencia repetida más frecuente en algunos animales. El análisis del repertorio de TCR en el injerto reveló el predominio de dos cadenas V β de TCR: V β 11 (como en el bazo) y V β 18. A diferencia del bazo, la secuenciación reveló repertorios parciales y restringidos en ambas cadenas, con algunos clonotipos compartidos para TCR de V β 18, como en el modelo de transfusión de sangre específico de donantes para la inducción de la supervivencia del aloinjerto a largo plazo (41). Sin embargo, la secuencia pública descrita por Douillard *et al.* solo se encontró una vez en un animal de nuestro estudio y no representó el repertorio de V β 18 de nuestro modelo. Una hipótesis interesante sería que las Tregs CD8⁺CD40lg que producen dichos clonotipos parciales y restringidos fueran supresores más potente y migrase temprano en el injerto para ejercer su actividad inhibitoria, y luego permaneciesen localizados en el trasplante tolerado donde se requiera regulación inmunológica (42). En contraste, las Tregs CD8⁺CD40lg totales que residen en el bazo, pero no muestran (V β 18) o muestran menos (V β 11) repertorio restringido (y, en consecuencia, más cerca del repertorio de Tregs vírgenes) identifican potencialmente poblaciones reguladoras distintas (que posiblemente no expresan los mismos receptores de quimiocina) que son enganchadas hasta una inflamación posterior. A pesar de algunos clonotipos compartidos tanto por V β 11 como V β 18 (Supl. Tabla 1), no pudimos encontrar secuencias de CDR3 públicas. Analizando más precisamente el repertorio de las Tregs CD8⁺CD40lg específicas de antígeno en el bazo centrándose en las Tregs del tetrámero Du51⁺, demostramos una diversidad clonotípica reducida de las Tregs CD8⁺CD40lg de V β 11⁺ específicas de Du51 (en comparación con las Tregs CD8⁺CD40lg totales del bazo virgen y tratado con CD40lg y similar a las Tregs CD8⁺CD40lg del injerto), pero no de las Tregs CD8⁺CD40lg de V β 18⁺ específicas de Du51. Por lo tanto, el uso de la cadena V β 18 podría no ser óptimo para el reconocimiento de este antígeno particular. Sin embargo, incluso este análisis de la población específica del antígeno no reveló clonotipos públicos para esta población de Tregs. Las secuencias de TCR que se comparten entre los individuos tienden a producirse de manera más eficiente mediante un proceso de recombinación convergente (43) y, por lo tanto, presente a una frecuencia más alta en el repertorio de células T vírgenes (44-46). Sin embargo, las secuencias TCR inter-individualmente compartidas no son necesariamente dominantes en la respuesta inmune al antígeno (47). Este parece ser el caso de nuestro modelo, sugiriendo que este proceso puede ser modificado por mediante expansión por TCR o emparejamiento de cadena por TCR α . Publicaciones más recientes han revelado la importante contribución de la cadena alfa en el reconocimiento específico de pMHC y como la diversidad de TCR $\alpha\beta$ se tomaría en consideración, como algunos emparejamientos específicos de V α de TCR dictan y alteran la restricción de MHC (48, 49). En la literatura, se obtuvo un consenso sobre la diversidad de TCR de las Tregs CD4⁺ vírgenes que indican que más es mejor. Los autores demostraron que una diversidad de TCR alta asegura una expansión y función de las Tregs óptimas al aumentar la probabilidad de tener respuesta de los clones específicos del antígeno (13, 16, 50, 51). En nuestro modelo, las Tregs CD8⁺ vírgenes mostraron un repertorio altamente diverso que fue remodelado y sesgado por la expansión de las Tregs CD8⁺ específicas de Du51 después del trasplante y tratamiento con CD40lg.

Finalmente, desde un punto de vista terapéutico, la identificación del péptido natural reconocido por las células T reguladoras en el trasplante es un objetivo importante ya que las nuevas estrategias que utilizan las Tregs CD4⁺ amplificadas se están probando actualmente en trasplantes humanos (30, 52). La dificultad es que estas Tregs CD4⁺ humanas amplificadas en una manera policlonal mediante estímulos no específicos tales como anticuerpos anti-CD3/CD28 son menos eficaces que las Tregs específicas de antígenos (2, 53), muestran una capacidad de expansión limitada y generalmente son superadas por las células T efectoras convencionales (54). El uso de antígenos específicos para expandir las Tregs en cultivos a corto plazo seguramente mejoraría los entornos clínicos. Como prueba de principio, administramos el péptido dominante Du51 en receptores injertados vírgenes, sin tratamiento inmunosupresor, y observamos una prolongación significativa de la supervivencia del aloinjerto. Esta es la primera vez que la supervivencia extendida se pudo obtener solo con alopéptido (es decir, sin fármaco inmunosupresor) en roedores y demuestra claramente tanto la eficacia de este péptido como la implicación de la vía indirecta de presentación en la inducción de la tolerancia. Algunos estudios han descrito efectos inmunomoduladores más tempranos de péptidos derivados de HLA en respuestas aloinmunes (55). Especialmente, un péptido derivado de HLA-B7, llamado Allotrap, se demostró que prolonga la supervivencia del aloinjerto de piel y corazón cuando se asocia con la administración de ciclosporina en ratones y ratas respectivamente (56, 57). Su efecto se asoció con la modulación de la actividad de hemo-oxigenasa 1 (58). En nuestro modelo, la administración de anticuerpos de anti-CD8 o anti-MHC-I en combinación con el péptido Du51 abolió completamente la supervivencia del aloinjerto. Por lo tanto, el efecto terapéutico *in vivo* obtenido con la infusión del péptido Du51 estaba directamente relacionado con la presentación de MHC de clase I y la inducción de células T CD8⁺. Además, el péptido inmunodominante Du51 indujo una inhibición específica de donantes de respuestas aloinmunes ya que los injertos de terceros fueron rechazados

rápidamente. Además, la supervivencia del aloinjerto inducido por el péptido Du51 fue acompañado por una inhibición total de los anticuerpos anti-donantes que probablemente está relacionada con la aparición de las Tregs CD8⁺ específicas de antígeno después de la infusión del alopéptido. Este resultado es importante como muestra la potencia de las Tregs inducidas por péptido para inhibir la aparición del rechazo del aloinjerto agudo y crónico, y abre nuevas posibilidades en el trasplante humano. Además, dichas Tregs altamente supresoras expandidas podrían proporcionarnos información más fundamental sobre genes nuevos y mal descritos sobreexpresados con dichas condiciones y que podrían utilizarse como biomarcadores (6). Finalmente, podíamos asumir que la presencia de la población de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en algunos grupos de pacientes podía asociarse con un mejor pronóstico durante el curso de las enfermedades (59, 60).

En conclusión, nuestro estudio indica que el antígeno donante de MHC de clase II se puede utilizar para aumentar la generación y/o función de las Tregs CD8⁺ específicas de antígeno, y que a su vez, estas Tregs inhiben las respuestas inmunes anti-donantes que permiten el establecimiento de una verdadera tolerancia. También demostramos que las TCRs de las Tregs CD8⁺ específicas del antígeno muestran un repertorio privado y restringido que asegura una expansión eficiente y la supresión de las respuestas inmunes aloreactivas. En conjunto, estos resultados resaltan la importancia del TCR, de su interacción con el MHC/péptido y abren nuevas posibilidades en la generación de esta población que podrían ser transferibles a entornos humanos.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

1. Bluestone, J.A., Auchincloss, H., Nepom, G.T., Rotrosen, D., St Clair, E.W. y Turka, L.A. 2010. The Immune Tolerance Network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat Rev Immunol* 10:797-803.

2. Guillonnet, C., Picarda, E. y Anegón, I. 2010. CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 15:751-756.

3. Li, X.L., Menoret, S., Le Mauff, B., Angin, M. y Anegón, I. 2008. Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allotransplantation. *Transplantation* 86:10-15.

4. Guillot, C., Guillonnet, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Menoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., *et al.* 2002. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 168:1600-1609.

5. Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., *et al.* 2007. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.

6. Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., *et al.* 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185:823-833.

7. Picarda, E., Anegón, I. y Guillonnet, C. 2011. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 3:35-37.

8. Tsang, J.Y., Ratnasothy, K., Li, D., Chen, Y., Bucy, R.P., Lau, K.F., Smyth, L., Lombardi, G., Lechler, R. y Tam, P.K. 2011. The potency of allospecific Tregs cells appears to correlate with T cell receptor functional avidity. *Am J Transplant* 11:1610-1620.

9. Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P. y van Meerwijk, J.P. 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 14:88-92.

10. Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M. y Bluestone, J.A. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.

11. Tsang, J.Y., Tanriver, Y., Jiang, S., Xue, S.A., Ratnasothy, K., Chen, D., Stauss, H.J., Bucy, R.P., Lombardi, G. y Lechler, R. 2008. Conferring indirect allospecificity on CD4⁺CD25⁺ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 118:3619-3628.

12. Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I. y Lombardi, G. 2011. 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.

13. Wing, J.B. y Sakaguchi, S. 2011. TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more. *Eur J Immunol* 41:3097-3100.

14. Masteller, E.L., Tang, Q. y Bluestone, J.A. 2006. Antigen-specific regulatory T cells--ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol* 18:103-110.
15. Ohkura, N. y Sakaguchi, S. 2010. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 32:95-106.
- 5 16. Fohse, L., Suffner, J., Suhre, K., Wahl, B., Lindner, C., Lee, C.W., Schmitz, S., Haas, J.D., Lamprecht, S., Koenecke, C., *et al.* 2011. High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 41:3101-3113.
17. van Denderen, B., Peche, H., Gagne, K., Usal, C., Cuturi, M.C. y Souillou, J.P. 2001. Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur J Immunol* 31:1333-1339.
- 10 18. Ballet, C., Renaudin, K., Degauque, N., Le Mai, H., Boëffard, F., Lair, D., Berthelot, L., Feng, C., Smit, H., Usal, C., *et al.* 2008. Indirect CD4+ TH1 response, anti-donor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am J Transplant* 9:697-708.
19. Ettinger, R.A., Moustakas, A.K. y Lobaton, S.D. 2004. Open reading frame sequencing and structure-based alignment of polypeptides encoded by RT1-Bb, RT1-Ba, RT1-Db, and RT1-Da alleles. *Immunogenetics* 56:585-596.
- 15 20. Thorpe, C.J., Moss, D.S., Powis, S.J., Howard, J.C., Butcher, G.W. y Travers, P.J. 1995. An analysis of the antigen binding site of RT1.Aa suggests an allele-specific motif. *Immunogenetics* 41:329-331.
21. Powis, S.J., Young, L.L., Joly, E., Barker, P.J., Richardson, L., Brandt, R.P., Melief, C.J., Howard, J.C. y Butcher, G.W. 1996. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 4:159-165.
- 20 22. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Barker, P.J., Walden, P., Butcher, G.W. y Joly, E. 1998. Efficient generation of major histocompatibility complex class I-peptide complexes using synthetic peptide libraries. *J Biol Chem* 273:2874-2884.
23. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Walden, P. y Joly, E. 1998. Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur J Immunol* 28:1272-1279.
- 25 24. Karim, M., Feng, G., Wood, K.J. y Bushell, A.R. 2005. CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* 105:4871-4877.
25. Wan, Q., Kozhaya, L., Imberg, K., Mercer, F., Zhong, S., Krogsgaard, M. y Unutmaz, D. 2013. Probing the effector and suppressive functions of human T cell subsets using antigen-specific engineered T cell receptors. *PLoS One* 8:e56302.
- 30 26. Chattopadhyay, P.K., Melenhorst, J.J., Ladell, K., Gostick, E., Scheinberg, P., Barrett, A.J., Wooldridge, L., Roederer, M., Sewell, A.K. y Price, D.A. 2008. Techniques to improve the direct ex vivo detection of low frequency antigen-specific CD8+ T cells with peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. *Cytometry A* 73: 1001-1009.
- 35 27. Wooldridge, L., Lissina, A., Cole, D.K., van den Berg, H.A., Price, D.A. y Sewell, A.K. 2009. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology* 126:147-164.
28. Guillonau, C., Seveno, C., Dugast, A.S., Li, X.L., Renaudin, K., Haspot, F., Usal, C., Veziers, J., Anegon, I. y Vanhove, B. 2007. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 179:8164-8171.
- 40 29. Kim, H.J. y Cantor, H. 2011. Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Semin Immunol* 23:446-452.
30. Wood, K.J., Bushell, A. y Hester, J. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12:417-430.
- 45 31. Hamano, K., Rawsthorne, M.A., Bushell, A.R., Morris, P.J. y Wood, K.J. 1996. Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients. *Transplantation* 62:856-860.
32. Gokmen, M.R., Lombardi, G. y Lechler, R.I. 2008. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 20:568-574.

33. Burrows, S.R., Rossjohn, J. y McCluskey, J. 2006. Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends Immunol* 27:11-16.
34. Hickman, H.D., Luis, A.D., Buchli, R., Few, S.R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R.S., Giberson, C.F. y Hildebrand, W.H. 2004. Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J Immunol* 172:2944-2952.
35. Liu, Y.C., Chen, Z., Burrows, S.R., Purcell, A.W., McCluskey, J., Rossjohn, J. y Gras, S. 2012. The energetic basis underpinning T-cell receptor recognition of a super-bulged peptide bound to a major histocompatibility complex class I molecule. *J Biol Chem* 287:12267-12276.
36. Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole, D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., *et al.* 2013. Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* 121:1112-1123.
37. Speir, J.A., Stevens, J., Joly, E., Butcher, G.W. y Wilson, I.A. 2001. Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity* 14:81-92.
38. Leavenworth, J.W., Tang, X., Kim, H.J., Wang, X. y Cantor, H. 2013. Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8+ regulatory T cells. *J Clin Invest* 123:1382-1389.
39. Hara, M., Kingsley, C.I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S.E., Bushell, A.R., Morris, P.J., Powrie, F. y Wood, K.J. 2001. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 166:3789-3796.
40. Jiang, S., Tsang, J., Game, D.S., Stevenson, S., Lombardi, G. y Lechler, R.I. 2006. Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* 82:1738-1743.
41. Douillard, P., Pannetier, C., Josien, R., Menoret, S., Kourilsky, P., Souillou, J.P. y Cuturi, M.C. 1996. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 157:1250-1260.
42. Hayashi, Y., Tsukumo, S., Shiota, H., Kishihara, K. y Yasutomo, K. 2004. Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5240-5248.
43. Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C. y Davenport, M.P. 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* 8:231-238.
44. Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Venturi, V., Lindsay, R., Quinn, K.M., Seder, R.A., Douek, D.C., Davenport, M.P. y Price, D.A. 2010. Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19414-19419.
45. Robins, H.S., Srivastava, S.K., Campregher, P.V., Turtle, C.J., Andriesen, J., Riddell, S.R., Carlson, C.S. y Warren, E.H. 2010. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med* 2:47ra64.
46. Venturi, V., Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Ng, P.C., Ende, Z.S., McIntosh, T., Asher, T.E., Almeida, J.R., Levy, S., Price, D.A., *et al.* 2011. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J Immunol* 186:4285-4294.
47. Thomas, P.G., Handel, A., Doherty, P.C. y La Gruta, N.L. 2013. Ecological analysis of antigen-specific CTL repertoires defines the relationship between naive and immune T-cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:1839-1844.
48. Day, E.B., Guillonnet, C., Gras, S., La Gruta, N.L., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Purcell, A.W., Rossjohn, J. y Turner, S.J. 2011. Structural basis for enabling T-cell receptor diversity within biased virus-specific CD8+ T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9536-9541.
49. Turner, S.J. y Rossjohn, J. 2011. alphabeta T cell receptors come out swinging. *Immunity* 35:660-662.
50. Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.H., Relland, L.M., *et al.* 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35:109-122.
51. Adeegbe, D., Matsutani, T., Yang, J., Altman, N.H. y Malek, T.R. 2010. CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cells with limited TCR diversity in control of autoimmunity. *J Immunol* 184:56-66.
52. Safinia, N., Leech, J., Hernandez-Fuentes, M., Lechler, R. y Lombardi, G. 2013. Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin Exp Immunol* 172:158-168.

53. Renner, P., Popp, F.C., Eggenhofer, E., Slowik, P., Piso, P., Geissler, E.K., Schlitt, H.J. y Dahlke, M.H. 2010. Antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8(+)CD28(-) T cells. *Transpl Immunol* 22:144-149.
54. Tang, Q., Bluestone, J.A. y Kang, S.M. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *J Mol Cell Biol* 4:11-21.
55. Zang, W. y Murphy, B. 2005. Peptide-mediated immunosuppression. *Am J Ther* 12:592-599.
56. Buelow, R., Veyron, P., Clayberger, C., Pouletty, P. y Touraine, J.L. 1995. Prolongation of skin allograft survival in mice following administration of ALLOTRAP. *Transplantation* 59:455-460.
57. Murphy, B., Kim, K.S., Buelow, R., Sayegh, M.H. y Hancock, W.W. 1997. Synthetic MHC class I peptide prolongs cardiac survival and attenuates transplant arteriosclerosis in the Lewis→Fischer 344 model of chronic allograft rejection. *Transplantation* 64:14-19.
58. Iyer, S., Woo, J., Cornejo, M.C., Gao, L., McCoubrey, W., Maines, M. y Buelow, R. 1998. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E → V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 273:2692-2697.
59. Ordonez, L., Bernard, I., L'Faqihi-Olive, F.E., Tervaert, J.W., Damoiseaux, J. y Saoudi, A. 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* 4:e5287.
60. Ordonez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.C., Subra, J.F. y Saoudi, A. 2013. A higher risk of acute rejection of human kidney allografts can be predicted from the level of CD45RC expressed by the recipients' CD8 T cells. *PLoS One* 8:e69791.
61. Garboczi, D.N., Hung, D.T. y Wiley, D.C. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3429-3433.
62. Venturi, V., Kedzierska, K., Turner, S.J., Doherty, P.C. y Davenport, M.P. 2007. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *J Immunol Methods* 321:182-195.
63. Guillonnet, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J.M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L.A., *et al.* 2004. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 172:1619-1629.
64. Gras S, Kjer-Nielsen L, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J. 2008. T-cell receptor bias and immunity. *Curr Opin Immunol.* 20(1):119-25.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> INSERM
 UNIVERSIDAD DE NANTES
 <120> UN PÉPTIDO DONANTE AISLADO DERIVADO DE MHC Y SU USO
 <130> 13309GUILLONNEAU/AS
 10 <150> EP 14 163 081.4
 <151> 01-04-2014
 <160> 34
 <170> PatentIn versión 3.5
 15 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> péptido de 15-mer 51-18
 <400> 1
 25 Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido dominante Du51
 35 <400> 2
 Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 40 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 3
 Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg
 50 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 60 <400> 4
 Arg Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 5
 10
 Gln Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 20 <400> 6
 Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Arg
 1 5 10 15
 25 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 7
 Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg
 35 1 5 10 15
 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> NQEEYARFDSVDGEYR
 45 <400> 8
 Asn Arg Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 9
 Asn Gln Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 60

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 10
 10
 Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Arg
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-1
 20 <400> 11
 Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp
 1 5
 25 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-2
 <400> 12
 Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser
 35 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-3
 45 <400> 13
 Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-4
 55 <400> 14
 Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val
 1 5
 60 <210> 15

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-5
 <400> 15
 Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly
 10 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-6
 20 <400> 16
 Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> péptido de 9-mer 51-7
 <400> 17
 Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr
 35 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de 9-mer 51-8
 <400> 18
 45 Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5
 <210> 19
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido de 10-mer 51-9
 55 <400> 19
 Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu
 1 5 10
 60 <210> 20
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> péptido de 10-mer 51-10
 <400> 20

Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly
 1 5 10

10 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> péptido de 11-mer 51-11
 <400> 21

20 Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu
 1 5 10

25 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> péptido de 11-mer 51-12
 <400> 22

Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr
 1 5 10

35 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> péptido de 12-mer 51-13
 <400> 23

Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10

45 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> péptido de 12-mer 51-14
 <400> 24

55 Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr
 1 5 10

60 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido de 12-mer 51-15

<400> 25

5 Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu
 1 5 10

<210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> péptido de 13-mer 51-16

15 <400> 26

Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr
 1 5 10

20 <210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> péptido de 14-mer 51-17

<400> 27

Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10

30 <210> 28
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido de 40 aminoácidos derivado de una molécula MHC de clase II

40 <400> 28

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro
 20 25 30

Ser Ala Glu Tyr Arg Asn Lys Gln
 35 40

45 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18

50 <400> 29

Gln Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 30
 10
 Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg
 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 31
 Arg Glu Glu Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg
 1 5 10 15
 20
 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 32
 His Gln Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 30
 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 33
 His Gln Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 40
 <210> 34
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 34
 His Gln Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 50
 Ala Val
 55
 <210> 34
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Variante conservativa de función del péptido 51-18
 <400> 34
 His Gln Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg
 1 5 10 15
 Ala Val

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* o *ex vivo* para generar una población de Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, que comprende una etapa de cultivar una población de Tregs CD8⁺ con un medio de cultivo que comprende un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 en presencia de una población de células dendríticas plasmacitoides.
2. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso como fármaco.
3. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso en la inducción de tolerancia en un paciente que lo necesite.
4. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2 para su uso en la prevención o reducción del rechazo del trasplante en un paciente que lo necesite.

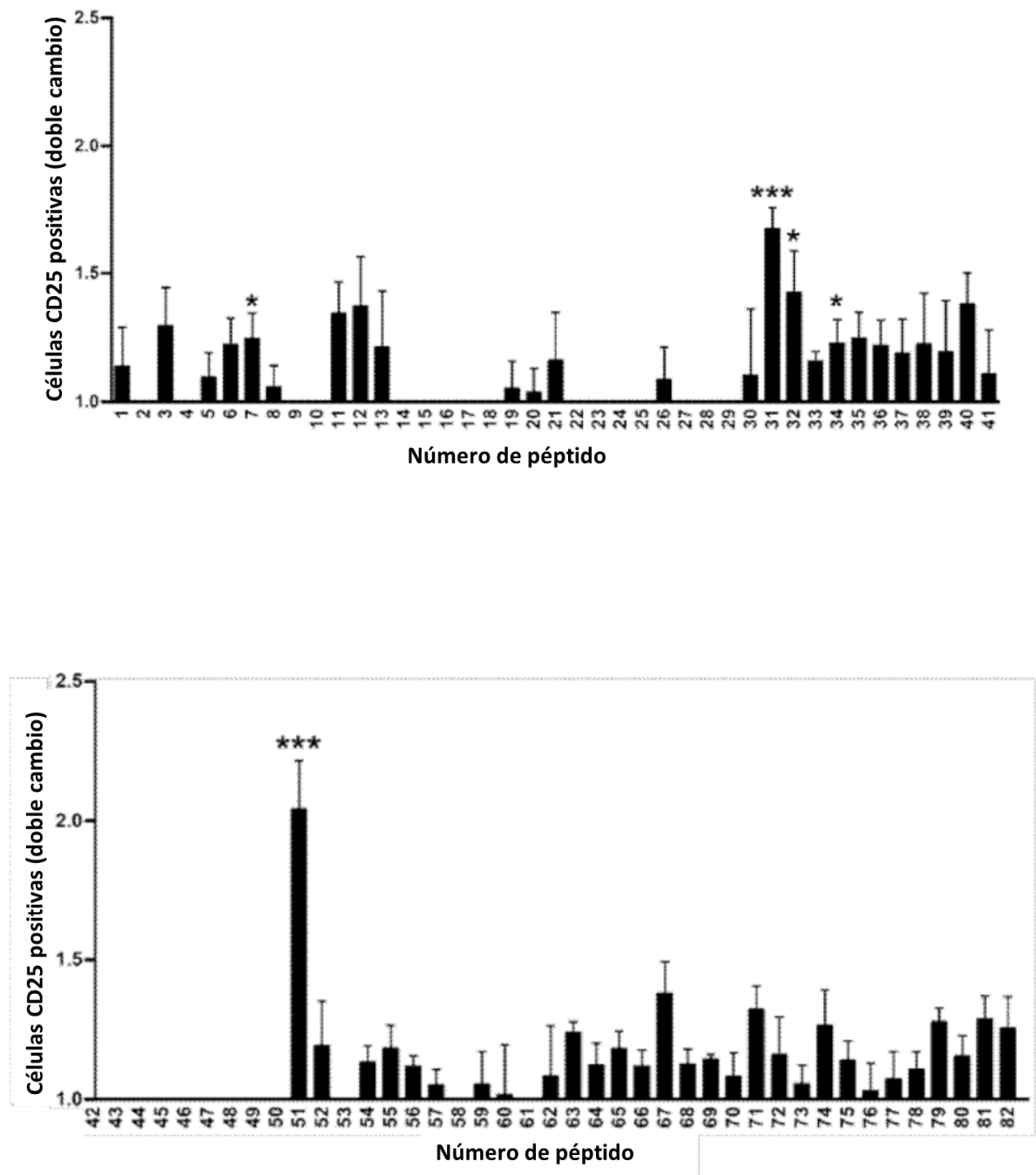


Figura 1A

Nombre	Secuencia	Longitud (aa)
Du51	N R E E Y A R F D S D V G E Y R	16
51-1	N R E E Y A R F D	9
51-2	R E E Y A R F D S	9
51-3	E E Y A R F D S D	9
51-4	E Y A R F D S D V	9
51-5	Y A R F D S D V G	9
51-6	A R F D S D V G E	9
51-7	R F D S D V G E Y	9
51-8	F D S D V G E Y R	9
51-9	Y A R F D S D V G E	10
51-10	E Y A R F D S D V G	10
51-11	E Y A R F D S D V G E	11
51-12	Y A R F D S D V G E Y	11
51-13	Y A R F D S D V G E Y R	12
51-14	E Y A R F D S D V G E Y	12
51-15	E E Y A R F D S D V G E	12
51-16	E E Y A R F D S D V G E Y	13
51-17	E E Y A R F D S D V G E Y R	14
51-18	R E E Y A R F D S D V G E Y R	15

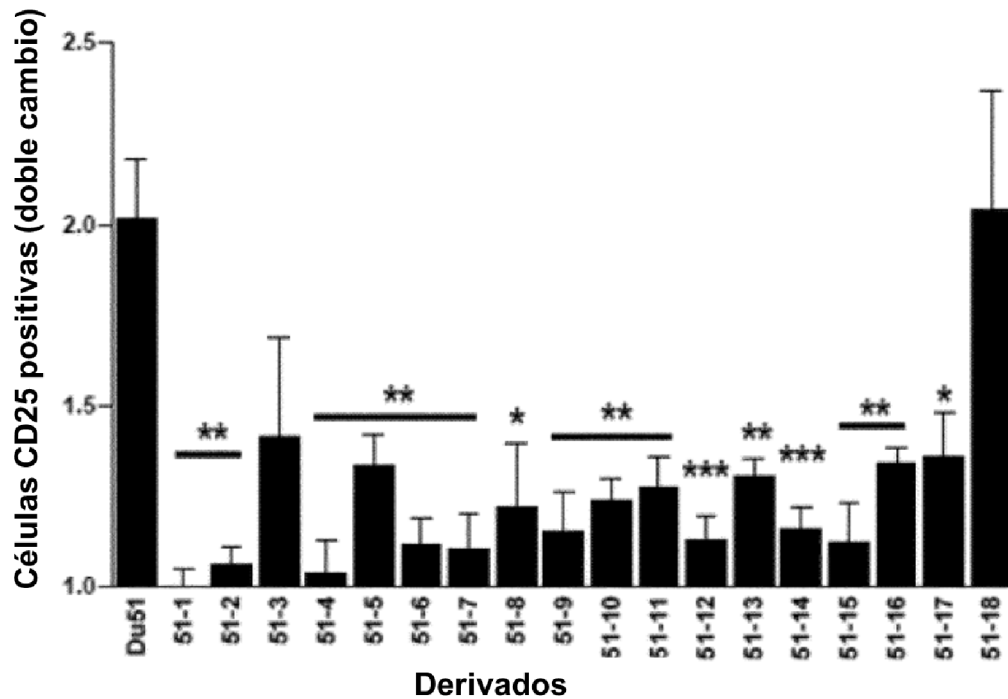


Figura 1B

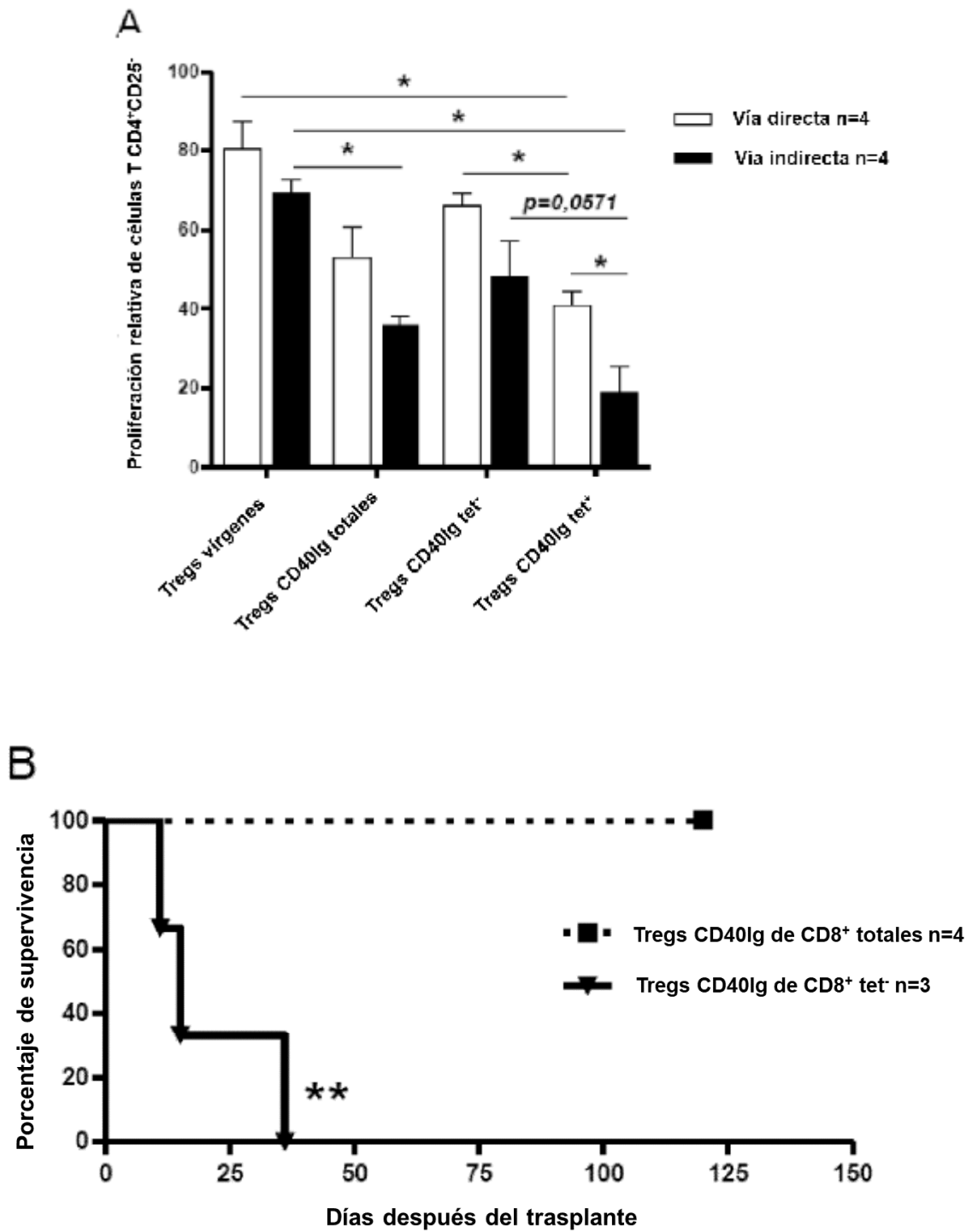


Figura 2

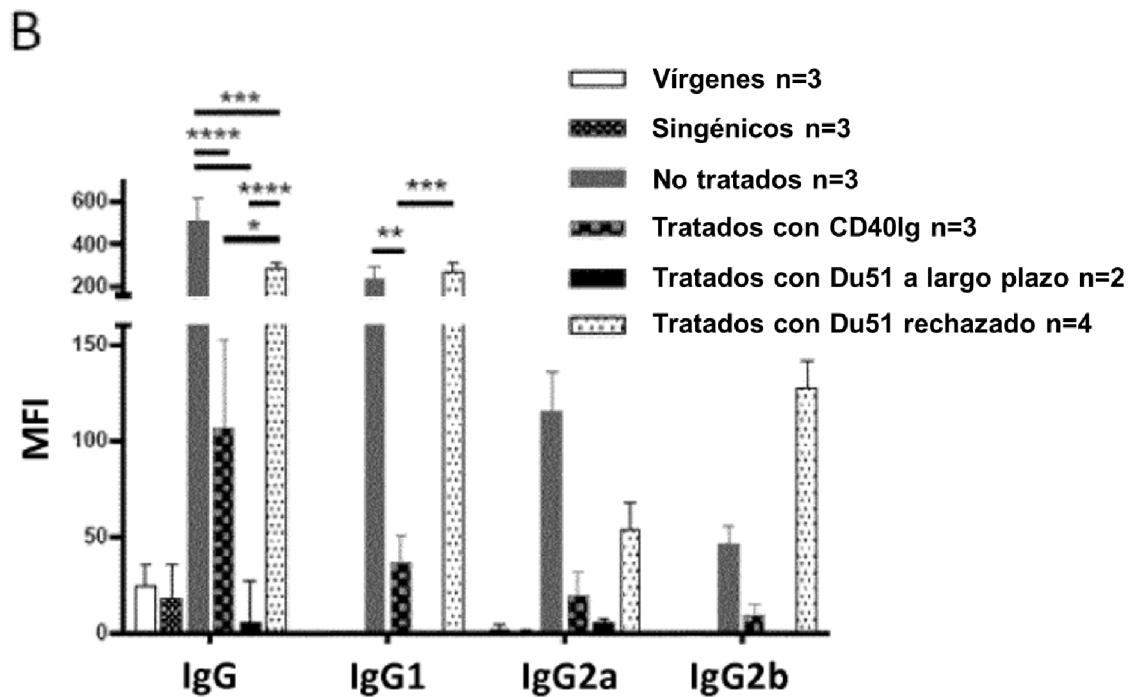
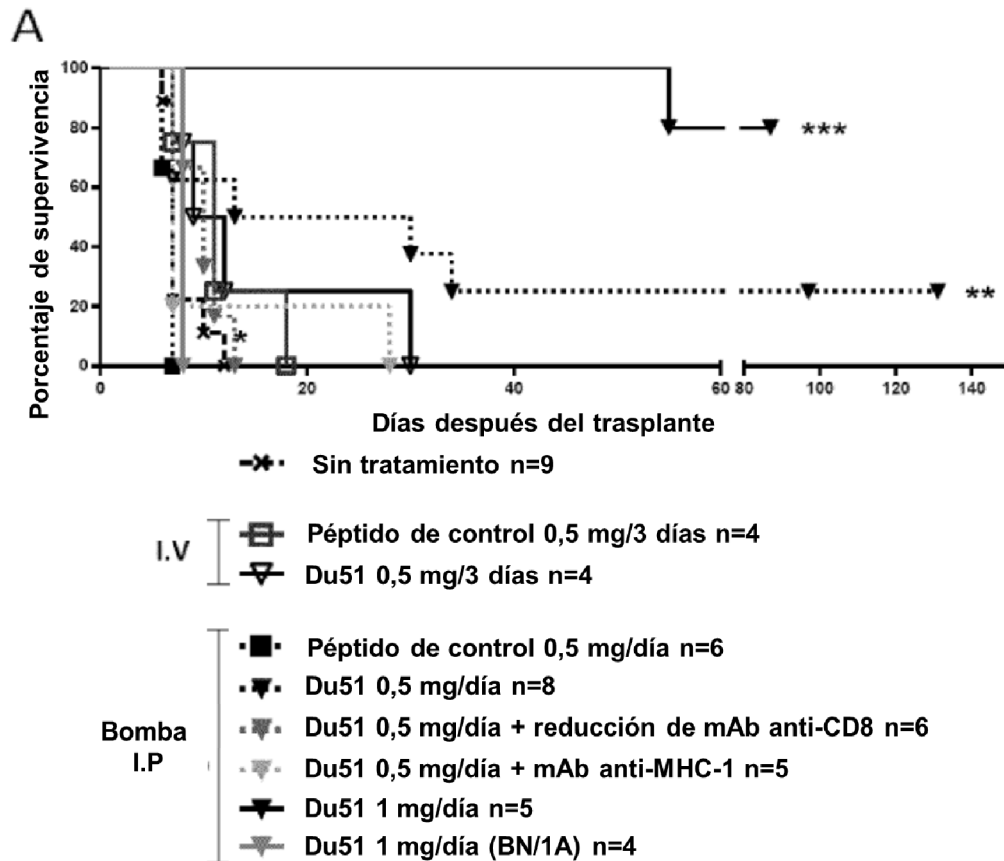


Figura 3A-B

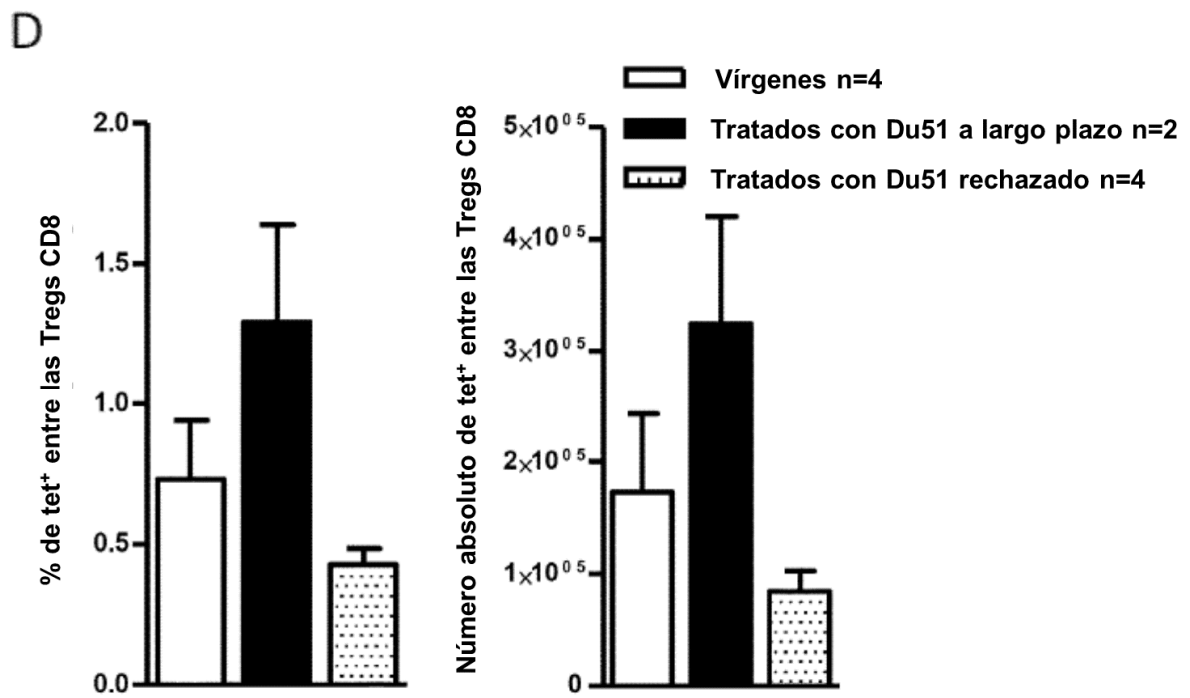
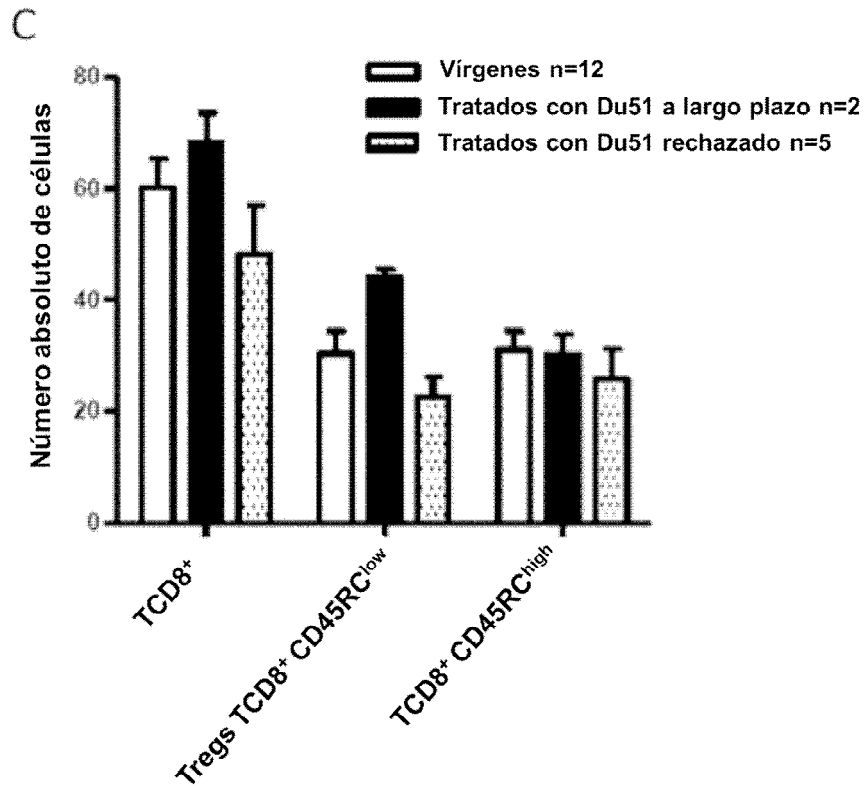


Figura 3C-D

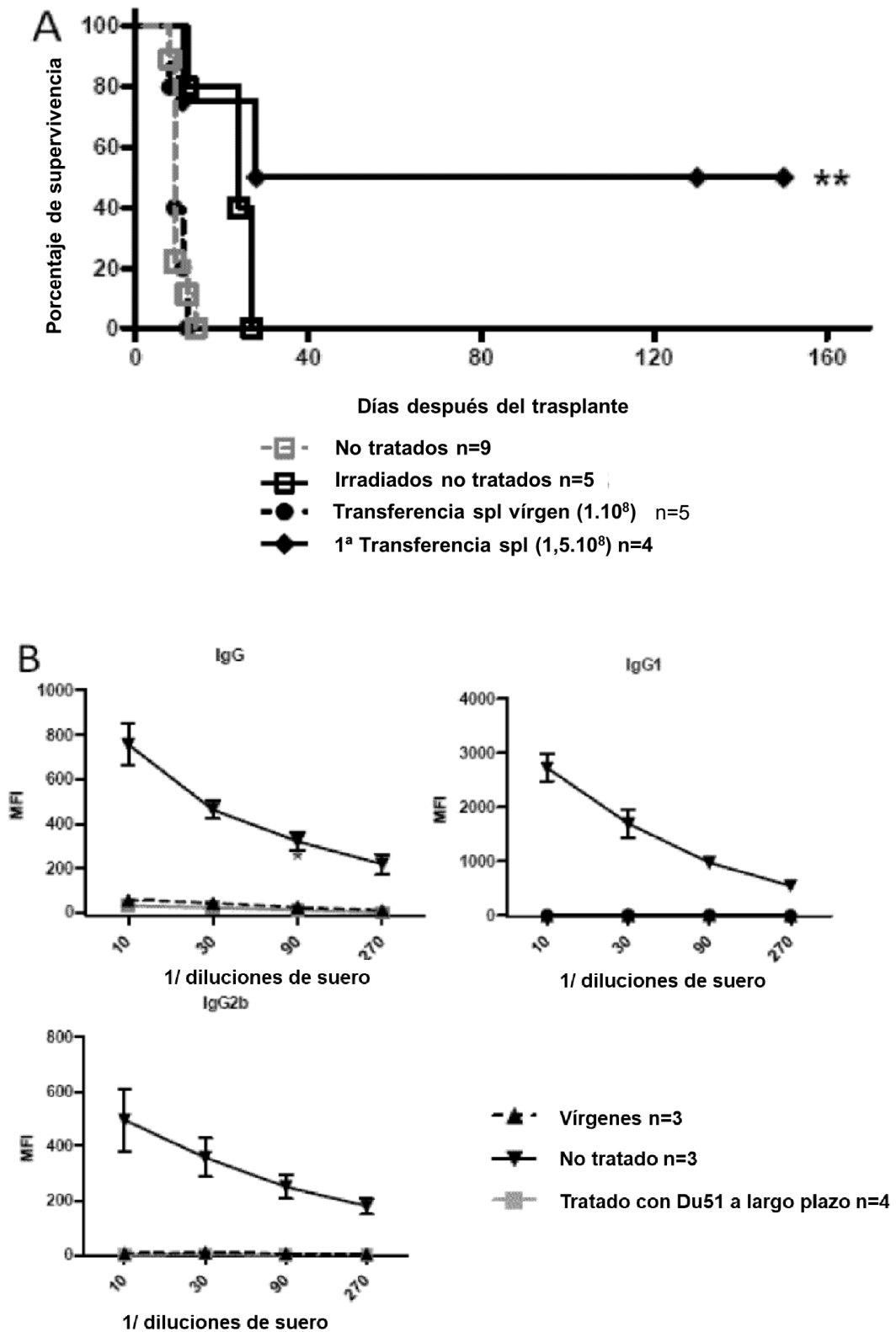


Figura 4