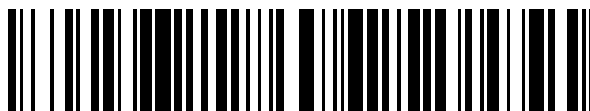


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 884**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0781

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2013 PCT/US2013/058484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2013 E 13836097 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2893002**

54 Título: **Métodos de expansión y evaluación de linfocitos B y uso de linfocitos B expandidos para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

06.09.2012 US 201261697663 P
28.09.2012 US 201261707256 P
12.03.2013 US 201313795889

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2020

73 Titular/es:

DUKE UNIVERSITY (100.0%)
2812 Erwin Road
Durham, NC 27705, US

72 Inventor/es:

TEDDER, THOMAS, F.;
YOSHIZAKI, AYUMI;
MIYAGAKI, TOMOMITSU;
KOUNTIKOV, EVGUENI y
POE, JONATHAN, C.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 765 884 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

Métodos de expansión y evaluación de linfocitos B y uso de linfocitos B expandidos para el tratamiento de enfermedades

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud de patente reclama el beneficio de prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 61/697.663, presentada el 6 de septiembre de 2012; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 61/707.256, presentada el 28 de septiembre de 2012 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º. 13/795.889, presentada el 12 de marzo de 2013.

DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN CON FONDOS FEDERALES

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno de Estados Unidos otorgado por los Institutos Nacionales de Salud, número de subvención A1057157 y U19 A156363. Estados Unidos puede tener ciertos derechos en la presente invención.

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que los linfocitos B regulan las respuestas inmunitarias mediante la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Sin embargo, subconjuntos específicos de linfocitos B también pueden regular negativamente las respuestas inmunitarias, validando la existencia de linfocitos B reguladores. Se han identificado linfocitos B reguladores humanos y de ratón (linfocitos B10) con la capacidad de expresar la citocina inhibidora interleucina-10 (IL-10). Aunque es raro, los linfocitos B10 son potentes reguladores negativos de la inflamación específica del antígeno y de la enfermedad autoinmunitaria dependiente de los linfocitos T en ratones. La producción de IL-10 de los linfocitos B10 regula las respuestas inmunitarias específicas del antígeno *in vivo* sin inducir inmunosupresión sistémica. Los linfocitos B10 pueden ser útiles para regular o controlar la inflamación o las enfermedades autoinmunitarias.

El documento WO 2012/019041 A2 desvela el uso de linfocitos B10 en la manipulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias, y en el tratamiento de enfermedades. El documento US 2012/0214192 A1 desvela un método de producción de una población de linfocitos B específicos del antígeno que comprende linfocitos B positivos en IgG específicos de un antígeno específico. El documento US 7.378.276 B2 desvela un método de inducción de la diferenciación de un progenitor de linfocitos B en linfocitos B con memoria y/o de una célula plasmática. Ettinger *et al.* (*J. Immunol.*, 178 (5), 2872 - 2882 (2007)) establecen que IL-21 y BAFF/BLyS se sinergizan en la estimulación de la diferenciación en células plasmáticas de una población única de linfocitos B con memoria esplénicos humanos. El documento WO 2011/147903 A1 desvela un método de obtención de un linfocito B. Yoshizaki *et al.* (*Nature*, 491 (7423), 264-268 (2012)) afirman que los linfocitos B reguladores controlan la autoinmunidad de las células I a través de interacciones afines dependientes de IL-21.

Resumen

En un aspecto, la invención proporciona un método de expansión de linfocitos B10 productores de IL-10 *ex vivo* que comprende poner en contacto linfocitos B extraídos de un sujeto con IL-21 y aislar los linfocitos B10, en donde los linfocitos B10 se aíslan mediante la selección para la expresión en la superficie celular de al menos uno de entre CD1d, CD5 o CD24 y, opcionalmente, en donde los linfocitos B10 se aíslan además basándose en la producción de IL-10 o basándose en la expresión de moléculas de la superficie celular que incluyen IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a, CD79b, CD1d, CD5, CD9, CD10, CD1d, CD23, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138, CD 148 o combinaciones de las mismas.

En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto las células con un agonista de CD40 o poner en contacto los linfocitos B con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B, y en donde el promotor de la supervivencia de los linfocitos B es opcionalmente BAFF (BLyS). En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto los linfocitos B con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-4, opcionalmente, en donde el promotor de la supervivencia de los linfocitos B es BAFF (BLyS), antes de poner en contacto los linfocitos B con IL-21. En algunas realizaciones, los linfocitos B10 resultantes son policlonales.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de expansión de linfocitos B10 productores de IL-10 *ex vivo* que comprende: a) poner en contacto los linfocitos B extraídos de un sujeto con células alimentadoras que expresan un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-4; b) poner en contacto los linfocitos B de la etapa (a) con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-21; c) aislar los linfocitos B de la etapa (b); y d) aislar los linfocitos B10 de los linfocitos B de la etapa (c), en donde los linfocitos B10 se aíslan mediante la selección para la expresión en la superficie celular de al menos uno de entre CD1d, CD5, CD24 o CD27, y opcionalmente en donde los

linfocitos B10 se aíslan además basándose en la producción de IL-10, o basándose en la expresión diferencial de moléculas de la superficie celular que incluyen IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a, CD79b, CD1d, CD5, CD9, CD10, CD1d, CD23, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138, CD148 o combinaciones de las mismas.

5 En algunas realizaciones, las células alimentadoras expresan además VCAM-1 y CD44 y/o al menos un marcador seleccionado entre CD24, IL-7, Mst1 o Tslp. En algunas realizaciones, el método comprende aislar los linfocitos B10 mediante la selección en cuanto a CD27.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de evaluación de la función de los linfocitos B10 en linfocitos B extraídos de un sujeto que comprende: a) poner en contacto los linfocitos B con IL-21 y un agonista de CD40; y b) determinar si los linfocitos B producen IL-10; opcionalmente, que comprende además poner en contacto los linfocitos B con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-4 antes del cultivo con IL-21, opcionalmente, en donde las células se ponen en contacto con células alimentadoras que expresan un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-21.

20 En algunas realizaciones, los linfocitos B han sido extraídos de la sangre, del bazo, de la cavidad peritoneal, de los ganglios linfáticos, de la médula ósea, del sitio de la enfermedad autoinmunitaria, del sitio de inflamación o del tejido objeto de rechazo de trasplante del sujeto, y en donde los linfocitos B se aíslan opcionalmente mediante la eliminación de las células distintas de los linfocitos B, o la selección de las moléculas de superficie celular IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a, CD79b, CD1d, CD5, CD9, CD10, CD23, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138, CD148 o combinaciones de las mismas antes de su uso en un método de la invención.

25 En algunas realizaciones, el agonista de CD40 se selecciona del grupo que consiste en CD 154, un fragmento de CD154 y un anticuerpo, aptámero o polipéptido, o fragmento de los mismos reactivo con CD40, el promotor de la supervivencia de los linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en al menos uno de entre células alimentadoras, BAFF (BLyS), fragmentos de BAFF, APRIL, ligando de CD22, anticuerpo monoclonal CD22 y sus fragmentos, y las células alimentadoras se seleccionan del grupo que consiste en fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos, melanocitos y otras células mesenquimales o estromales.

En algunas realizaciones, los linfocitos B se ponen en contacto con IL-21 durante cuatro a ocho días. En algunas realizaciones, los linfocitos B se ponen en contacto con IL-4 durante tres a diez días antes del contacto con IL-21.

35 En algunas realizaciones, el método comprende además comparar la cantidad de IL-10 producida o el porcentaje de células capaces de producir IL-10 con un control que tenga una función de linfocitos B10 normal, y determinar si la función de linfocitos B10 es normal o anormal en el sujeto y, opcionalmente, diagnosticar si el sujeto tiene linfocitos B10 normales, deficientes o hiperactivos.

40 En algunas realizaciones, el método comprende además usar la comparación para diagnosticar si el sujeto tiene una enfermedad o afección que afecte a la función de los linfocitos B10, en donde la enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de injerto frente a hospedador, rechazo de trasplantes, anticuerpos anti-fármacos o un trastorno inflamatorio.

45 Los métodos para evaluar la función de los linfocitos B10 que se proporcionan en el presente documento pueden usarse para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, o pueden usarse para evaluar la fase de una enfermedad o afección en el sujeto.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 es un conjunto de datos que demuestran que IL-21 induce la función reguladora de los linfocitos B10 reguladores. La Figura 1A es un conjunto de diagramas de puntos de análisis FACS y gráficos de los datos que muestran que IL-21 induce la producción y secreción de IL-10 de los linfocitos B10. Los linfocitos B CD19⁺ de bazo purificados de ratones de tipo silvestre se cultivaron en medio solo o con las citocinas recombinantes o LPS que se indican. Para visualizar los linfocitos B competentes en IL-10, se añadieron LPS, PMA, ionomicina y monensina (L+PIM) a los cultivos 5 h antes de aislar las células, teñirlas con mAb CD19, permeabilizarlas, teñirlas para la expresión citoplasmática de IL-10 y analizarlas mediante citometría de flujo. Los histogramas representativos muestran frecuencias de células IL-10⁺ dentro de las ventanas de análisis indicadas, con tinción de fondo mostrada para células cultivadas con monensina (Mon.) solo. Los gráficos de barras indican las frecuencias medias de linfocitos B IL-10⁺ ($\pm$ ETM) o las concentraciones de IL-10 en el líquido sobrenadante del cultivo a las 48 o 72 h de tres experimentos independientes usando ratones individuales. La Figura 1B es un conjunto de gráficos de puntos que muestran que IL-21 induce la producción de IL-10 de linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺. Se cultivaron linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ o CD1d^{bajo}CD5⁺ de bazo purificados de ratones de tipo silvestre con medio solo o que contenían IL-21 durante 48 h antes de evaluar las frecuencias de los linfocitos B IL-10⁺ como en (la Figura 1A). La Figura 1C es un conjunto de gráficos que muestra que los linfocitos B10 expresan IL-21R. Se cultivaron esplénocitos CD19⁺ purificados de ratones de tipo silvestre con L+PIM durante 5 h antes de la tinción de CD19 e IL-21R de la superficie

celular, y de IL-10 citoplasmática para identificar los linfocitos B10 competentes en IL-10 (gráfico de puntos, panel izquierdo). Se muestra la expresión representativa de IL-21R por linfocitos B IL-10⁺ e IL-10⁻ de ratones de tipo silvestre en comparación con los linfocitos B de control de ratones IL-21R^{-/-} (histogramas grises). Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes con ratones individuales. La Figura 1D es un conjunto de gráficos que muestran que se requiere la expresión de IL-21 R para la expansión de linfocitos B10 *in vivo* tras la inmunización con MOG. Se evaluaron los números de linfocitos B10 en ratones IL-21R^{-/-} o CD19^{-/-} de tipo silvestre 7 días después de recibir la inmunización con PBS o MOG₃₅₋₅₅. Se muestran histogramas de citometría de flujo representativos. Los gráficos de barras indican las frecuencias medias de los linfocitos B10 ($\pm$ ETM) (≥ 3 ratones por grupo). Figura 1A y Figura 1D, se indican las diferencias significativas entre las medias muestrales; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

La Figura 2 es un conjunto de datos que demuestran que los linfocitos B10 requieren la expresión de IL-10, SL-21R, CD40 y MHC-II para regular la gravedad de los EAE. La Figura 2A muestra el protocolo experimental y la gravedad de la enfermedad resultante en distintos ratones tras la administración de MOG₃₅₋₅₅. Un día antes, se inmunizaron ratones CD19^{-/-} o de tipo silvestre (WT) con MOG₃₅₋₅₅, el día 0, los ratones CD19^{-/-} recibieron solución salina (PBS) o linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ o CD1d^{bajo}CD5⁻ de bazo purificados de ratones bien de tipo silvestre, IL-10^{-/-}, IL-21 R^{-/-}, CD40^{-/-} o MHC-II^{-/-}. Los ratones se puntuaron diariamente a partir de entonces para determinar la gravedad de la enfermedad. Los dos gráficos superiores muestran datos del mismo experimento, pero se separaron, ya que las curvas se superpusieron y, por lo tanto, eran difíciles de visualizar en un solo gráfico. La Figura 2B es un conjunto de gráficos que muestran que los linfocitos B10 requieren la expresión de MHC-II para regular la gravedad de los EAE en ratones de tipo silvestre tratados con CD20 o mAb de control 7 días antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ el día 0. Los ratones también recibieron PBS o linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ purificados de ratones bien CD20^{-/-} o MHC-II^{-/-} CD20^{-/-} 1 día antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅. Los dos gráficos son del mismo experimento, pero se separaron para facilitar la visualización de las curvas superpuestas. La Figura 2C es un gráfico que muestra que los linfocitos B10 MHC-II^{-/-} activados no pueden reducir la gravedad de la enfermedad en ratones de tipo silvestre. Se cultivaron linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ purificados de ratones de tipo silvestre o MHC-II^{-/-} con mAb CD40 agonista durante 48 h para inducir la maduración de linfocitos B10pro, con la adición de LPS durante las últimas 5 h de cultivo. Los ratones de tipo silvestre recibieron PBS o linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ 1 día antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ el día 0. En las Figuras 2A-2C, los valores representan las puntuaciones medias de los síntomas ($\pm$ ETM) de ≥ 3 ratones de cada grupo, con resultados similares obtenidos en tres experimentos independientes. se indican las diferencias significativas entre las medias muestrales; *, $p < 0,05$.

La Figura 3 es un conjunto de datos que muestran la expansión de los linfocitos B10 y la regulación de la autoinmunidad mediada por los linfocitos T. La Figura 3A es un conjunto de diagramas de puntos y de gráficos que muestran que los linfocitos B10 requieren la expresión de IL-10, IL-21R, CD40 y MHC-II para regular la proliferación de los linfocitos T específicos del antígeno *in vivo*. Los ratones receptores CD19^{-/-} recibieron PBS como control, o linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ o CD1d^{bajo}CD5⁻ purificados de ratones sin tratamiento previo de tipo silvestre (WT), IL-10^{-/-}, IL-21R^{-/-}, CD40^{-/-} o MHC-II^{-/-}, o ratones de tipo silvestre con EAE (día 28) 1 día antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ el día 0. Cuatro días después de la inmunización, se transfirieron linfocitos T TCR^{MOG} CD4⁺Thy1.1⁺ marcados con colorante (CFSE) a ratones receptores CD19^{-/-}. Cinco días después, se analizaron linfocitos T CD4⁺Thy1.1⁺ de ganglios linfáticos periféricos para determinar la proliferación, mostrándose el análisis representativo de citometría de flujo de dilución de CFSE. Los gráficos de barras indican los números medios ($\pm$ ETM) de linfocitos T TCR^{MOG} divididos. La Figura 3B es un conjunto de diagramas de puntos y gráficos que muestran que los linfocitos B10 requieren la expresión de IL-10, IL-21R, CD40 y MHC-II para su regulación de la producción de citocinas de linfocitos T específicos del antígeno. Se transfirieron linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ purificados de los ratones indicados a ratones receptores CD19^{-/-} 1 día antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ el día 0, con la transferencia de linfocitos T TCR^{MOG} Thy1.1⁺CD4⁺ el día 4. Catorce días después, se analizaron los linfocitos T Thy1.1⁺CD4⁺ del ganglio linfático para determinar la producción de IL-17 e IFN- γ mediante tinción intracelular de citocinas, mostrándose los resultados representativos de la citometría de flujo. Los gráficos de barras indican las frecuencias medias ($\pm$ ETM) de las células que expresan citocinas, con tres ratones en cada grupo. En las Figuras 3A y 3B, se indican diferencias significativas entre las medias muestrales: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. La Figura 3C muestra un modelo para la función de los linfocitos B10 específicos del autoantígeno (Ag). Los linfocitos B capturan autoantígenos que activan señales BCR apropiadas (etapa 1) y potencian el desarrollo de los linfocitos B10pro competentes para IL-10. Durante las respuestas inmunitarias (etapa 2), los linfocitos B10pro presentan péptidos a los linfocitos T específicos del antígeno a través de interacciones afines que inducen la activación de los linfocitos T y las interacciones de CD40/CD154. Los linfocitos T activados pueden producir IL-21 localmente, que se une al IL-21R de los linfocitos B10 proximal (etapa 3). Las señales de IL-21R inducen la producción de IL-10 de los linfocitos B10 y la función efectora (B10ef, etapa 4), que puede regular negativamente la función de los linfocitos T específicos del antígeno (etapa 5).

La Figura 4 es un conjunto de datos que muestran que IL-21 impulsa la expansión de los linfocitos B10 reguladores *ex vivo*. La Figura 4A es un conjunto de diagramas de puntos que muestran el desarrollo de los linfocitos B10 *in vitro*. Se cultivaron linfocitos B de bazo purificados en una monocapa de células NIH-3T3 que expresaban CD154/BLyS en presencia de IL-4 exógena durante 4 días, luego se cultivaron en células NIH-3T3-CD154/BLyS nuevas con IL-21 exógena durante 3 o 5 días como se indica. Las células se aislaron luego, se cultivaron con monensina durante 5 h y se tiñeron para la expresión citoplasmática de IL-10. Se muestran frecuencias representativas de linfocitos B IL-10⁺ dentro de las ventanas de análisis indicadas. Se obtuvieron resultados similares en ≥ 10 experimentos. La Figura 4B es un gráfico de barras y de líneas superpuestas que muestra que IL-21 impulsa la expansión de los linfocitos B10 *in vitro*. Se cultivaron linfocitos B como en la Figura 4A con células

extraídas cada día de cultivo. Los valores de las barras representan los números medios ($\pm$ ETM) de linfocitos B y linfocitos B10, o las frecuencias de linfocitos B10 (línea continua) de tres experimentos independientes. La Figura 4C es un conjunto de gráficos de puntos que muestran linfocitos B10 inducidos por IL-21 para expresar CD5. Se cultivaron linfocitos B de tipo silvestre durante 9 días como en la Figura 4A y se tiñeron para la expresión de CD5 y CD19. Luego, se purificaron linfocitos B CD5⁺ y CD5⁻ mediante clasificación celular y se cultivaron con monensina durante 5 h antes de la tinción citoplasmática de IL-10. Los resultados mostrados representan tres experimentos independientes. La Figura 4D es un conjunto de gráficos que muestran que las células efectoras B10 inducidas por IL-21 inhiben el inicio y la progresión de los EAE. Se aislaron linfocitos B10 inducidos por IL-21 (CD5⁺CD19⁺) o células no B10 (CD5⁻CD19⁺) como en la Figura 4C, y se transfirieron adoptivamente a ratones de tipo silvestre en los días -1, 7, 14 o 21 (flechas) antes/después de la inmunización con MOG y la inducción de los EAE como en la Figura 2. La Figura 4E es un gráfico de barras que muestra que la expansión de los linfocitos B10 *in vitro* requiere la expresión de IL-21R y CD40, y la señalización de BCR *in vivo*. Se cultivaron linfocitos B de bazo purificados aislados de ratones de tipo silvestre, IL-21R^{-/-}, CD40^{-/-}, MHC-II^{-/-}, CD19^{-/-} o MD4 como en la Figura 4A, con números de células medios ($\pm$ ETM) cuantificados tras el cultivo. Los valores representan las medias ($\pm$ ETM) de tres experimentos independientes. Las frecuencias de los linfocitos B IL-10⁺ en los cultivos se muestran entre paréntesis. La Figura 4F es un conjunto de gráficos que muestran que los linfocitos B10 inducidos por IL-21 requieren la expresión de IL-10 y MHC-II para inhibir los EAE. Se cultivaron linfocitos B de ratones IL-10^{-/-} o MHC-II^{-/-} como en la Figura 4A, se separaron en células CD5⁺ o CD5⁻ como en la Figura 4C y se transfirieron adoptivamente a ratones de tipo silvestre antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ como en la Figura 4D. En la Figura 4D y 4F, los valores representan las puntuaciones medias ($\pm$ ETM) de los síntomas de ≥ 3 ratones en cada grupo, con resultados similares obtenidos en tres experimentos independientes. En la Figura 4B, 4D y 4E, se indican diferencias significativas entre las medias muestrales: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

La Figura 5 presenta un conjunto de datos que muestran que IL-21 induce la función reguladora de los linfocitos B10. La Figura 5A es un conjunto de gráficos de barras que muestran que IL-21 induce la producción y secreción de IL-10 de los linfocitos B10. Se cultivaron linfocitos B CD19⁺ de bazo purificados de ratones de tipo silvestre solo con medio o con las citocinas indicadas durante 48 o 72 h. Para visualizar los linfocitos B competentes en IL-10, se añadió monensina a los cultivos 5 h antes de aislar las células, teñirlas con mAb CD19, permeabilizarlas, teñirlas para la expresión citoplasmática de IL-10 y analizarlas mediante citometría de flujo. Los gráficos de barras indican las frecuencias o los números medios ($\pm$ ETM) de los linfocitos B IL-10⁺ a las 48 y 72 h de ratones individuales en tres experimentos independientes. Se indican diferencias significativas entre las medias de las muestras de medio frente a las de citocinas: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. Las Figuras 5B-D son un conjunto de diagramas de puntos y gráficos de barras que muestran que la expresión de IL-21R, CD40 y MHC-II no es necesaria para el desarrollo de linfocitos B10 o B10pro, respectivamente. Se cultivaron linfocitos B de bazo purificados de ratones de tipo silvestre y IL-21R^{-/-} (Figura 5B) CD40^{-/-} (Figura 5C) o MHC-II^{-/-} (Figura 5D) con monensina sola o L+PIM durante 5 h para cuantificar las frecuencias de los linfocitos B10. Como alternativa, se determinaron las frecuencias de los linfocitos B10+B10pro tras cultivar las células *ex vivo* con mAb CD40 agonista durante 48 h, con L+PIM añadido durante las últimas 5 h de cultivo. Los histogramas y gráficos de barras representativos indican los porcentajes y números medios ($\pm$ ETM; ≥ 3 ratones por grupo) de linfocitos B que expresaban IL-10 en uno de dos experimentos con resultados equivalentes.

La Figura 6 es un conjunto de transferencias de puntos y gráficos de barras que muestran la presencia de linfocitos T foliculares auxiliares en ratones CD19^{-/-}. Análisis representativo de citometría de flujo de las células CXCR5^{alto}PD1⁺ entre los linfocitos T CD4⁺ de bazo de ratones de tipo silvestre y CD19. Los valores de las barras representan las frecuencias medias ($\pm$ ETM) de las células CXCR5^{alto}PD1⁺ entre los linfocitos T CD4⁺ de tres ratones. Se indican diferencias significativas entre las medias muestrales: *, $p < 0,05$.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el número total de los linfocitos B y los linfocitos B10 tras el tiempo indicado en cultivo y la cantidad de IL-10 producida por el cultivo. Se cultivaron linfocitos B de sangre humana purificados en monocapas de células NIH-3T3-mCD154/hBlyS con IL-4 humana exógena (2 ng/ml) durante 7 días. Se añadieron medios adicionales que contenían IL-4 (2 ng/ml) a los cultivos en los días 2 y 4. Los linfocitos B se aislaron y se cultivaron sobre células NIH-3T3-CD154/BlyS nuevas con IL-21 humana exógena (10 ng/ml) durante 5 días como se indica. Las células se aislaron luego, se cultivaron con CpG+PIB durante 5 h y se tiñeron para la expresión de CD19 de superficie celular y de IL-10 citoplasmática. Los valores de las barras representan los números medios ($\pm$ ETM) de linfocitos B CD19⁺ y linfocitos B10, o las frecuencias de los linfocitos B10 (línea continua) de dos experimentos independientes.

La Figura 8 es un conjunto de fotografías que muestran que los linfocitos B humanos solo se agrupan y proliferan en células alimentadoras altamente seleccionadas. Se sembraron en placas células epiteliales humanas A459 que expresaban establemente CD154 y BlyS humanas como células individuales, se expandieron en colonias y luego se cultivaron junto con linfocitos B humanos purificados en presencia de IL-4 durante 9 días. La Figura 8A muestra un clon representativo de células A459-CD154/BlyS con la capacidad de generar y mantener colonias de linfocitos B en proliferación. La Figura 8B muestra un clon representativo de A459 hermano que no admite la agrupación/proliferación de los linfocitos B. Se observan algunos linfocitos B supervivientes dispersos (flechas).

Descripción detallada

El subconjunto de linfocitos B10 de los linfocitos B reguladores se ha definido funcionalmente en seres humanos y ratones por su capacidad para expresar IL-10. Los linfocitos B que son competentes para expresar IL-10 después de 5 h de estimulación con éster de forbol e ionomicina *ex vivo* se definen funcionalmente como linfocitos B10 para

distinguirlos de otros linfocitos B reguladores que modulan las respuestas inmunitarias a través de otros mecanismos. Los linfocitos B10 se encuentran a bajas frecuencias (1-5 %) en ratones sin tratamiento previo, pero se expanden con autoinmunidad. Los linfocitos B10 del bazo se encuentran predominantemente dentro de la subpoblación de linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ (CD24⁺CD27⁺) menor, junto con las células progenitoras B10 (B10pro) raras que se inducen para volverse competentes en IL-10 durante el cultivo *in vitro* con anticuerpo monoclonal (mAb) CD40 agonista. La capacidad de los linfocitos B10 humanos y de ratón para producir IL-10 es fundamental para su capacidad de regular negativamente la inflamación y la enfermedad autoinmunitaria, así como respuestas inmunitarias adaptativas e innatas, pero se desconocen las señales fisiológicas que controlan la producción de IL-10 *in vivo*.

La inmunorregulación de los linfocitos B10 es específica del antígeno, y la especificidad del receptor de antígenos de linfocito B (BCR) influye drásticamente en el desarrollo de los linfocitos B10. Los receptores o las vías que regulan positiva o negativamente la señalización de BCR también pueden modular el número de linfocitos B10 *in vivo*. Por ejemplo, los ratones con deficiencia de CD19 (CD19^{-/-}) carecen esencialmente de linfocitos B10 reguladores, lo que conduce al agravamiento de la inflamación y de los síntomas de la enfermedad durante la hipersensibilidad de contacto y en el modelo experimental de la encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE) de la esclerosis múltiple. La IL-10 en sí misma no es necesaria para el desarrollo de los linfocitos B10, ya que los linfocitos B con la capacidad de expresar genes indicadores de IL-10 normalmente se desarrollan en ratones IL-10^{-/-}. Los números de linfocitos B10 también son normales en los ratones desnudos deficientes en linfocitos T y en ratones deficientes en la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) o moléculas CD40 que son importantes para las interacciones de los linfocitos B-linfocitos T afines. Por consiguiente, se cree que las señales BCR apropiadas seleccionan un subconjunto de linfocitos B para convertirse en linfocitos B10 competentes para IL-10. Las señales inducidas por patógenos innatos también influyen en el desarrollo de los linfocitos B10 reguladores *in vivo*. De lo contrario, se sabe poco acerca de cómo se regula *in vivo* la producción de IL-10 de los linfocitos B10, y no está claro cómo dichos linfocitos B raros ejercen efectos tan potentes *in vivo* e inhiben selectivamente la función de los linfocitos T específicos del antígeno durante la inflamación y la autoinmunidad.

Usando un modelo de ratón para la esclerosis múltiple, en el presente documento, se muestra que la maduración de los linfocitos B10 en células efectoras secretoras de IL-10 funcionales que inhiben la enfermedad autoinmunitaria *in vivo* requiere interacciones afines dependientes de IL-21 y CD40 con los linfocitos T. Por otra parte, la provisión *ex vivo* de las señales de los receptores CD40 e IL-21 puede impulsar el desarrollo y la expansión de los linfocitos B10 hasta cuatro millones de veces y generar células efectoras B10 que produzcan IL-10 que inhiban drásticamente los síntomas de la enfermedad cuando se transfieren a ratones con enfermedad autoinmunitaria establecida. De este modo, la expansión *ex vivo* y la reinfusión de linfocitos B10 autólogos pueden proporcionar un tratamiento *in vivo* novedoso y eficaz para enfermedades autoinmunitarias y otras afecciones que sean resistentes a los tratamientos actuales.

Además, también se mostró que los linfocitos B humanos y los linfocitos B10 pueden expandirse *ex vivo*. Los linfocitos B se extrajeron de la sangre humana normal y se expandieron *ex vivo* usando los mismos métodos que se usaron para la expansión de los linfocitos B de ratón. Como se describe en los ejemplos, el número de linfocitos B aumentó 130 veces, mientras que los linfocitos B10 aumentaron de 5 a 6.000 veces. Por lo tanto, los ejemplos demuestran que los métodos pueden usarse para generar linfocitos B expandidos *ex vivo* que pueden ser útiles para el tratamiento autólogo de enfermedades o afecciones humanas en las que la adición de linfocitos B sensibles o de linfocitos B10 puede ser terapéutica.

MÉTODOS DE EXPANSIÓN DE LINFOCITOS B EX VIVO

En el presente documento, se describen métodos de expansión de linfocitos B policlonales y, específicamente, de linfocitos B10 *ex vivo*. Los métodos incluyen la extracción de linfocitos B de un sujeto y su incubación con IL-21. En la Figura 1, los linfocitos B10 se expandieron más de dos veces después de 48 horas de incubación *ex vivo* con IL-21 a 100 ng/ml y más de tres veces después de 72 horas de incubación. Los métodos pueden incluir además la incubación con un ligando DE CD40 (CD154) y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B tal como BAFF (BLyS, usado indistintamente en el presente documento) o células alimentadoras que expresen un ligando de CD40 y/o BAFF para producir una mayor expansión de los linfocitos B y los linfocitos B10. Tal como se muestra en los ejemplos, los linfocitos B pueden expandirse aún más *ex vivo* mediante una primera incubación con IL-4, seguida de una segunda incubación que incluye IL-21. Cualquiera o ambas de estas etapas pueden incluir células alimentadoras y, opcionalmente, un ligando de CD40 y/o BAFF. Los linfocitos B totales se expandieron usando los métodos descritos en el presente documento, pero los linfocitos B10 se expandieron a una frecuencia más alta usando estos métodos. Además, los linfocitos B10 pudieron producir IL-10 sin la necesidad de una estimulación adicional *ex vivo* con LPS u otra señal estimuladora. Adecuadamente, los linfocitos B son linfocitos B humanos.

En un caso alternativo de los métodos de expansión de linfocitos B descritos en el presente documento, los linfocitos B se extraen de un sujeto y luego se incuban en células alimentadoras que expresan un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B tal como BAFF en presencia de IL-4. Este período de incubación puede durar de dos a diez o más días, y la cantidad de IL-4 puede optimizarse. En los métodos, se usaron 2 ng/ml de IL-4, pero pueden ser útiles de 0,5 ng/ml a 100 ng/ml o de 1 ng/ml a 50 ng/ml. En los métodos, el período de incubación de IL-4 fue de entre 4 y 7 días, pero también se demostró la utilidad de 9 días de incubación. Luego, se incubaron las

células resultantes en las células alimentadoras que expresaban el agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B, tal como BAFF, en presencia de IL-21 durante otros dos a ocho o más días antes de extraer los linfocitos B expandidos. En los ejemplos, se usaron 10 ng/ml o 100 ng/ml de IL-21, pero, adecuadamente, se pueden usar entre 5 ng/ml y 1.000 ng/ml, entre 10 y 500 ng/ml de IL-21. En los métodos, el período de incubación de IL-21 fue de 5 días, pero se pueden usar tiempos más largos o más cortos. Los expertos en la materia pueden determinar la cantidad real de IL-4 e IL-21 y la duración del tiempo de incubación o de cultivo para su uso en los métodos, y dependerá de las condiciones del cultivo, incluyendo si los medios de cultivo y las citocinas se reponían con el tiempo, la duración del período de cultivo y de otras condiciones de cultivo. En los ejemplos, se expandieron linfocitos B policlonales totales y linfocitos B10 usando este método. Sin embargo, los cultivos pueden comenzar con linfocitos B individuales o subconjuntos de linfocitos B aislados que luego se expanden *ex vivo* en poblaciones de linfocitos B monoclonales, pauciclinales o policlinales. Los linfocitos B producen anticuerpos en las condiciones de cultivo descritas en el presente documento y, por lo tanto, los métodos pueden usarse para seleccionar una población monoclonal, pauciclinal o policlinal de linfocitos B productores de anticuerpos. Adecuadamente, los linfocitos B son linfocitos B de ratón. Adecuadamente, los linfocitos B son linfocitos B humanos.

Los linfocitos B usados en los métodos se pueden extraer de varias zonas del sujeto, incluyendo pero sin limitación, la sangre, el bazo, la cavidad peritoneal, los ganglios linfáticos, la médula ósea, el sitio de la enfermedad autoinmunitaria, el sitio de inflamación o el tejido sometido a rechazo de trasplante en el sujeto. Las células se pueden extraer del sujeto mediante cualquier medio disponible para los expertos en la materia. La población de células extraída debe contener linfocitos B, pero puede ser una población de células mixta. El sujeto puede ser cualquier animal con linfocitos B, adecuadamente, un mamífero, adecuadamente, un animal domesticado tal como un caballo, una vaca, un cerdo, un gato, un perro o un pollo, o adecuadamente un ser humano. Como alternativa, las células pueden derivarse de células madre, incluyendo, pero sin limitación, células madre de linfocitos B, células madre de la médula ósea, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas, que se hayan diferenciado adecuadamente *in vitro* para convertirse en linfocitos B o progenitores de los linfocitos B antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, Carpenter *et al.*, 2011, *Blood* 117: 4008-4011.

Los linfocitos B pueden aislarse del sujeto mediante la eliminación de células que no sean linfocitos B, o la selección de marcadores de superficie celular tales como IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a o CD79b, o combinaciones de estas moléculas de la superficie celular que incluyen CD1d, CD5, CD9, CD10, CD23, CD24, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138 o CD148. Los linfocitos B expandidos pueden extraerse seleccionando estos marcadores tras el cultivo *ex vivo* en el método, o los tipos específicos de linfocitos B, tales como linfocitos B10, pueden seleccionarse usando estos marcadores antes o después de la expansión *ex vivo*, ya sea solos o en combinación. Los linfocitos B10 pueden extraerse mediante la selección para CD1d, CD5, CD24, CD27 o combinaciones de las mismas. En algunos casos, los linfocitos B10 son capaces de producir IL-10 tras la incubación con IL-21 y, por lo tanto, pueden seleccionarse, aislarse o extraerse mediante su selección para la producción de IL-10. En otros casos, los linfocitos B10 pueden necesitar un estímulo adicional para producir IL-10 con, por ejemplo, LPS o PMA e ionomicina. Los métodos de estimulación de los linfocitos B10 para producir IL-10 son conocidos en la técnica, e incluyen la estimulación con oligonucleótidos LPS u CpG.

Como se usa en el presente documento, la expansión de los linfocitos B incluye la estimulación de la proliferación de las células, así como la prevención de la apoptosis u otra muerte de las células. Como se usa en el presente documento, "cultivo" e "incubación" se usan para indicar que las células se mantienen en medio de cultivo celular a 37 °C y CO₂ al 5 % durante un período de tiempo con los aditivos indicados (células alimentadoras, citocinas, agonistas, otras moléculas o medios estimuladores, que pueden incluir tampones, sales, azúcares, suero u otros componentes). La puesta en contacto de las células indica que las células se cultivan, se incuban o se colocan de otro modo en contacto con los aditivos indicados. Adecuadamente, los períodos de incubación o de cultivo usados en el presente documento son de al menos 48 horas, pero pueden ser de cualquier cantidad de tiempo hasta ocho, diez o más días. Como se muestra en los ejemplos, se puede usar más de un período de cultivo. En los ejemplos, para la expansión de los linfocitos B de ratón, el cultivo con IL-4 fue de cuatro días y el cultivo con IL-21 fue de cinco días. Para los linfocitos B humanos, la expansión con IL-4 fue un período de cultivo de siete días seguido de un cultivo de cinco días con IL-21. Los expertos en la materia apreciarán que el tiempo de cultivo o de incubación puede variar para permitir una expansión adecuada, para ajustarse a las diferentes densidades o frecuencias celulares de subconjuntos individuales, y para permitir que un investigador tome el tiempo de manera adecuada para usar las células. Por lo tanto, la duración exacta del cultivo puede ser determinada empíricamente por un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, el aislamiento se usa para indicar que un grupo de células está separado de los medios de incubación, de las células alimentadoras o de otras células que no sean linfocitos B. El aislamiento no pretende transmitir que las células aisladas resultantes tengan un cierto nivel de pureza u homogeneidad. Las células se pueden extraer, aislar o seleccionar usando cualquier medio disponible para los expertos en la materia. Por ejemplo, los linfocitos B pueden extraerse de células adherentes seleccionando células no adherentes después de una incubación apropiada. Las células también pueden seleccionarse para la expresión de marcadores de la superficie celular mediante clasificación por FACS o por la capacidad diferencial de unirse a perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos. Los expertos en la materia conocen bien los medios para seleccionar células de una población mixta.

Los ejemplos no limitantes de agonistas de CD40 incluyen anticuerpos CD40 y fragmentos de los mismos, el ligando

de CD40 (CD154) y sus fragmentos polipeptídicos, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos (incluyendo péptidos cíclicos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, aptámeros, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. En una realización específica, el agonista de CD40 es un anticuerpo CD40. Los anticuerpos CD40 pueden ser de cualquier forma. Los anticuerpos contra CD40 son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Buhtoiarov *et al.*, 2005, *J. Immunol.* 174:6013-22; Francisco *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60:3225-31; Schwulst *et al.*, 2006, 177:557-65. Los agonistas de CD40 pueden ser ligandos de CD40 y pueden expresarse en la superficie de las células alimentadoras o solubles.

BAFF (BLyS) puede expresarse por las células alimentadoras mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. BLyS puede expresarse en la superficie o puede ser soluble después de ser escindido de la superficie celular. Como alternativa, BAFF se reemplaza por un factor diferente que potencie la supervivencia de los linfocitos B en cultivo, incluyendo las células alimentadoras, fragmentos de BAFF, APRIL, ligando de CD22, anticuerpo monoclonal CD22, o fragmentos del mismo.

Las células alimentadoras usadas en los ejemplos eran fibroblastos, pero se pueden usar otras células alimentadoras en los métodos. Las células alimentadoras pueden ser células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos, melanocitos u otras células mesenquimales o estromales. Los períodos de incubación o de cultivo usados en los métodos pueden ser de dos a diez o más días para cada etapa del método. Adecuadamente, el tiempo de incubación es de entre tres y siete días, adecuadamente es de entre cuatro y cinco días. Como se describe en los ejemplos, es probable que las células alimentadoras requieran señales adicionales, aparte del agonista CD40 y BAFF, para permitir una expansión óptima de los linfocitos B en los métodos. En los ejemplos y en la siguiente Tabla 1, se incluye un análisis preliminar de otros factores suministrados por las células alimentadoras para optimizar la expansión de los linfocitos B. En resumen, además de un agonista de CD40 y BAFF, las células alimentadoras expresan mínimamente VCAM-1 y CD44, además del agonista de CD40 y BAFF. El aumento de la expresión de CD24, interleucina-7 (IL-7), Mst1 y Tslp por las células alimentadoras se correlacionó con el hecho de que las células alimentadoras fueran capaces de producir un mayor número de linfocitos B durante la expansión *ex vivo*. De igual manera, la regulación a la baja de ciertas moléculas en las células alimentadoras se correlacionó con una mayor capacidad para soportar la expansión de los linfocitos B. En particular, la regulación a la baja de CD99, TGFB1, CXCR7, Dlk1, Jag1 y Notch1 en las células alimentadoras se correlacionó con el hecho de que las células eran más capaces de soportar la expansión de los linfocitos B *ex vivo*. Por lo tanto, los expertos en la materia pueden seleccionar, o crear mediante ingeniería genética, células alimentadoras más capaces de soportar la expansión de los linfocitos B *ex vivo*. La información también puede usarse para generar un medio de expansión de linfocitos B que no requiera células alimentadoras vivas para una expansión óptima de los linfocitos B *ex vivo*.

Los métodos pueden permitir de dos veces a más de 5×10^6 veces de expansión de linfocitos B o, en particular, de linfocitos B10. Las células pueden seleccionarse después del período de cultivo para eliminar cualquier célula que no sea un linfocito B o para seleccionar positivamente los linfocitos B o para un subconjunto determinado de linfocitos B, al como linfocitos B10. Los linfocitos B10 pueden representar el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más de los linfocitos B totales del cultivo una vez completado el método de expansión. Tras seleccionar las células para la expresión en la superficie celular de uno o varios marcadores de superficie de linfocitos B10, más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % de las células son linfocitos B10 o B10pro capaces de producir IL-10.

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN LOS LINFOCITOS B EXPANDIDOS

También se proporcionan composiciones que incluyen los linfocitos B policlonales expandidos generados usando los métodos descritos en el presente documento. En un caso, las composiciones incluyen más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o esencialmente el 100 % de linfocitos B10 o B10pro. En otros casos, las composiciones se seleccionan para incluir linfocitos B productores de anticuerpos. Las composiciones pueden incluir más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o esencialmente el 100 % de linfocitos B productores de anticuerpos.

Las composiciones que contienen linfocitos B expandidos se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los linfocitos B expandidos descritos anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para la administración *in vivo* de células. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la composición incluyen, pero sin limitación, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa, fluidos a base de aceite o de cultivo celular. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir adecuadamente, por ejemplo, excipientes tales como estabilizadores, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizadores tales como carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas, tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo, tampón fosfato).

Las composiciones de linfocitos B expandidos pueden administrarse junto con otros tratamientos, tales como moléculas pequeñas, polipéptidos, anticuerpos, aptámeros u otros agentes terapéuticos. La administración conjunta de las composiciones descritas en el presente documento con otro agente terapéutico se puede administrar en

cualquier orden, al mismo tiempo o como parte de una composición unitaria. Las dos composiciones pueden administrarse de modo que una composición se administre antes que la otra con una diferencia en el momento de administración de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 20 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o más.

5

En otros casos, la población de linfocitos B o linfocitos B10 puede expandirse monoclonal o pauciclonalmente a partir de células individuales aisladas o subconjuntos de linfocitos B aislados. En un caso, las composiciones incluyen más del 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o esencialmente el 100 % de linfocitos B o linfocitos B10 monoclonales. En otros casos, las composiciones se seleccionan para incluir linfocitos B productores de anticuerpos. Las composiciones pueden incluir más del 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o esencialmente el 100 %) de linfocitos B que produzcan anticuerpos. En otro caso, las composiciones se seleccionan para incluir linfocitos B específicos del antígeno monoclonales o pauciclonales. Las composiciones pueden incluir más del 10 %, 1,5 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o esencialmente el 100 % de linfocitos B específicos de o que producen anticuerpos contra una sola proteína u otra entidad antigénica. En otro caso, las composiciones pueden incluir más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o esencialmente el 100 % de linfocitos B capaces de ejercer actividades reguladoras mediante la expresión de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17, IFN γ , IL-23 o TNF- α .

20

En otro caso, la población de linfocitos B o linfocitos B10 puede responder a un determinado antígeno implicado en una enfermedad específica. Los linfocitos B pueden producir anticuerpos terapéuticos u otras citocinas en respuesta a un encuentro posterior con el antígeno. La población de linfocitos B10, cuando se sensibiliza con un cierto antígeno, puede producir cantidades terapéuticas de IL-10 tras encuentros posteriores con el antígeno. Dichas poblaciones de linfocitos B o linfocitos B10 específicos del antígeno pueden usarse en métodos de transferencia adoptivos, en donde un sujeto está o ha sido inmunizado previamente con un cierto antígeno, y se aíslan las células sensibilizadas con antígeno de dicho sujeto, se expanden *ex vivo* mediante los métodos descritos en el presente documento y se trasplantan al mismo o a otro sujeto. Como alternativa, se puede aislar una población de linfocitos B o linfocitos B10 de un sujeto y, posteriormente, puede sensibilizarse con un antígeno específico de la enfermedad *ex vivo* o *in vitro*. La población de células sensibilizadas se puede trasplantar luego al sujeto original o a otro sujeto mediante cualquier método conocido en la técnica. En otro caso más, la población de linfocitos B o B10 específica del antígeno se puede añadir a un dispositivo de modulación inmunitaria implantable. De acuerdo con este caso, la población celular implantada generará una producción localizada estratégicamente de IL-10, anticuerpos u otras citocinas cuando se encuentre con el antígeno en el hospedador, dependiendo de las células implantadas. En otro caso, la población de linfocitos B o linfocitos B10 y un antígeno específico de la enfermedad se pueden colocar en un dispositivo de modulación inmunitaria implantable, y dicho dispositivo se puede trasplantar a un receptor en un lugar donde los efectos terapéuticos de la población celular, es decir, la producción de IL-10, producción de anticuerpos o producción de citocinas, se necesitan, resultando así en una respuesta amplificada a la enfermedad *in vivo*.

40

En otro caso, se puede administrar cierto antígeno específico de la enfermedad junto con un agonista de CD40 o un agonista de TLR. El agente terapéutico puede ser un anticuerpo, en particular, un anticuerpo CD40 o LPS u oligodesoxinucleótidos CpG. En otros casos, el agente terapéutico es una molécula pequeña, un polipéptido, ADN o ARN que interactúa con el receptor CD40 de los linfocitos B o los TLR.

45

Se puede usar cualquier antígeno de cualquier enfermedad, trastorno o afección de acuerdo con los métodos de la invención. Los antígenos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, virus bacterianos, parásitos, alérgenos, autoantígenos y antígenos asociados a tumores. Si se usa una vacuna a base de ADN, el antígeno normalmente estará codificado por una secuencia de la construcción de ADN administrada. Como alternativa, si el antígeno se administra como un conjugado, el antígeno normalmente será una proteína comprendida en el conjugado administrado. En particular, el antígeno puede incluir antígenos proteicos, péptidos, organismos inactivados enteros, y similares.

50

Los ejemplos específicos de antígenos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, antígenos de hepatitis A, B, C o D, virus de la gripe, *Listeria*, *Clostridium Botulinum*, tuberculosis, tularemia, *Variola major* (viruela), fiebres hemorrágicas víricas, *Yersinia pestis* (peste), VIH, herpes, virus del papiloma y otros antígenos asociados con agentes infecciosos. Otros antígenos incluyen antígenos asociados con afecciones autoinmunitarias, afecciones inflamatorias, alergia, asma y rechazo al trasplante. Se proporcionan ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias, *infra*. Como se ha señalado anteriormente, se puede administrar una población de linfocitos B10 sensibilizada con un antígeno específico de la enfermedad sola o junto con otros agentes terapéuticos, tales como un agonista de CD40 o TLR, en particular, un anticuerpo CD40, para su uso como una vacuna terapéutica o profiláctica para tratar una enfermedad o para suprimir la inmunidad. De igual manera, una composición de linfocitos B expandidos sensibilizada con una enfermedad o un antígeno específico del microbio puede conferir inmunidad contra dichas enfermedades o dichos microbios.

60

En otro caso, un subconjunto de linfocitos B10 puede sensibilizarse con antígeno de un posible donante de trasplante, para aumentar los niveles de producción de IL-10 por los linfocitos B10 en un receptor de trasplante. El aumento de la

65

producción de IL-10 por el subconjunto de linfocitos B10 en el receptor del trasplante produce una respuesta inmunitaria/inflamatoria reducida al trasplante en el receptor del trasplante. El papel de los linfocitos B10 en los trasplantes se describe más detalladamente a continuación.

5 MÉTODOS DE USO DE LAS COMPOSICIONES DE LINFOCITOS B EXPANDIDOS

Las composiciones de linfocitos B expandidos pueden usarse en métodos de tratamiento de sujetos que tienen una enfermedad o afección. Dicha transferencia adoptiva de linfocitos B, y en particular, de linfocitos B10, puede ser eficaz para suprimir una amplia variedad de enfermedades, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias o cualquier otra enfermedad que pueda tratarse mediante la introducción de una población de linfocitos B o linfocitos B10 en un sujeto. La transferencia adoptiva de linfocitos B o linfocitos B10 puede emplearse además para reducir al mínimo la respuesta inmunitaria/inflamatoria asociada con el trasplante de células y/o tejidos.

En un protocolo ilustrativo de transferencia adoptiva, se extrae una población mixta de células inicialmente de un donante diana. Adecuadamente, se seleccionan los linfocitos B, más adecuadamente, se seleccionan los linfocitos B10 y B10pro del sujeto. Las células aisladas del donante pueden aislarse de cualquier lugar del donante en donde residan, incluyendo, pero sin limitación, la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos y/o la médula ósea del donante como se ha descrito más detalladamente con anterioridad. Dependiendo de la aplicación, las células pueden extraerse de un donante sano; un donante que padezca una enfermedad que se encuentre en un período de remisión o durante una enfermedad activa; o de los órganos, la sangre o los tejidos de un donante que haya fallecido. En el caso de este último, el donante es un donante de órganos. En otro caso más, las células se pueden obtener del sujeto, expandirse y/o activarse y devolverse al sujeto.

Los linfocitos extraídos pueden separarse mediante citometría de flujo u otras técnicas de separación celular basadas en marcadores de linfocitos B o marcadores de células específicas de los linfocitos B10, tales como los descritos anteriormente (por ejemplo, CD1d, CD5, CD24 y CD27), y luego transfundirse a un receptor. Véanse también las solicitudes internacionales n.º PCT/US2009/002560, PCT/US2011/46643 y PCT/US2011/066487. Como alternativa, las células pueden almacenarse para un uso futuro. En un caso, el donante y el receptor son el mismo sujeto. En otro caso, el donante es un sujeto distinto del receptor. En otro caso adicional de dicha realización, el "donante" comprende múltiples donantes distintos del receptor, en donde los linfocitos B10 de dichos múltiples donantes se agrupan. Como se ha analizado anteriormente, los linfocitos B obtenidos del donante se expanden usando los métodos proporcionados en el presente documento. Las células también se pueden enriquecer o hacer que produzcan niveles elevados de IL-10 mediante métodos disponibles para los expertos en la materia antes de su administración a un receptor.

En los métodos de uso de los linfocitos B expandidos contemplados en el presente documento, en donde el donante es un sujeto diferente al receptor, el receptor y el donante son histocompatibles. La histocompatibilidad es la propiedad de tener los mismos, o casi los mismos, alelos de un conjunto de genes denominado complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Estos genes se expresan en la mayoría de los tejidos como antígenos. Cuando las células y/o los tejidos trasplantados son rechazados por un receptor, la mayor parte de la respuesta del sistema inmunitario se inicia a través de las proteínas MHC. Las proteínas MHC participan en la presentación de antígenos foráneos a los linfocitos T, y los receptores de la superficie de los linfocitos T son especialmente adecuados para el reconocimiento de proteínas de este tipo. Los MHC son muy variables entre individuos y, por lo tanto, los linfocitos T del hospedador pueden reconocer el MHC foráneo con una frecuencia muy alta que conduce a potentes respuestas inmunitarias que provocan el rechazo del tejido trasplantado. Cuando el receptor y el donante son histocompatibles, se reduce al mínimo la posibilidad de rechazo de la población de linfocitos B10 por parte del receptor.

La cantidad de linfocitos B o linfocitos B10 que será eficaz en el tratamiento y/o la supresión de una enfermedad o un trastorno que puede tratarse mediante la introducción de una población de linfocitos B o linfocitos B10 en un sujeto puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de la composición que se administre, del fin de introducir la población de linfocitos B o linfocitos B10, del tratamiento previo que el receptor haya recibido, del historial clínico del receptor y de su estado actual, así como del juicio del médico tratante. Por ejemplo, la dosis específica para un sujeto en particular depende de la edad, del peso corporal, del estado general de salud, de la dieta, del momento y de la vía de administración, de la velocidad de excreción, de los medicamentos usados en combinación y de la gravedad del trastorno en particular en el que se aplica el tratamiento. Las dosis para un paciente dado pueden determinarse usando consideraciones convencionales, por ejemplo, mediante la comparación habitual de las actividades diferenciales de la composición de la divulgación, tal como por medio de un protocolo farmacológico o profiláctico convencional apropiado. El número de células administradas en la composición también puede determinarse empíricamente.

La población de los linfocitos B10 se puede administrar en regímenes de tratamiento compatibles con la enfermedad, por ejemplo, una sola dosis o unas cuantas dosis durante uno o varios días para mejorar un estado patológico o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para inhibir la progresión de la enfermedad y prevenir la recurrencia de la misma. Por ejemplo, la composición puede administrarse dos o más veces separadas por 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, una semana, dos semanas, o por tres o más semanas. La dosis exacta que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración, de la gravedad de la

enfermedad o del trastorno, y de si la enfermedad es de naturaleza crónica y debe decidirse de acuerdo con el juicio del profesional y las circunstancias de cada paciente.

La dosis máxima para un sujeto es la dosis más alta que no causa efectos secundarios no deseados o intolerables. El número de variables con respecto a un régimen profiláctico o de tratamiento individual es grande, y se espera un intervalo considerable de dosis. La vía de administración también afectará a los requisitos de dosificación. Se anticipa que las dosis de las composiciones reducirán los síntomas de la afección al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con los síntomas previos al tratamiento o los síntomas que no se tratan. Se contempla específicamente que las preparaciones y las composiciones farmacéuticas pueden paliar o aliviar los síntomas de la enfermedad sin proporcionar una cura, o, en algunas realizaciones, pueden usarse para curar la enfermedad o el trastorno. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales. Las dosis no luminosas, ilustrativas, que podrían usarse en el tratamiento de sujetos humanos varían de al menos 4×10^4 , al menos 4×10^5 , al menos 4×10^6 , al menos 4×10^7 , al menos 4×10^8 , al menos 4×10^9 o al menos 4×10^{10} linfocitos B/m². En una realización específica, la dosis usada en el tratamiento de sujetos humanos varía de aproximadamente 4×10^8 a aproximadamente 4×10^{10} linfocitos B.

Para su uso en los métodos descritos en el presente documento, las composiciones pueden administrarse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, intraperitoneal, intravenoso parenteral, intramuscular, subcutáneo o intratecal. Por lo tanto, las composiciones pueden formularse adecuadamente como una formulación inyectable. La administración de las composiciones a un sujeto de acuerdo con la invención parece presentar efectos beneficiosos de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, dentro de amplios límites, se espera que la administración de cantidades mayores de las composiciones logre mayores efectos biológicos beneficiosos que la administración de una cantidad menor. Por otra parte, también se contempla la eficacia a dosis por debajo del nivel al que se observa toxicidad.

En otro caso, los linfocitos B o los linfocitos B10 obtenidos del donante pueden introducirse en un receptor en la ubicación deseada, para dirigirse específicamente a los efectos terapéuticos de la población de linfocitos B o linfocitos B10, es decir, la producción de IL-10 o la secreción de anticuerpos. Dichas técnicas se pueden lograr usando dispositivos de modulación inmunitaria implantables, por ejemplo, ganglios linfáticos virtuales, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0118630; la solicitud internacional n.º WO1999/044583; y la patente de EE.UU. n.º 6.645.500. De acuerdo con dicha realización, se puede aislar una población de linfocitos B o linfocitos B10 de un donante como se ha descrito anteriormente, añadirse a un dispositivo de modulación inmunitaria implantable, y luego, dicho dispositivo puede implantarse en un receptor en un lugar donde se requieran los efectos terapéuticos de la población de linfocitos B o linfocitos B10, es decir, producción de anticuerpos o de IL-10.

Por los términos "tratar" "tratando" o "tratamiento de" (o las expresiones gramaticalmente equivalentes) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce, o al menos se mejora parcialmente y/o que se logra un cierto alivio, mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico y/o que hay una inhibición o un retraso en la progresión de la afección y/o en la prevención o en el retraso del inicio de una enfermedad o dolencia. Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento de" también significan controlar una enfermedad o un trastorno autoinmunitario. Por lo tanto, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento de" (o las expresiones gramaticalmente equivalentes) se refieren tanto a regímenes de tratamiento tanto profilácticos como terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad suficiente" o "una cantidad suficiente para" lograr un determinado resultado se refiere a un número de linfocitos B, linfocitos B10 o linfocitos efectoros B10 de la invención que es eficaz para producir un efecto deseado, que opcionalmente es un efecto terapéutico (es decir, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz). Por ejemplo, una "cantidad suficiente" o "una cantidad suficiente para" puede ser una cantidad que sea eficaz para modificar la gravedad del estado del sujeto.

Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento es una cantidad que proporciona alguna mejora o beneficio para el sujeto. Como alternativa, se establece que una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporciona un cierto alivio, mitigación y/o disminución de al menos un síntoma clínico. Los síntomas clínicos asociados con los trastornos que pueden tratarse mediante los métodos de la invención son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, los expertos en la materia apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando se brinde algún beneficio al sujeto. Es probable que el número de células "terapéuticamente eficaces" necesarias para "tratar" a un individuo dependa de la fuente de los linfocitos B, del estado inmunológico del paciente en el momento de la extracción de sangre, del estado del individuo en el momento del tratamiento y del nivel de tratamiento terapéutico con fármacos o agentes inmunosupresores en el momento del tratamiento, tal como lo conocen los expertos en la materia.

ENFERMEDADES O AFECCIONES ESPECÍFICAS QUE SE PUEDEN TRATAR EN LOS MÉTODOS ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

Las enfermedades y afecciones asociadas con niveles disminuidos de IL-10 pueden tratarse de acuerdo con este caso de la divulgación. Se han demostrado niveles reducidos de IL-10 en enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias que incluyen, pero sin limitación, psoriasis (Asadullah *et al.*, 1998, *J. Clin. Investig.* 101:783-94, Nickoloff *et al.*, 1994,

Clin. Immunol. Immunopathol., 73:63-8, Mussi *et al.* 1994, *J. Biol. Regul. Homeostatic Agents*), artritis reumatoide (Jenkins *et al.*, 1994, *Lymphokine Cytokine Res.* 13:47-54; Cush *et al.*, 1995, *Arthritis Rheum.* 38:96-104; Al Janadi *et al.*, 1996, *J. Clin. Immunol.* 16:198-207), dermatitis alérgica de contacto (Kondo *et al.*, 1994, *J. Investig. Dermatol.* 103:811-14; Schwarz *et al.*, 1994, *J. Investig. Dermatol.* 103:211-16), enfermedad intestinal inflamatoria (Kuhn *et al.*, 1993, *Cell* 75:263-74; Lindsay y Hodgson, 2001, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15:1709-16) y esclerosis múltiple (Barrat *et al.*, 2002, *J. Exp. Med.* 195:603-16; Cua *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:602-8; Massey *et al.*, 2002, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87:357-72; Link y Xiao, 2001, *Immunol. Rev.* 184:117-28).

Cualquier tipo de enfermedad autoinmunitaria puede tratarse de acuerdo con este método como se desvela. La expresión "enfermedad o trastorno autoinmunitario" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por la lesión celular, de tejidos y/u órganos causada por una reacción inmunitaria del sujeto hacia sus propias células, tejidos y/u órganos. La expresión "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto, caracterizada por inflamación, preferentemente, inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con la inflamación. Por otra parte, la inflamación puede estar provocada o no por un trastorno autoinmunitario. Por lo tanto, algunos trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunitarios como inflamatorios.

Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación: dermatitis alérgica de contacto, reacciones alérgicas a fármacos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de las glándulas suprarrenales, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso y enfermedades cutáneas asociadas, cardiomiopatía, enfermedad celíaca, dermatitis celíaca, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, venulitis cutánea necrotizante, lupus discoide, eritema multiforme, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática/autoinmunitaria (PTI), enfermedad pulmonar inmunológica, enfermedad renal inmunológica, nefropatía de IgA, artritis juvenil, líquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Memere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 y mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, trastornos relacionados con el pénfigo (por ejemplo, pénfigo vulgar), anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, espondiloartropatías, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus eritematoso, vasculitis sistémica, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, trombocitopenia, tiroiditis, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tal como vasculitis herpetiforme con dermatitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

De acuerdo con ciertos casos, el paciente o la población de pacientes tratados con las composiciones de linfocitos B10 descritas en el presente documento pueden tener una enfermedad o un trastorno autoinmunitario con una determinada actividad. La actividad de una enfermedad o de un trastorno autoinmunitario puede medirse evaluando múltiples factores que son conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de determinación de la actividad de una enfermedad o de un trastorno autoinmunitario en un paciente en relación con una escala de actividad son bien conocidos en la técnica y pueden usarse en conexión con las composiciones farmacéuticas y los métodos descritos en el presente documento.

Por ejemplo, se puede usar la puntuación del Colegio Americano de Reumatólogos (Puntuación ACR) para determinar la actividad de la artritis reumatoide de un paciente o de una población de pacientes. De acuerdo con este método, los pacientes reciben una puntuación que se correlaciona con la mejora. Por ejemplo, los pacientes con una mejora del 20 % en los factores definidos por la ACR recibirían una puntuación ACR20. Este y otros métodos de puntuación pueden usarse en combinación con los métodos de evaluación de la función de los linfocitos B10 descritos en el presente documento.

ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y ALÉRGICAS

Cualquier tipo de enfermedad inflamatoria puede tratarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas.

Los métodos de la divulgación abarcan terapias que están destinadas a tratar enfermedades asociadas con una respuesta inflamatoria mediada por T (Th) 1 auxiliares, pero no enfermedades asociadas con una respuesta inflamatoria mediada por Th2. En un caso alternativo, los métodos de la divulgación engloban terapias dirigidas a tratar enfermedades asociadas con una respuesta inflamatoria mediada por Th2, pero no enfermedades asociadas con una respuesta inflamatoria mediada por Th1.

TRASPLANTE

- IL-10 es capaz de inhibir la lesión por isquemia/reperfusión (Deng *et al.*, 2001, *Kidney Int.* 60:2118-28), enfermedad de injerto contra hospedador y mortalidad relacionada con el trasplante (Baker *et al.*, 1999, *Bone Marrow Transplant* 23:1123-9, Holler *et al.*, 2000, *Bone Marrow Transplant* 25:237-41). Como tal, un caso implica el tratamiento de enfermedades/afecciones asociadas al trasplante mediante el aumento del nivel de IL-10 en un paciente que lo necesite.
- En un caso, los niveles de IL-10 endógena se aumentan en un sujeto que recibe un trasplante de órgano mediante la administración de un subconjunto de linfocitos B10 tal como linfocitos B10 creados mediante los métodos descritos en el presente documento. La población de los linfocitos B10 puede aislarse del propio paciente, es decir, el sujeto es el donante. Como alternativa, la población de linfocitos B10 puede aislarse de un donante que no sea el sujeto. El donante de los linfocitos B10 puede ser el mismo que el donante de órganos, o la población de linfocitos B10 puede agruparse de varios donantes.
- El régimen de tratamiento y la dosis usados con las composiciones y los métodos de la divulgación se seleccionan en función de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, la manifestación clínica que sitúa a un paciente en riesgo de desarrollar el rechazo humoral o celular, o la evidencia clínica de que se está desarrollando dicho rechazo. El término "humoral" y la expresión "mediado por anticuerpos" se usan indistintamente en el presente documento. Los criterios para evaluar el riesgo de que un paciente desarrolle rechazo humoral o celular se establecen de acuerdo con el conocimiento y la habilidad de la técnica. En un caso, una prueba cruzada positiva de citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad dependiente del complemento potenciada con anti-globulina indica que un paciente tiene un alto riesgo de rechazo humoral. En un caso, una prueba cruzada positiva o una prueba cruzada positiva previa de citotoxicidad dependiente del complemento o de citotoxicidad dependiente del complemento potenciada con anti-globulina indica que un paciente tiene un riesgo intermedio de sufrir rechazo humoral. En un caso, una prueba cruzada negativa indica que un paciente tiene un bajo riesgo de sufrir rechazo humoral. De igual manera, existen criterios establecidos conocidos por los expertos en la materia para establecer el riesgo de rechazo de trasplante celular.
- En otro caso, un receptor de trasplante que necesita profilaxis contra el rechazo del injerto puede identificarse como un paciente o una población de pacientes que tengan aloanticuerpos circulantes anti-HLA detectables antes del trasplante. En otro caso, se identifica que el paciente o la población de pacientes tienen anticuerpos reactivos de panel antes del trasplante. La presencia de aloanticuerpos anti-HLA circulantes detectables en un receptor de trasplante tras el trasplante también se puede usar para identificar al paciente o a la población de pacientes que necesitan tratamiento para el rechazo humoral o celular. El paciente o la población de pacientes que necesitan tratamiento para el rechazo humoral o celular también se pueden identificar de acuerdo con otros criterios clínicos que indiquen que un receptor de trasplante está en riesgo de desarrollar rechazo humoral o celular, o que ya ha desarrollado rechazo humoral o celular. Una etapa temprana de rechazo humoral también puede ser una reacción silenciosa caracterizada por aloanticuerpos anti-donante circulantes y deposición de C4d, o un rechazo subclínico caracterizado por aloanticuerpos anti-donante circulantes, deposición de C4d y patología tisular. En fases posteriores, el receptor se identifica como un paciente o una población de pacientes que presentan indicaciones clínicas de rechazo humoral o celular caracterizadas de acuerdo con el conocimiento y la habilidad en la técnica, por ejemplo, mediante aloanticuerpos anti-donante circulantes, deposición de C4d, patología tisular y/o infiltrados de células inflamatorias, y disfunción del injerto.
- La presente divulgación proporciona composiciones, formulaciones terapéuticas, métodos y regímenes eficaces para reducir la incidencia, gravedad o duración de la enfermedad del injerto contra hospedador (EICH), o un episodio de rechazo humoral o celular. En determinados casos, las composiciones y los métodos de la invención son eficaces para atenuar la respuesta del hospedador a la lesión por reperfusión isquémica de un tejido sólido o injerto de órgano. En una realización preferida, las composiciones de linfocitos efectores B10 y los métodos de la invención son eficaces para prolongar la supervivencia de un injerto en un receptor de trasplante.
- La presente divulgación abarca injertos que son autólogos, alogénicos o xenogénicos para el receptor. Los tipos de injertos abarcados por la divulgación incluyen injertos de tejidos y órganos, incluyendo, pero sin limitación, injertos de médula ósea, injertos periféricos de células madre, injertos de piel, injertos arteriales y venosos, injertos de células de islotes pancreáticos, trasplantes de órganos tales como de riñón, hígado, pulmón, páncreas, tiroides y corazón, e injertos de tejidos compuestos que incluyen tejidos de múltiples sistemas de órganos, incluyendo, entre otros, dedos, extremidades, regiones del cuerpo y tejidos faciales. Los términos "injerto" y "trasplante" se usan indistintamente en el presente documento. En un caso, el injerto autólogo es un injerto de médula ósea, un injerto arterial, un injerto venoso o un injerto de piel. En un caso, el aloinjerto es un injerto de médula ósea, un injerto de córnea, un trasplante de riñón, un trasplante de células de islotes pancreáticos, o un trasplante combinado de riñón y páncreas. En un caso, el injerto es un xenoinjerto, preferentemente, en donde el donante, es un cerdo. Las composiciones y los métodos de la presente divulgación también pueden usarse para suprimir una respuesta inmunitaria perjudicial a un injerto o implante no biológico, incluyendo, pero sin limitación, una articulación artificial, un stent o un dispositivo marcapasos.
- Las composiciones de linfocitos efectores B10 y los métodos de la divulgación se pueden usar para tratar o prevenir la EICH, o el rechazo humoral o celular sin tener en cuenta las indicaciones particulares que inicialmente generan la

necesidad del trasplante o el tipo particular de tejido trasplantado. Sin embargo, las indicaciones que dieron lugar a la necesidad de un trasplante y el tipo de tejido trasplantado pueden proporcionar una base para un régimen terapéutico integral para el tratamiento o la prevención de la EICH y el rechazo del injerto, cuyo régimen integral comprende las composiciones de linfocitos efectores B10 y los métodos de la invención.

Las formulaciones terapéuticas y los regímenes de la presente divulgación se describen en otra parte para tratar sujetos humanos con otras afecciones. De igual manera, un experto en la materia puede determinar los regímenes de tratamiento apropiados para el paciente o la población de pacientes en particular. En casos particulares, el régimen de tratamiento es un régimen de acondicionamiento previo al trasplante, un régimen de mantenimiento posterior al trasplante o un régimen de tratamiento posterior al trasplante para el rechazo agudo o crónico. En determinados casos, el régimen particular varía para un paciente que se evalúa como aquel que tiene un riesgo alto o medio de desarrollar una respuesta inmunitaria humoral o celular, en comparación con el régimen para un paciente que se evalúa como aquel con un bajo riesgo de desarrollar una respuesta humoral o celular dirigida contra el trasplante.

En determinados casos, el régimen particular varía según la fase de rechazo del trasplante, con una terapia más agresiva indicada para pacientes en fases posteriores de rechazo humoral o celular. Las fases del rechazo humoral se pueden clasificar de acuerdo con el conocimiento y la habilidad en la técnica. Por ejemplo, las fases de rechazo humoral pueden clasificarse como una de las fases I a IV de acuerdo con los siguientes criterios: respuesta latente en la fase I, caracterizada por aloanticuerpos circulantes anti-donante, en especial, anticuerpos anti-HLA; reacción silenciosa en la fase II, caracterizada por aloanticuerpos circulantes anti-donante, en especial, anticuerpos anti-HLA y deposición de C4d, pero sin cambios histológicos o disfunción del injerto; rechazo subclínico en la fase III: caracterizado por aloanticuerpos circulantes anti-donante, en especial, anticuerpos anti-HLA, deposición de C4d y patología tisular, pero sin disfunción del injerto; rechazo humoral en fase IV: caracterizado por aloanticuerpos circulantes anti-donante, en especial, anticuerpos anti-HLA, deposición de C4d, patología tisular y disfunción del injerto. De igual manera, los criterios para el rechazo celular son conocidos por los expertos en la materia.

Se pueden generar curvas de respuesta a la dosis usando protocolos convencionales en la técnica para determinar la cantidad eficaz de las composiciones para usar en un determinado régimen, por ejemplo, en regímenes de acondicionamiento antes del trasplante y en regímenes posteriores al trasplante para la profilaxis y el tratamiento de la EICH, o el rechazo humoral o celular. En general, los pacientes con alto riesgo de desarrollar rechazo humoral o celular y aquellos que ya presentan uno o más indicadores clínicos de rechazo requerirán dosis más altas y/o dosis más frecuentes que pueden administrarse durante períodos de tiempo más largos en comparación con los pacientes que no están en alto riesgo o que no presentan ninguna indicación de rechazo activo.

Las composiciones de linfocitos efectores B10 y los métodos de la divulgación se pueden poner en práctica para tratar o prevenir la EICH, o el rechazo humoral o celular, ya sea solas o en combinación con otros agentes terapéuticos o regímenes de tratamiento. Otros regímenes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de la EICH, o el rechazo humoral o celular, pueden comprender, por ejemplo, uno o más de entre terapia anti-linfocitos, terapia con esteroides, terapia de agotamiento de anticuerpos, terapia de inmunosupresión y plasmaféresis. La terapia anti-linfocitos puede comprender la administración al receptor del trasplante de globulinas anti-timocitos, también conocidas como timoglobulina. La terapia anti-linfocitos también puede comprender la administración de uno o más anticuerpos monoclonales dirigidos contra los linfocitos T e incluyendo los antígenos de superficie de los linfocitos B. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, OKT3™ (muromonab-CD3), CAMPATH™-1H (alemtuzumab), CAMPATH™-1G, CAMPATH™-1M, SIMULECT™ (basiliximab) y ZENAPAX™ (daclizumab).

La terapia con esteroides puede comprender la administración al receptor del trasplante de uno o más esteroides seleccionados del grupo que consiste en cortisol, prednisona, metilprednisolona, dexametazona e indometacina. Preferentemente, uno o más de los esteroides son corticosteroides, incluyendo sin limitación, cortisol, prednisona y metilprednisolona.

La terapia de agotamiento de anticuerpos puede incluir, por ejemplo, la administración al receptor del trasplante de inmunoglobulina intravenosa. La terapia de agotamiento de anticuerpos también puede comprender la terapia de inmunoadsorción aplicada al injerto ex vivo, antes del trasplante. La inmunoadsorción se puede realizar usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, afinidad a la proteína A, o técnicas de afinidad basadas en anticuerpos que usan anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie de los linfocitos T o linfocitos B tales como anticuerpos anti-CD3.

La terapia de inmunosupresión puede comprender la administración de uno o más agentes inmunosupresores tales como inhibidores de la transcripción de citocinas (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolimus), síntesis de nucleótidos (por ejemplo, azatiopurina, micofenolato de mofetilo), transducción de señales del factor de crecimiento (por ejemplo, sirolimus, rapamicina) y el receptor de IL-2 de los linfocitos T (por ejemplo, daclizumab, basiliximab). En una realización particular, un agente inmunosupresor usado en combinación con las composiciones y los métodos de la invención incluye uno o más de los siguientes: adriamicina, azatiopurina, busulfán, ciclofosfamida, ciclosporina A ("CyA"), citoxina, fludarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, micofenolato de mofetilo (MOFETIL), antiinflamatorios no esteroides (AINE), rapamicina y tacrolimus (FK506). Los agentes inmunosupresores también pueden comprender inhibidores del complemento, por ejemplo, receptor-1 del complemento soluble, anticuerpo anti-C5, o un inhibidor de

molécula pequeña de C1s, por ejemplo, como se describe en Buerke *et al.* (*J. Immunol.*, 167: 5375-80 (2001)). En un caso, las composiciones y los métodos de la divulgación se usan en combinación con uno o más regímenes terapéuticos para suprimir el rechazo humoral o celular, incluyendo, aunque sin limitación, terapia con tacrolimus y micofenolato de mofetilo, inmunoadsorción, terapia de inmunoglobulina intravenosa y plasmaféresis.

Se proporcionan composiciones y métodos para tratar y prevenir la EICH y el rechazo humoral o celular en receptores de trasplantes humanos. Las composiciones y los métodos pueden usarse independientemente de las indicaciones particulares que dieron lugar a la necesidad de un trasplante. De igual manera, el uso de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento para el tratamiento y la prevención de GVHD, y el rechazo humoral o celular no está limitado por el tipo particular de tejido que se pretende trasplantar o que ha sido trasplantado.

En un caso, se proporcionan composiciones y métodos para la prevención del rechazo humoral o celular en un receptor de trasplante humano, en donde el receptor del trasplante se identifica como un paciente o una población de pacientes con mayor riesgo de desarrollar rechazo humoral o celular. Dichos pacientes también pueden denominarse "sensibilizados". Los criterios para la identificación de pacientes sensibilizados son conocidos por los expertos en la materia. Dichos criterios pueden incluir, por ejemplo, pacientes con niveles detectables de anticuerpos circulantes contra los antígenos HLA, por ejemplo, aloanticuerpos anti-HLA. Dichos criterios también pueden incluir pacientes que han sido sometidos a trasplantes previos, una gestación o múltiples transfusiones de sangre. Los pacientes que tienen un mayor riesgo de rechazo humoral también incluyen aquellos que tienen una compatibilidad imperfecta del HLA entre donante y receptor, y aquellos trasplantes que son incompatibles en el ABO. Los individuos sensibilizados son candidatos preferidos para el pretratamiento o el acondicionamiento antes del trasplante. Los individuos sensibilizados también son candidatos preferidos para los regímenes de mantenimiento posteriores al trasplante para la prevención del rechazo humoral y celular.

En un caso, las composiciones de linfocitos B10 y los métodos de la divulgación comprenden o se usan en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de un rechazo agudo o crónico. El rechazo puede caracterizarse como rechazo humoral o celular en fase I, fase II, fase III o fase IV.

En un caso, las composiciones de los linfocitos B10 y los métodos de la divulgación comprenden o se usan en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de un rechazo humoral en fase temprana. En casos particulares, el rechazo humoral en fase temprana es rechazo en fase I, II o III. Las indicaciones clínicas de un rechazo humoral en fase temprana se determinan de acuerdo con el conocimiento y la habilidad en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, el desarrollo en el paciente de anticuerpos anti-HLA circulantes específicos del donante, la presencia de marcadores complementarios de la actividad de los anticuerpos tales como depósitos de C4d y C3d en biopsias de injerto, y la presencia de anticuerpos anti-HLA en biopsias de injerto. Otros indicadores de un rechazo humoral en fase temprana son conocidos por el experto y pueden incluir, por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos anti-endoteliales, en especial, de anticuerpos anti-vimentina, y el desarrollo de aloanticuerpos no clásicos de la cadena A relacionada con MHC de clase I (MICA). En un caso, las composiciones y los métodos comprenden o se usan en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento del rechazo humoral o celular caracterizado en parte por la disfunción del injerto. En casos particulares, el paciente o la población de pacientes que necesitan tratamiento para el rechazo humoral o celular se identifica de acuerdo con los criterios conocidos en la técnica para la disfunción del injerto. En otros casos, el paciente o la población de pacientes que necesitan tratamiento para el rechazo humoral o celular se identifica de acuerdo con otros criterios que son particulares para el tipo de emisión de tejido, tales como criterios histológicos. Los expertos en la materia conocen estos criterios.

TRATAMIENTO DE SUJETOS QUE RECIBEN AGENTES BIOLÓGICOS

También se desvelan métodos de tratamiento de sujetos que reciben proteína/s terapéutica/s o xenogénica/s, recombinantes. Los métodos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos B10 descritos en el presente documento a un sujeto que necesita tratamiento para un trastorno genético, trasplante, alergia, inflamación o trastorno autoinmunitario. En particular, los linfocitos B10 pueden administrarse junto con un agente biológico u otro agente terapéutico para el que un sujeto puede desarrollar o ha desarrollado anticuerpos anti-fármaco.

A medida que sigue aumentando el número de terapias biológicas que llegan al entorno clínico, existe una creciente apreciación de que los receptores con frecuencia desarrollan respuestas inmunitarias a estos fármacos, lo que tiene un posible impacto clínico en la eficacia del fármaco. Las respuestas inmunitarias a los agentes biológicos, en general, se controlan mediante la detección y caracterización de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y la evaluación de las asociaciones de los ADA con la exposición al fármaco, y la eficacia y seguridad del fármaco. La detección de los ADA no significa necesariamente que habrá consecuencias clínicas. Hay, sin embargo, un número creciente de ejemplos en los que los ADA pueden desafiar la eficacia del fármaco y la seguridad del paciente.

Así pues, las composiciones de linfocitos B10 pueden usarse en combinación con (la administración conjunta, proporcionada antes o después de) una terapia biológica para evitar la producción de ADA.

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS B10

En el presente documento, también se desvelan métodos de evaluación de la función de los linfocitos B10 en un sujeto. Los métodos incluyen la extracción de linfocitos B de un sujeto como se ha analizado anteriormente para los métodos de expansión de los linfocitos B *ex vivo* y el cultivo de las células en presencia de un agonista de CD40 e IL-21. Cualquiera de los métodos para expandir linfocitos B descritos en el presente documento puede usarse para evaluar la función de los linfocitos B10 en el sujeto. Después de poner en contacto las células con IL-21, las células se analizan para determinar si son capaces de producir IL-10. Se puede determinar el porcentaje de células capaces de producir IL-10 y/o la cantidad de IL-10 producida por las células. La determinación puede realizarse después de poner en contacto las células con IL-21 o después de poner en contacto las células con otra molécula estimuladora o combinación de moléculas tales como un antígeno o LPS. La determinación del porcentaje de células que producen IL-10 o la cantidad de IL-10 que se produce puede determinarse mediante cualquier método disponible para un experto en la materia.

La cantidad de IL-10 o el porcentaje de células que producen IL-10 se pueden determinar y comparar con un control. Adecuadamente, el control es un control normal que comprende linfocitos B de un donante sano tratados de manera similar a las células obtenidas del sujeto. Como alternativa, el control puede estar representado por un intervalo numérico en el que se espera que estén las células donantes sanas. La función de los linfocitos B10 del sujeto puede ser normal, hiperactiva o deficiente en comparación con un donante sano. Los linfocitos B10 son normales si el porcentaje de linfocitos B10 capaces de producir IL-10 en la etapa (c) es más/menos 2 o adecuadamente 3 desviaciones típicas del porcentaje medio de los linfocitos B10 capaces de producir IL-10 en una población normal. Los linfocitos B10 son deficientes si el porcentaje de linfocitos B10 capaces de producir IL-10 en la etapa (c) es más de 2 desviaciones típicas, adecuadamente, más de 3 desviaciones típicas inferior al porcentaje medio de los linfocitos B10 capaces de producir IL-10 en una población normal. Los linfocitos B10 son hiperactivos si el porcentaje de linfocitos B10 capaces de producir IL-10 en la etapa (c) es más de 2 desviaciones típicas, adecuadamente, más de 3 desviaciones típicas superior al porcentaje medio de linfocitos B10 capaces de producir IL-10 en una población normal. Si la función de los linfocitos B10 no es normal, el método se puede usar para diagnosticar al sujeto o indicar que el sujeto tiene o es probable que tenga una enfermedad o afección que afecte a la función de los linfocitos B10.

Los siguientes ejemplos pretenden ser solo ilustrativos y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención ni de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Para identificar las señales que regulan los linfocitos B10 *in vivo*, se cultivaron linfocitos B purificados con citocinas que se sabe que influyen en la función de los linfocitos B. La estimulación con IL-21, pero no con IL-4, -6, -10, -12, -23 o -27, indujo frecuencias de linfocitos B10 de 2,7 a 3,2 veces superiores y una secreción de IL-10 de 4,4 a 5,3 veces superior ($p < 0,01$) a las 48 y 72 h, respectivamente, mientras que el interferón- γ (IFN- γ) o el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) redujo las frecuencias de linfocitos B IL-10+ en un 56 % ($p < 0,05$; Fig. 1A). De hecho, IL-21 indujo a los linfocitos B10 a producir IL-10 sin necesidad de estimulación *in vitro* (Fig. 5A) e indujo la secreción de IL-10 de los linfocitos B a niveles similares a la estimulación con lipopolisacárido (LPS) (Fig. 1A). IL-21 también indujo un aumento de 3 veces en los linfocitos B IL-10+ dentro del subconjunto de linfocitos B CD1d^{alto}CD5+ del bazo que está enriquecido en los linfocitos B10pro y B10, pero no indujo un número significativo de linfocitos B IL-10+ entre el subconjunto de CD1d^{bajo}CD5+ (Fig. 1B). Hubo poca o ninguna división detectable de los linfocitos B en los ensayos de 48 o 72 h cuando las células se cultivaron con citocinas solas. Incluso cuando se añadieron mitógenos tales como el anticuerpo anti-IgM o LPS para inducir la proliferación de los linfocitos B, siguió habiendo poca proliferación a las 48 h, aunque los linfocitos B10 son las células más proliferativas a las 72 h. IL-21 no potenció la supervivencia de los linfocitos B10, pero, en cambio, aceleró la apoptosis de las células distintas de los linfocitos B10, mientras que los linfocitos B10 predominantemente se salvaron. El resultado neto fue que el número de linfocitos B10 fue aumentado preferentemente por la IL-21 en relación con otras citocinas. De acuerdo con esto, IL-21 induce la apoptosis o la diferenciación de los linfocitos B de una manera dependiente del contexto, impulsando la diferenciación *in vitro* y la expansión de los linfocitos B activados de manera más completa. Véase Spolski, R. y Leonard, W. J. "Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity", *Annu Rev Immunol* 26, 57-79 (2008) y Ozaki, K. *et al.* "Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6". *J. Immunol.* 173, 5361-5371 (2004). También se sabe que IL-21 es un potente inductor de la producción de IL-10 de los linfocitos T, y la IL-21 derivada de los linfocitos T desempeña múltiples funciones importantes en la función efectora de los linfocitos B. Tanto los linfocitos B10 como las células diferentes de los linfocitos B10 expresaron el receptor IL-21 de la superficie celular (IL-21R) a niveles similares (Fig. 1C). A pesar de ello, los números *ex vivo* de los linfocitos B10 y B10+ B10pro y B CD1d^{alto}CD5+ fueron similares en los ratones deficientes en IL-21 R (IL-21 R^{-/-}), de tipo silvestre, MHC-II^{-/-} y CD40^{-/-} (Fig. 5B-D). Sin embargo, se requirió la expresión de IL-21R para la expansión de los linfocitos B10 tras inmunizaciones con péptido de glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MGG₃₅₋₅₅) para inducir la EAE (Fig. 1D). Por lo tanto, las señales generadas por IL-21R indujeron la secreción de IL-10 de los linfocitos B *in vivo* e *in vitro*, y fueron necesarias para la expansión de los linfocitos B10 *in vivo*.

El hecho de si los linfocitos B10 requieren la IL-21 para inducir su función reguladora *in vivo*, se determinó mediante la transferencia adoptiva de linfocitos B IL-21R^{-/-} en ratones CD19^{-/-} antes de la inducción de la EAE mediante inmunización con MGG₃₅₋₅₅. Debido a que los ratones CD19^{-/-} son deficientes en linfocitos B10 (Fig. 1D), la gravedad de su enfermedad EAE es peor (Fig. 2A). La transferencia adoptiva de los linfocitos B CD1d^{alto}CD5+ de tipo silvestre

normalizó la gravedad de la EAE en los ratones CD19^{-/-}. Por el contrario, la transferencia de los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones IL-10^{-/-} o IL-21R^{-/-}, o linfocitos no B10 CD1d^{bajo}CD5⁻ de tipo silvestre no alteró la enfermedad. Debido a que los linfocitos T CD4⁺ son una importante fuente de IL-21, se determinó si las interacciones de los linfocitos B10 y T afines también controlaban la supresión de la EAE mediada por los linfocitos B10. La transferencia de los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones MHC-II^{-/-} o CD40^{-/-} a ratones CD19^{-/-} antes de las inmunizaciones con MOG no redujo la gravedad de la enfermedad EAE (Fig. 2A, dos paneles de la derecha inferior). Los linfocitos B CD1d^{bajo}CD5⁻ de ratones IL-21R^{-/-}, CD40^{-/-} o MHC-II^{-/-} tampoco tuvieron efecto. La EAE también se agravó en ratones de tipo silvestre empobrecidos en linfocitos B maduros por los mAb CD20. Sin embargo, la transferencia de los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones CD20^{-/-}, pero no de ratones MHC-II^{-/-} CD20^{-/-} normalizó la gravedad de la enfermedad en este modelo, y los linfocitos B CD1d^{bajo}CD5⁻ de ratones CD20^{-/-} o MHC-II^{-/-} CD20^{-/-} no tuvieron efecto (Fig. 2B). De igual manera, la transferencia adoptiva de linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ activados *in vitro* de ratones de tipo silvestre redujo significativamente la gravedad de la enfermedad EAE en ratones de tipo silvestre, mientras que los linfocitos B MHC-II^{-/-} CD1d^{alto}CD5⁺ o CD1d^{bajo}CD5⁻ de tipo silvestre no tuvo efecto (Fig. 2C). Por lo tanto, la función reguladora de los linfocitos B10 requería la expresión de IL-10, la señalización de IL-21R, así como las interacciones de CD40 y MHC-II, explicando potencialmente la función efectora de los linfocitos B10 específicos del antígeno.

La IL-10 producida por los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ activados inhibe la expresión de IFN-γ y TNF-α de los linfocitos T CD4⁺ específicos del antígeno *in vitro*. Para determinar si las interacciones de los linfocitos B10 y T afines regulan la proliferación de los linfocitos T específicos del antígeno *in vivo*, se evaluó la función de los linfocitos B10 en ratones CD19^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ tras la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4⁺ marcados con colorante de ratones transgénicos que expresaban receptores de antígeno (TCR^{MOG}) específicos del péptido MOG₃₅₋₅₅. Véase Bettelli, E. *et al.* "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis". *J. Exp. Med.* 197, 1073-1081 (2003). Los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones de tipo silvestre sin tratamiento previo redujeron significativamente la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ TCR^{MOG} medida por la dilución de colorante *in vivo* (Fig. 3A). Los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ obtenidos de ratones con EAE fueron inhibidores aún más potentes de la proliferación de los linfocitos T, mientras que los linfocitos B CD1d^{bajo}CD5⁻ de ratones de tipo silvestre o los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones IL-10^{-/-}, IL-21R^{-/-}, CD40^{-/-} o MHC-II^{-/-} no tuvieron efecto. Los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones de tipo silvestre sin tratamiento previo o expuestos al antígeno también redujeron significativamente la producción de IFN-γ e IL-17 de linfocitos T TCR^{MOG} CD4⁺ en ratones CD19^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅, mientras que los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ de ratones IL-10^{-/-}, IL-21R^{-/-}, CD40^{-/-} o MHC-II^{-/-} no lo hicieron (Fig. 3B). La capacidad de los linfocitos B10 para inhibir la producción de IL-17 de los linfocitos T es particularmente importante, ya que los linfocitos T T_H17 patógenos inducen la EAE y pueden producir IL-21. La mayoría de los linfocitos T auxiliares foliculares aislados de ratones con EAE inducida por MOG₃₅₋₅₅ también expresa IL-21, y los ratones CD19^{-/-} tienen linfocitos T auxiliares foliculares (Fig. 6). Por lo tanto, los linfocitos B10 y T pueden requerir interacciones íntimas durante la producción recíproca de IL-10 e IL-21 para regular óptimamente la enfermedad específica del antígeno (Fig. 3C).

Aunque los linfocitos T foliculares auxiliares son una probable fuente de IL-21, actualmente no hay indicios de que los linfocitos B10 sean constituyentes del centro germinal, y la mayoría de los datos argumentan en contra de ello. En primer lugar, los BCR de los linfocitos B10 son predominantemente de línea germinal y contienen frecuencias modestas de mutaciones de IgV_H e IgV_L. Masada, D. *et al.* "Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production *in vivo*". *J. Immunol.* 188, 1036-1048 (2012). En segundo lugar, los números de los linfocitos B10 se expanden temprano durante la inducción de la EAE, antes de la generación de los centros germinales. Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y. y Tedder, T. F. "Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling EAE initiation and late-phase immunopathogenesis". *J. Immunol.* 185, 2240-2252 (2010). En tercer lugar, la expresión de GL-7 de los linfocitos B10 se asemeja a los linfocitos B foliculares del bazo y no a los linfocitos B del centro germinal GL-7^{alto}. Matsushita, 2010. Asimismo, una característica distintiva de los ratones transgénicos con un número de linfocitos B10pr0+ B10 drásticamente expandido es la ausencia de centros germinales y poco o ningún cambio de isotipo de los linfocitos B, incluso después de las inmunizaciones. Poe, J. C. *et al.* "Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice". *PLoS ONE* 6, e22464 (2011). Los linfocitos B10 en estos ratones también se encuentran en la zona marginal y en las áreas foliculares del bazo.

Para verificar que las señales de IL-21 y CD40 derivadas de los linfocitos T impulsan la expansión de los linfocitos B10 y la producción de IL-10, se cultivaron linfocitos B usando condiciones para potenciar la expansión de los linfocitos B10 de ratón *in vivo* y la expansión de los linfocitos B *in vitro*. Véase Poe, 2011 y Nojima, T. *et al.* "In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells *in vivo*". *Nature Comm.* 2, 465 (2011). Se cultivaron linfocitos B en monocapas NIH-3T3 que expresaban el ligando de los linfocitos T para CD40 (CD154) y BLyS en presencia de IL-4 durante 4 días para inducir la maduración de los linfocitos B10pro en linfocitos B10 competentes para IL-10. Luego, se cultivaron linfocitos B en células NIH-3T3-CD154/BLyS nuevas con IL-21 exógena durante 5 días, que fueron esenciales para expandir óptimamente los linfocitos B10 e inducir la producción de IL-10 (Fig. 4A). Tras el período de cultivo de 9 días, los números de linfocitos B y B10 aumentaron en 25.000 y 4.000.000 veces, respectivamente, con el 38 % de los linfocitos B que producen activamente IL-10 (Fig. 4B). La gran mayoría de los linfocitos B IL-10+ de los cultivos expresaron CD5 (Fig. 4C), lo que facilita su purificación y subraya el efecto drástico de IL-21 sobre el número de linfocitos B10 *in vitro*.

Los linfocitos B10 CD5⁺ expandidos *in vitro* conservaron su función reguladora. La transferencia de linfocitos B10 CD5⁺

redujo drásticamente la gravedad de la enfermedad EAE en los ratones de tipo silvestre, incluso cuando se administran tras la aparición de los síntomas de la enfermedad, mientras que los linfocitos B CD5⁻ no tuvieron efecto (Fig. 4D). Aunque la expansión *in vitro* de los linfocitos B10 requirió señales de IL-21R y CD40, no se requirió la expresión de MHC-II (Fig. 4E). Sin embargo, los linfocitos B10 MHC-II^{-/-}CD5⁺ expandidos *in vitro* e los linfocitos B IL-10^{-/-}CD5⁺ no regularon la gravedad de la enfermedad EAE (Fig. 4F), documentando aún más la necesidad de IL-10 e interacciones afines en la regulación de las enfermedades mediadas por los linfocitos T. Los linfocitos B10 no se expandieron durante los cultivos *in vitro* de los linfocitos B de ratones CD19^{-/-} o ratones transgénicos MD4 que tenían un BCR fijo específico de la lisozima del huevo (Fig. 4E), lo que subraya aún más la importancia de la especificidad de BCR y de la señalización en la generación de los linfocitos B10. De otra manera, los linfocitos B10 efectores expandidos *in vitro* fueron potentes reguladores tanto del inicio como de la progresión de la enfermedad.

Este estudio demuestra que las señales de CD40 inducen la adquisición de los linfocitos B10pro de la competencia IL-10, impulsando la IL-21 la expansión de los linfocitos B10 y la generación de células efectoras. Estos puntos de control críticos en el desarrollo de los linfocitos B10 pueden conducir a la producción localizada de IL-10 que atenúa las respuestas de los linfocitos T específicos del antígeno durante las interacciones afines (Fig. 3C) sin inmunosupresión desfavorable. La producción transitoria de IL-10 por los linfocitos B10 *in vivo* puede restringir aún más los efectos de la secreción de IL-10. Los linfocitos efectores B10 también pueden regular las respuestas de los linfocitos T a los autoantígenos además de MOG una vez que la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ inicia la inflamación y la destrucción tisular. Dado que los linfocitos B10 humanos y de ratón también son potentes reguladores de la función de las células dendríticas y los macrófagos, la inducción por los linfocitos T de los linfocitos B10 efectores también puede contribuir a la resolución de la EAE al restringir la activación de los monocitos y de las células dendríticas. Estos resultados colectivos pueden explicar en parte por qué la EAE se agrava en ausencia de señalización de IL-21. Por el contrario, TGF- β e IFN- γ pueden contrarrestar la expansión de los linfocitos B10 *in vivo* en función de los hallazgos *in vitro* actuales (Fig. 1A). Los linfocitos T reguladores proporcionan una capa de regulación independiente durante LA EAE, pues su expansión, acumulación en el sistema nervioso central y actividad supresora son normales cuando los linfocitos B10 están ausentes. La recapitulación *in vitro* de estas señales colectivas indujo una expansión de varios millones de veces de los linfocitos B10 y su maduración funcional a linfocitos B10 efectores potentes que revirtieron la enfermedad autoinmunitaria establecida (Fig. 4). Además de la especificidad de BCR, la expresión de MHC-II siguió siendo un punto de control importante para la función reguladora de los linfocitos efectores B10 durante la EAE (Fig. 4F), como se describió por primera vez para los monocitos reguladores de tipo 11. Dado que la autoinmunidad tiene orígenes multigénicos, y los autoantígenos varían según el paciente y la enfermedad, la expansión *in vitro* del raro grupo de linfocitos efectores B10pro y B10 de sangre humana puede proporcionar una potente inmunoterapia en el futuro para los individuos con enfermedad autoinmunitaria grave.

Expansión de los linfocitos B10 humanos *in vitro*. Para determinar si las señales de IL-21 y CD40 impulsan la expansión de los linfocitos B10 humanos *in vitro*, se cultivaron linfocitos B de sangre purificados (1×10^6 /ml) en monocapas confluentes de células NIH-3T3 tratadas con mitomicina C que expresan el ligando de los linfocitos T de ratón para CD40 (mCD154) y BLYS humano (hBLYS) en presencia de IL-4 humana (2 ng/ml) durante 7 días para inducir la maduración de linfocitos B10pro a linfocitos B10 competentes para IL-10. Los linfocitos B se cultivaron luego en monocapas de células NIH-3T3-mCD154/hBLYS nuevas con IL-21 humana exógena (10 ng/ml) durante 5 días. Las células NIH-3T3 que expresan CD154 de ratón se usaron tanto para los estudios en ratones como en seres humanos, porque CD154 de ratón se une a CD40 humano (Bossen *et al.* 2006 *J. Biol. Chem.* 281: 13964-13971) y el CD154 de ratón puede inducir señales a través de CD40 humano y de ratón (Armitage *et al.*, 1992 *Nature* 357: 80-82 y Yasui *et al.*, 2002 *Intl. Immunol.* 14:319-329). Por el contrario, El CD154 humano no se une al CD40 del ratón (Bossen *et al.*, 2006). Se usó BLYS humano para la expansión de los linfocitos B humanos y de ratón, porque BLYS humano parece unirse a receptores tanto humanos y de ratón (BCMA, TACI y BAFF-R) de manera similar (Bossen *et al.* 2006)). Tras el período de cultivo de 12 días, el número de los linfocitos B aumentó en 130 ($\pm$ 17) veces, mientras que el número de los linfocitos B10 se aumentó en 5-6.000 veces, expresando un 13-16 % de los linfocitos B IL-10 tras 5 h de estimulación con éster de forbol, ionomicina y Brefeldina-A (Fig. 7). Estos resultados son paralelos a primeros resultados de los presentes inventores con la expansión *in vitro* de los linfocitos B de ratón y los linfocitos efectores B10, e indican que este sistema de cultivo es trasladable a los seres humanos.

Como ocurrió con los estudios de los presente inventores realizados con ratones, se requerirá un perfeccionamiento adicional del sistema de cultivo y de los protocolos para la máxima expansión de los linfocitos efectores B10 y linfocitos B de la sangre humana. Se han realizado avances significativos en el desarrollo de un sistema de cultivo celular homólogo para la expansión *ex vivo* de los linfocitos B10 humanos. Después de evaluar el crecimiento y las propiedades morfológicas de los fibroblastos primarios humanos y las estirpes de células del estroma de nivel BSL1, los presentes inventores han identificado dos estirpes celulares que soportan la agrupación y proliferación robusta de los linfocitos B de sangre humana. Tras transfecciones estables para inducir la expresión de CD154 humano y BLYS humano seguida de series repetidas de selección de clones, se han identificado subclones de la estirpe de células epiteliales humanas A549 y la estirpe de células del estroma de médula ósea humana HS-5 que tienen una capacidad paralela a la de las células 3T3 para soportar la expansión de los linfocitos B. Como en el sistema de cultivo de linfocitos B10 de ratón, no todas las estirpes de células alimentadoras o sus subclones tienen la capacidad de soportar la expansión de los linfocitos B/linfocitos B10 a pesar de la expresión estable y equivalente de CD154/BLYS. Se requieren series de subclonación para aislar clones apropiados que sean genéticamente estables y soporten la expansión de los linfocitos B *ex vivo* a través de factores solubles y/o asociados a la membrana no identificados. Por ejemplo, dos

clones hermanos de células A549-CD154/BLyS derivadas del mismo subclón de células individuales parentales difieren drásticamente en sus capacidades para soportar la supervivencia y expansión de los linfocitos B *in vitro* (Fig. 8). A pesar de la expresión estable de CD154/BLyS y numerosas series de selección, la estirpe de células endoteliales EA.hy926 humana no pudo soportar una expansión adecuada de los linfocitos B. También se están desarrollando
 5 otras estirpes celulares humanas de nivel BSL1 de diferentes orígenes tisulares como posibles células estromales, incluyendo la estirpe de fibroblastos humanos SK-LMS-1.

Factores suplementarios de células alimentadoras que participan en la expansión de los linfocitos B *ex vivo*.

Los hallazgos realizados por los presentes inventores durante la expansión *in vitro* de los linfocitos B humanos y de
 10 ratón, y de los linfocitos efectores B10, demuestran que este sistema de cultivo es trasladable a los seres humanos, pero no depende únicamente de la adición de IL-4 e IL-21 exógenas, o de la expresión de células alimentadoras de CD154 y BLyS. Cada uno de estos factores debe optimizarse para obtener la expansión máxima de los linfocitos B y linfocitos B10, y las diferentes subpoblaciones de los linfocitos B responden de manera diferente a los niveles graduados de interacciones CD40-CD154 (Neron *et al.*, 2005 *Immunology* 116: 454-463). Asimismo, se anticipa que
 15 es posible añadir factores adicionales a los cultivos o expresarse por las células alimentadoras para optimizar aún más la expansión de los linfocitos B y B10.

Lo más importante es que no todos los fibroblastos NIH-3T3 (Swiss) de ratón, fibroblastos 3T3-Balb/c de ratón o células
 20 endoteliales EA Hy.926 humanas (Li *et al.*, 1998 *J. Exp. Med.* 188:1385-1390 y Edgell *et al.*, 1983 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 80: 3734-3737) son equivalentes. Por ejemplo, los fibroblastos CD154⁺BLyS⁺ NIH-3T3 y 3T3-Balb/c fueron capaces de inducir una activación y proliferación drásticas de los linfocitos B, adhiriéndose la mayoría de los linfocitos B activados a las células del estroma, y formando grandes grupos de tipo racimo. Por el contrario, las células endoteliales EA Hy.926 solo fueron capaces de inducir una activación impresionante de los linfocitos B, y los linfocitos B activados no se adhirieron a las células del estroma. Sin embargo, posteriormente se determinó que las células EA
 25 Hy.926 no expresaban la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), mientras que ambas estirpes celulares de fibroblastos expresaban constitutivamente VCAM-1 (Tabla 1; a continuación). Curiosamente, se determinó que la adhesión de los linfocitos B a las células del estroma es necesaria para su activación inicial y expansión en el sistema de cultivo. La VCAM-1 es fundamental para las interacciones moleculares entre las células del estroma y los precursores de los linfocitos B que conducen a la linfohematopoyesis B (Kincade *et al.*, 1989 *Annu. Rev. Immunol.* 7:111-143 y Kincade 1992 *Semin Immunol* 3:379-390). De igual manera, se requiere la unión a CD44 del ácido hialurónico y, potencialmente, otras moléculas para la adhesión de los linfocitos B a las células del estroma de la médula ósea y la posterior linfohematopoyesis en cultivos de médula ósea a largo plazo (Lesley *et al.* 1992 *J. Med.* 175:257-266.). Los fibroblastos NIH-3T3 y 3T3-Balb/c expresan constitutivamente CD44 (Tabla 1). Por lo tanto, las
 30 células del estroma eficaces deben expresar moléculas de superficie celular apropiadas y/o proporcionar un sustrato apropiado para la unión de los linfocitos B. De este modo, las células del estroma para una expansión óptima de los linfocitos B y B10 expresarían mínimamente CD154, BLyS, VCAM-1 y CD44, u otras moléculas funcionalmente equivalentes, con la adición de IL-4 e IL-21 exógenas o estas citocinas producidas por las células del estroma a niveles optimizados.

Los cultivos de células del estroma transfectadas que se seleccionaron funcionalmente para una expresión óptima de
 40 CD154 y BLyS pudieron apoyar la expansión de los linfocitos B, pero había una tremenda heterogeneidad entre diferentes transfectantes de lotes, clones individuales y sus subclones a pesar de la expresión similar de CD154 y BLyS. La enorme heterogeneidad en las capacidades de los diferentes transfectantes para apoyar la expansión de los linfocitos B se explicó finalmente por el hallazgo de los presentes inventores de que había una heterogeneidad celular y funcional extrema dentro de cada población de células del estroma CD154⁺ BLyS⁺. Aunque no fuera de esperar, se
 45 sabe que las células del estroma pueden expresar moléculas de señalización y secretar citocinas, que pueden responder a algunas de esas moléculas de señalización y a las propias citocinas, que pueden responder a las citocinas exógenas añadidas a los cultivos, y que pueden mantener el potencial de diferenciación dependiendo de sus condiciones de cultivo.

Dentro de las presentes poblaciones de células del estroma transfectadas, se determinó que solo un subconjunto de
 50 las células podía mantener la adhesión robusta de los linfocitos B y la expansión clonal, con una frecuencia que, por lo común, fue <1 % de las células del estroma a pesar de que todas las células expresaban CD154 y secretaban BLyS. En general, estos cultivos de células del estroma fueron capaces de inducir la expansión de los linfocitos B en
 55 <20 veces. Sin embargo, el aislamiento mecánico permitió aislar células óptimas que mantenían de manera uniforme la expansión de los linfocitos B en un amplio rango de hasta 25.000 veces como se ha descrito anteriormente (Fig. 4). Las células del estroma optimizadas para el crecimiento máximo de los linfocitos B y linfocitos B10 pueden aislarse mecánicamente basándose en las características fenotípicas, morfológicas y de crecimiento. Por ejemplo, fue posible enriquecer las células del estroma que tenían una mayor capacidad para mantener la expansión de los linfocitos B
 60 mediante el aislamiento de las células del estroma individuales que mantenían la adhesión de los linfocitos B y la formación de rosetas. Los medios mecánicos adicionales para aislar células del estroma óptimas para la expansión de los linfocitos B pueden incluir técnicas de clonación de células individuales, aislamiento mediante citometría de flujo de las células en función de su expresión o pérdida de moléculas de la superficie celular, y/u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia, con la posterior identificación funcional de las células del estroma que mantienen la
 65 expansión óptima de los linfocitos B.

El microambiente de la médula ósea y las células del estroma puede influir positiva o negativamente en la proliferación de un precursor de los linfocitos B o de los linfocitos B, diferencia o sufre apoptosis. Por ejemplo, varias estirpes celulares del estroma que mantienen el crecimiento de los linfocitos suprimen la apoptosis espontánea de las células pre-B hasta en un 90 %, mientras que otros clones de células del estroma pueden inducir la apoptosis de los linfocitos, o pueden parecer inertes. Borghesi *et al.* 1997 *J Immunol* 159:4171-4179. Se han realizado observaciones similares para las células del estroma usadas para la expansión de los linfocitos B en los presentes estudios. Como ejemplos, se muestran tres clones representativos que expresan CD154 de ratón y BLYS humano con un clon transfectado de células progenitoras 3T3-Balb/c y dos clones transfectados (1 y 2) derivados de células NIH-3T3 parentales (Tabla 1). En el momento de estos estudios, las células 3T3-Balb/c del clon n.º 1 mantuvieron la expansión óptima de los linfocitos B en comparación con los clones 1 y 2 de origen celular NIH-3T3, que fueron relativamente menos eficaces. El análisis de micromatrices de estos tres clones en comparación con sus células 3T3 parentales demostró una considerable heterogeneidad molecular entre las células cultivadas en condiciones idénticas. La expresión de algunas moléculas estaba regulada bien al alza o a la baja, lo que se correlacionó con la expansión óptima de los linfocitos B. Sin embargo, el nivel de heterogeneidad molecular entre los subclones fue el hallazgo más inesperado. A continuación, se ilustran ejemplos de las diferencias moleculares que probablemente sean funcionales.

Las moléculas que se regularon al alza en las células 3T3 con el potencial de expandir significativamente los linfocitos B incluían CD24, también conocido como antígeno termoestable en el ratón. CD24 es una proteína de membrana anclada a glucosilfosfatidilinositol de peso molecular heterogéneo que varía de 30 a 70 kDa. La proteína madura tiene solo de 27 a 30 aminoácidos de longitud, y la mayor parte del peso molecular de la proteína consiste en una glicosilación extensa ligada a N y a O. CD24 es expresado por los linfocitos B y sus precursores y neutrófilos, en tejido neuronal y en ciertas células epiteliales. CD24 funciona como una molécula de adhesión de tipo mucina que puede facilitar y regular las interacciones célula-célula. La expresión aumentada de IL-7 de células del estroma por las células 3T3-Balb/c del clon n.º 1 puede ser fundamental para la expansión de los linfocitos B10 y B. IL-7 normalmente es producida a niveles extremadamente bajos por las células del estroma, pero es un estímulo esencial para la replicación temprana de los precursores de los linfocitos B y otras funciones fundamentales del desarrollo. Las células 3T3-Balb/c del clon n.º 1 también expresaron estimulante de macrófagos 1 (Mst1), también conocido como quinasa de tipo Ste20 o STK4 (serina treonina quinasa 4), el ortólogo humano de hipopótamo *Drosophila*. STK4 es un componente central activado por la caspasa 3 de una vía altamente conservada que controla el crecimiento celular y la apoptosis. Curiosamente, los linfocitos y neutrófilos de ratones deficientes en STK4 presentan una mayor pérdida del potencial de membrana mitocondrial y una mayor susceptibilidad a la apoptosis. Mst1 también tiene funciones cruciales en la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales durante el tráfico de los linfocitos *in vivo*, y los ratones Mst1^{-/-} tienen tejidos linfoides periféricos hipotróficos y linfocitos B de la zona marginal reducidos en el bazo. La proteína linfopoyetina estromal tímica (Tslp) es producida principalmente por ciertas células del estroma y fibroblastos, y actúa sobre las células de linaje mieloide para producir factores que influyen en el desarrollo del linaje de los linfocitos T y ciertos subconjuntos de linfocitos T, incluyendo los linfocitos T reguladores. TSLP también puede mantener la diferenciación de los linfocitos B de los progenitores hematopoyéticos fetales. Se propone que TSLP señala a través de un complejo receptor heterodimérico compuesto por el receptor TSLP y la cadena α de IL-7R, lo que sugiere que TSLP e IL-7 pueden influir en algunas vías de señalización en común.

Es probable que múltiples moléculas de células del estroma influyan negativamente en la proliferación, diferenciación e interacciones de los linfocitos B con las células del estroma, o induzcan su apoptosis. CD99 es expresado por las células endoteliales, así como por la mayoría de los leucocitos, incluyendo los linfocitos B. CD99 funciona como una molécula de adhesión y también interactúa con la molécula intracelular de ciclofilina A, que está intrincadamente implicada en las vías de señalización inflamatoria. Se han demostrado interacciones homotípicas CD99-CD99 entre los monocitos y las células endoteliales durante la diapédesis. La señalización de CD99 puede ser perjudicial para la expansión de los linfocitos B, ya que la ligadura de CD99 en los linfocitos B tempranos usando un anticuerpo monoclonal anti-CD99 induce apoptosis. De manera análoga, la señalización de CD99 induce la apoptosis de los linfocitos T en desarrollo en el timo. Las interacciones entre el homólogo del ratón de CD99 (designado D4) y su ligando, receptor de tipo inmunoglobulina de tipo 2 pareado (PILR) expresado ampliamente por leucocitos, es un mecanismo principal que induce la apoptosis de los timocitos.

Como segundo ejemplo, la expresión inducida por el factor de crecimiento transformante beta (Tgfb β) fue regulada a la baja tanto por las células 3T3-Balb/c del clon n.º 1 como por las células NIH-3T3 del clon n.º 1 en comparación con sus células parentales. La proteína inducida por el factor de crecimiento transformante beta (TGFB β) es una proteína secretada que contiene RGD inducida por el factor de crecimiento transformante beta que se une a los colágenos de tipo I, II y IV, y, por lo tanto, puede inhibir la adhesión celular. Los motivos RGD se encuentran en muchas proteínas de la matriz extracelular que modulan la adhesión celular, y el motivo sirve como una secuencia de reconocimiento de ligandos para varias integrinas durante las interacciones de célula-colágeno. TGFB β puede inhibir las interacciones adhesivas que regulan el crecimiento invasivo de las células de melanoma. La pérdida de la expresión de TGFB β se ha implicado en la proliferación celular, la progresión tumoral y la angiogénesis.

En un tercer ejemplo, las transcripciones de células del estroma CXCR7 se regularon a la baja tanto en las células 3T3-Balb/c del clon n.º 1 como en las células NIH-3T3 del clon n.º 1. CXCR7 (anteriormente RDC1) funciona como un receptor para la quimiocina CXCL12 (anteriormente SDF-1), que se une a los linfocitos B y puede regular un espectro de procesos normales y patológicos. CXCR7 puede funcionar como un receptor neutralizador de CXCL12 que también

es producido normalmente por ambas estirpes celulares parentales 3T3. De este modo, la pérdida de células del estroma de la expresión de CXCR7 puede facilitar la unión de CXCL12 a los linfocitos B en el sistema de cultivo.

Las proteínas reguladoras de la diferenciación de la superficie celular también pueden ser contraproducentes para la expansión óptima de los linfocitos B. La expresión de tipo delta 1 y Jagged 1 y su receptor compartido Notch 1 se regularon a la baja en las células 3T3-Balb/c del clon n.º 1 en comparación con las células parentales no transfectadas. Las proteínas Notch, de tipo Delta y Jagged desempeñan papeles fundamentales en el desarrollo y la activación de los linfocitos B. Por ejemplo, el acoplamiento de Notch-1 en los linfocitos B por parte de la proteína de tipo Delta 1 expresada en las células del estroma potencia la diferenciación de los linfocitos B en células secretoras de anticuerpos, mientras que las interacciones de Notch-1 con Jagged-1 son inhibidoras en este proceso. También, las interacciones entre Notch y la proteína de tipo Delta 1 actúan en sinergia con el receptor de antígeno de los linfocitos B y la señalización de CD40 para potenciar la proliferación de los linfocitos B y el cambio de isotipo. Además, el desarrollo de los linfocitos B de la zona marginal requiere de manera fundamental interacciones de tipo Delta 1 con Notch-2 expresada en los linfocitos B. Otros aspectos del desarrollo de los linfocitos B están regulados negativamente por interacciones las Notch/tipo Delta/Jagged. Por ejemplo, se ha informado que los fibroblastos 3T3 que expresan la proteína de tipo Delta-1 actúan como células del estroma para la diferenciación de los adipocitos, pero solo admite la diferenciación temprana de los linfocitos B cuando se suprime la expresión de tipo Delta o si también se proporciona interleucina-7 (IL-7) a los cultivos. Por lo tanto, el papel del eje Notch/tipo Delta/Jagged en el desarrollo y la función de los linfocitos B10 puede ser complejo, pero estas proteínas pueden ser reguladoras fundamentales de la expansión de los linfocitos B y los linfocitos B10.

Las células del estroma para la expansión máxima de los linfocitos B y los linfocitos B10 pueden, por lo tanto, expresar óptimamente densidades apropiadas de CD154, BlyS, VCAM-1 y CD44, u otras moléculas funcionalmente equivalentes, junto con la expresión óptima de algunas o todas las moléculas descritas en la Tabla 1 en combinación con IL-4 e IL-21 exógenas añadidas a los cultivos. Como cada una de las moléculas que influyen en la expansión de los linfocitos B y B10 están mejor definidas, será fundamental evaluar la función de cada molécula en combinación con otros factores expresados endógenamente por las células del estroma y los estímulos exógenos añadidos a los cultivos. Los efectos acumulativos de estos reguladores positivos y negativos también dependerán del momento en el que se presenten estas señales durante la expansión de los linfocitos B y B10.

Tabla 1. Transcripciones expresadas por células del estroma optimizadas para la expansión de linfocitos B y linfocitos B10

Símbolo del gen	Título del gen	Cambio en veces-	3T3-Balb/e		NIH 3T3-Swiss		
			Clon 1	Parental	clon 1	clon 2	Parental
	Capacidad relativa para la expansión de los linfocitos B10				++	+	
Regulados al alza							
Cd24a	antígeno CD24a	10,13	3197	439	647	238	147
Cd24a	antígeno CD24a	6,05	5318	1317	1814	676	370
Cd24a	antígeno CD24a	4,12	960	336	439	181	m
117	interleucina 7	20,19	647	83	24	24	23
117	interleucina 7	3,66	67	17	24	17	17
Mst1	estimulador de macrófagos 1	4,90	208	48	46	37	39
Tslp	linfopoyético del estroma tímico	1,23		20	355	74	38
Regulado a la baja;							
Cd99	antígeno CD99	-9,26	67	682	902	545	448
Cd99	antígeno CD99	-9,43	65	631	892	529	481
Cd99	antígeno CD99	-22,14	35	899	1244	670	508
Cxcr7	receptor 7 de quimiocinas (motivo C-X-C)	-73,82	12	1684	55	2445	2543
Dlk1	homólogo 1 de tipo delta (<i>Drosophila</i>)	-4,31	56	750	201	227	96
Dlk1	homólogo 1 de tipo delta (<i>Drosophila</i>)	-89,03	59	11502	8915	6262	1191
Jag1	jagged 1	-2,37	43	98	358	57	54
Jag1	jagged 1	-11,34	29	493	1755	103	128
Jag 1	jagged 1	-53,26	18	2094	5614	149	434
Notch1	homólogo 1 del gen Notch (<i>Drosophila</i>)	-12,74	50	599	754	661	547
Notch1	homólogo 1 del gen Notch (<i>Drosophila</i>)	-4,01	68	242	318	265	272
Tgfb1	factor de crecimiento transformante, inducido por beta	-14,43	13	192	19	586	570
Tgfb1	factor de crecimiento transformante, inducido por beta	-14,62	16	182	26	785	772
Tgfb1	factor de crecimiento transformante, inducido por beta	-36,28	11	539	11	2062	2196
Tgfb1	factor de crecimiento transformante, inducido por beta	-9,38	46	395	30	1815	1663
Constitutivo:							
Cd44	antígeno CD44	1,30	416	688	123	308	403
Cd44	antígeno CD44	-1,41	2061	5511	1508	2911	2937
Cd44	antígeno CD44	-2,12	1826	5671	2410	4120	3991
Vcam1	molécula de adhesión a células vasculares 1	-1,94	193	326	1496	224	179
Vcam1	molécula de adhesión a células vasculares 1	-2,16	132	347	778	152	162
Vcam1	molécula de adhesión a células vasculares 1	-2,43	396	803	5015	545	388
Vcam1	molécula de adhesión a células vasculares 1	-2,43	396	803	5015	545	388

(continuación)

Se extrajo el ARN total de células 3T3 parentales y sus subclones transfectados con ADNc usando TRIzol ((Invitrogen-Molecular Probes), con niveles de transcripción relativos cuantificados en paralelo mediante análisis GeneChip (Asymetrix Mouse Genome 430 2.0 GeneChips; Affymetrix, Santa Clara, CA). Se confirmó que todos los parámetros de calidad para las matrices estaban en el intervalo recomendado por el fabricante. Se muestran los niveles de expresión relativa lineales para cada línea. Se muestran los resultados para sondas reiterativas en cada chip genético.

MÉTODOS

- 5 **Ratones.** Los ratones C57BL/6, IL-10^{-/-} (B6.129P2-I//0^{tm/Cg}/J) (Kuhn, *et al.*, "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis". *Cell* 75, 263-274 (1993)), CD40^{-/-} (B6.129P2-CD40^{tm/Krk}/J) y MD4 (C57BL/6-Tg(Tghe/MD4)4Ccg/J) eran de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones MHC-II^{-/-} (B6.129-H2-Ab1^{tm/Jae}B2 m^{mGr}N17) (Taconic Farms, Inc., Hudson, NY) eran según lo descrito (Grusby, M. J. *et al.* "Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90, 3913-3917 (1993)).
- 10 Los ratones CD19^{-/-} se retrocruzaron sobre el fondo C57BL/6 durante 14 generaciones. Véase Sato, S., Ono, N., Steeber, D. A., Pisetsky, D. S. y Tedder, T. F. "CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity". *J. Immunol.* 157, 4371-4378 (1996) y Sato, S., Steeber, D. A., Jansen, P. J. y Tedder, T. F. "CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19". *J. Immunol.* 158, 4662-4669 (1997). Los ratones IL-21R^{-/-} fueron como se describe. Véase Ozaki, K. *et al.* "A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production". *Science* 298, 1630-1634 (2002). Los ratones transgénicos TCR^{MOG} ((Bettelli, E. *et al.* "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis". *J. Exp. Med.* 197, 1073-1081 (2003)) Thy1.2⁺, proporcionados por el Dr. V. K. Kuchroo, Harvard Medical School, Boston, MA) se cruzaron con ratones C57BL/6.Thy1.1 para generar linfocitos T que expresaran Thy1.1. Todos los ratones fueron criados en una
- 20 instalación de barrera específica libre de patógenos, y se usaron a las 6-12 semanas de vida. El Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Duke aprobó todos los estudios.

- Preparación de las células.** Se generaron suspensiones unicelulares de bazo y ganglios linfáticos periféricos (pares axilares e inguinales) mediante disección suave, pasándose las células a través de filtros para células de 70 mm (BD Biosciences, San Diego, CA), seguido de la centrifugación en gradiente de hypercoll (70/37 %). Los linfocitos se recogieron de la superficie de contacto de 37:70 % y se lavaron. Se usó MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) para purificar las poblaciones de los linfocitos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron microperlas recubiertas con mAb CD19 y kits de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ (Miltenyi Biotech) para purificar los linfocitos B y linfocitos T CD4⁺, respectivamente. Cuando fue necesario, las células se enriquecieron por segunda vez usando una
- 30 columna de MACS nueva para obtener > 95 % de pureza celular.

- Análisis de inmunofluorescencia.** Los anticuerpos monoclonales CDId conjugados con FITC, PE, PE-Cv5, PE-Cy7 o APC (1B1), CD4 (H129.19), CD5 (53-7.3), CD19 (1D3), B220 (RA3-6B2) y Thy1.1 (OX-7) fueron de BD Biosciences. El anticuerpo monoclonal IL-21R conjugado con PE (4A9) era de BioLegend (San Diego, CA). La tinción intracelular
- 35 usó anticuerpos monoclonales reactivos con IL-10 (JES5-J6E3), IL-17 (17B7) e IFN-γ (XMG1.2) (todos de eBioscience) y kits Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). La tinción de fondo se evaluó usando anticuerpos monoclonales de control con isotipo compatible, no reactivos, (Caltag Laboratories, San Francisco, CA). Para los análisis de inmunofluorescencia de dos a seis colores, se tiñeron suspensiones de células individuales (10⁶ células) a 4 °C usando concentraciones de anticuerpos monoclonales óptimas predeterminadas durante 20 minutos como se describe. Véase
- 40 Yanaba *et al.* 2008, *Immunity* 28, 639-650; Matsushita *et al.* 2008, *J. Clin. Invest.* 118, 3420-3430; Matsushita *et al.* 2010, *J. Immunol.* 185, 2240-2252; Matsushita y Tedder 2011, *Methods Mol. Biol.* 677, 99-111; y Zhou *et al.* 1994, *Mol. Cell. Biol.* 14, 3884-3894. Se lisaron eritrocitos sanguíneos tras la tinción usando la solución de lisis FACS™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

- 45 La expresión intracelular de IL-10 de los linfocitos B se visualizó mediante tinción de inmunofluorescencia y se analizó mediante citometría de flujo como se describe. Véase Yanaba *et al.* 2008, *Immunity* 28, 639-650, y Matsushita y Tedder 2011, *Methods Mol. Biol.* 677, 99-111. En resumen, se volvieron a suspender leucocitos aislados o células purificadas (2 x 10⁶ células/ml) en medio completo (medio RPMI 1640 que contenía FCS al 10 %, penicilina a 200 µg/ml, 200 U/ml de estreptomycin, L-Glutamina 4 mM y 2-mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M, todo de Gibco, Carlsbad, CA) con LPS (10 µg/ml, *Escherichia coli* serotipo 0111: B4, Sigma), PMA (50 µg/ml; Sigma), ionomicina (500 ng/ml; Sigma) y monensina (2 µM; eBioscience) durante 5 h en placas de fondo plano de 48 pocillos. En algunos experimentos, las células se incubaron durante 48 h con un anticuerpo monoclonal CD40 anti-ratón agonista (1 µg/ml; anticuerpo monoclonal HM40-3; BD Pharmingen) como se describe. Yanaba *et al.* 2009, *J. Immunol.* 182, 7459-7472. Para la detección de IL-10, se bloquearon los receptores Fc con mAb del receptor Fc de ratón (2.4G2; BD PharMingen), y las células muertas se
- 55 detectaron usando un kit de tinción de células muertas violetas fijables LIVE/DEAD® (Invitrogen-Molecular Probes) antes de la tinción de la superficie celular. Las células teñidas se fijaron y se permeabilizaron usando un kit Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tiñeron con mAb anti-IL-10 de ratón conjugado con PE. Los esplenocitos de ratones TL-10^{-/-} sirvieron como controles negativos para demostrar la especificidad y establecer niveles de tinción de IL-10 de fondo. Para la tinción de citocinas intracelulares de los
- 60 linfocitos T, los linfocitos se estimularon *in vitro* con PMA (50 ng/ml; Sigma, St. Louis, MO) e ionomicina (1 µg/ml; Sigma) en presencia de Brefeldina A (BFA, 1 µl/ml; eBioscience) durante 5 h antes de la tinción. Las células viables

con las propiedades de dispersión de luz frontal y lateral de los linfocitos se analizaron usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) o BD FACSCanto™ II (BD Biosciences).

Cultivos de los linfocitos B *in vitro*. Se cultivaron linfocitos B esplénicos purificados (1×10^6 /ml) en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 %, L glutamina 2 mM, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y 2-mercaptoetanol 50 µM, e IFN-γ recombinante (10 ng/ml) o IL-4 (2 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) o IL-21 (100 ng/ml) (de e-Bioscience); TGF-β (10 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml) o IL-12 (10 ng/ml) (de R&D systems, Minneapolis, MN); o IL-23 (20 ng/ml) e IL-27 (100 ng/ml) (Biolegend), o LPS (10 µg/ml) antes de determinar el número de linfocitos B10 y las concentraciones de IL-10 en el líquido sobrenadante del cultivo. Las concentraciones de IL-10 se determinaron por ELISA. En experimentos separados, se cultivaron linfocitos B del bazo purificados con células NIH-3T3 que expresaban CD154 y BLyS como se describe con IL-4 recombinante exógena (2 ng/ml) o IL-21 (10 ng/ml) añadidas a los cultivos. Nojima *et al.* 2011, *Nature Comm.* 2, 465 y Tedder *et al.* en "Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens". Vol. 1 (eds S. F. Schlossman *et al.*) 483-504 (Oxford University Press, 1995). Para los experimentos de transferencia adoptiva, se purificaron linfocitos B CD5⁺ y CD5⁻ cultivados mediante clasificación celular (FACSVantage SE, Becton Dickinson), con purezas del 95-98 %. Después de la purificación, se transfirieron inmediatamente 1×10^6 células i.v. a cada ratón receptor. En algunos experimentos, se añadió anticuerpo monoclonal CD40 (clon HM40-3; hámster, sin azida/sin endotoxina, BD Pharmingen, San José, CA) a los cultivos donde se indica.

Inducción de la EAE. Se indujo la EAE en ratones hembra de 6 a 8 semanas de vida mediante inmunización subcutánea con 100 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; NeoMPS, San Diego, CA) emulsionado en CFA que contenía 200 µg de *Mycobacterium tuberculosis* matada con calor H37RA (Difco, Detroit, MI) el día 0. Véase Matsushita *et al.* 2008, *J. Clin. Invest.* 118, 3420-3430 y Matsushita *et al.* 2010, *J. Immunol.* 185, 2240-2252. Además, los ratones recibieron 200 ng de toxina de la tos ferina (List Biological Laboratories, Campbell, CA) i.p. en 0,5 ml de PBS los días 0 y 2. Los signos clínicos de la enfermedad se evaluaron diariamente con un sistema de puntuación de 0 a 6 puntos: 0, normal; 1, cola flácida; 2, reflejo de enderezamiento y/o marcha deteriorados; 3, parálisis parcial de las extremidades posteriores; 4, parálisis total de las extremidades posteriores; 5, parálisis de las extremidades posteriores con parálisis parcial de las extremidades anteriores; 6, estado moribundo, según lo descrito. Fillatreau *et al.* 2002, *Nat. Immunol.* 3, 944-950. Los ratones moribundos recibieron puntuaciones de la gravedad de la enfermedad de 6 y se sacrificaron.

Experimentos de transferencia adoptiva. Primero se enriquecieron los linfocitos B de ratones sin tratamiento previo o ratones con EAE (día 28) usando microperlas recubiertas con mAb CD19, se tiñeron para la expresión en la superficie celular de CD19, CD1d y CD5, con linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ y CD1d^{bajo}CD5⁻ purificados mediante clasificación celular como se describe con pureza del 95-98 %. Véase Matsushita 2011, *Methods Mol. Biol.* 677, 99-111 y Yanaba *et al.* 2008, *Immunity* 28, 639-650. Después de la purificación, los linfocitos B CD1d^{alto}CD5⁺ o CD1d^{bajo}CD5⁻ (1×10^6) se transfirieron inmediatamente i.v. a ratones receptores, representando lo linfocitos B10 del 13 al 20 % y < 0,1 % de las células transferidas. En algunos experimentos, se aislaron linfocitos T Thy1.1 CD4⁺ donantes de bazo y ganglios linfáticos agrupados de ratones transgénicos TCR^{MOG}, luego se marcaron con colorante fluorescente CFSE Vybrant™ CFDA SE (5 µM; CFSE; Invitrogen) y se transfirieron i.v. (5×10^6 /ratón) a receptores congénicos Thy1.2. Cinco días después de la transferencia adoptiva, los linfocitos T CD4⁺ TCR^{MOG} se evaluaron mediante citometría de flujo.

Análisis estadístico. Todos los datos se muestran como las medias (± ETM). La importancia de las diferencias entre las medias muestrales se determinó mediante la prueba t de Student.

REIVINDICACIONES

1. Un método de expansión de linfocitos B10 productores de IL-10 *ex vivo* que comprende poner en contacto linfocitos B extraídos de un sujeto con IL-21 y aislar los linfocitos B10, en donde los linfocitos B10 se aíslan mediante la selección para la expresión en la superficie celular de al menos uno de entre CD1d, CD5 o CD24 y, opcionalmente, en donde los linfocitos B10 se aíslan además basándose en la producción de IL-10 o basándose en la expresión de moléculas de la superficie celular que incluyen IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a, CD79b, CD1d, CD5, CD9, CD10, CD1d, CD23, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138, CD148 o combinaciones de las mismas.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto las células con un agonista de CD40 o poner en contacto los linfocitos B con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B, y en donde el promotor de la supervivencia de los linfocitos B es opcionalmente BAFF (BLyS).
3. El método de la reivindicación 2, que comprende además poner en contacto los linfocitos B con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-4, opcionalmente, en donde el promotor de la supervivencia de los linfocitos B es BAFF (BLyS), antes de poner en contacto los linfocitos B con IL-21.
4. Un método de expansión de linfocitos B10 productores de IL-10 *ex vivo*, que comprende:
 - a) poner en contacto los linfocitos B extraídos de un sujeto con células alimentadoras que expresan un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-4;
 - b) poner en contacto los linfocitos B de la etapa (a) con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-21;
 - c) aislar los linfocitos B de la etapa (b); y
 - d) aislar los linfocitos B10 de los linfocitos B de la etapa (c), en donde los linfocitos B10 se aíslan mediante la selección para la expresión en la superficie celular de al menos uno de entre CD1d, CD5, CD24 o CD27, y opcionalmente en donde los linfocitos B10 se aíslan además basándose en la producción de IL-10, o basándose en la expresión diferencial de moléculas de la superficie celular que incluyen IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a, CD79b, CD1d, CD5, CD9, CD10, CD1d, CD23, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138, CD148 o combinaciones de las mismas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde las células alimentadoras expresan además VCAM-1 y CD44 y/o al menos un marcador seleccionado entre CD24, IL-7, Mst1 o Tslp.
6. Un método de evaluación de la función de los linfocitos B10 en linfocitos B extraídos de un sujeto, que comprende:
 - a) poner en contacto los linfocitos B con IL-21 y un agonista de CD40; y
 - b) determinar si los linfocitos B producen IL-10; opcionalmente, que comprende además poner en contacto los linfocitos B con células alimentadoras que expresen un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-4 antes del cultivo con IL-21, opcionalmente, en donde las células se ponen en contacto con células alimentadoras que expresan un agonista de CD40 y un promotor de la supervivencia de los linfocitos B en presencia de IL-21.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los linfocitos B han sido extraídos de la sangre, del bazo, de la cavidad peritoneal, de los ganglios linfáticos, de la médula ósea, del sitio de la enfermedad autoinmunitaria, del sitio de inflamación o del tejido objeto de rechazo de trasplante del sujeto, y en donde los linfocitos B se aíslan opcionalmente mediante la eliminación de las células distintas de los linfocitos B, o la selección de las moléculas de superficie celular IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, CD72, CD79a, CD79b, CD1d, CD5, CD9, CD10, CD23, CD27, CD38, CD48, CD80, CD86, CD138, CD148 o combinaciones de las mismas antes de su uso en el método.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde el agonista de CD40 se selecciona Del grupo que consiste en CD154, un fragmento de CD154 y un anticuerpo, aptámero o polipéptido, o fragmento de los mismos reactivo con CD40, en donde el promotor de la supervivencia de los linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en al menos uno de entre células alimentadoras, BAFF (BLyS), fragmentos de BAFF, APRIL, ligando de CD22, anticuerpo monoclonal CD22 y sus fragmentos, y en donde las células alimentadoras se seleccionan del grupo que consiste en fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos, melanocitos y otras células mesenquimales o estromales.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los linfocitos B se ponen en contacto con IL-21 durante cuatro a ocho días.
10. El método de la reivindicación 9, en donde los linfocitos B se ponen en contacto con IL-4 durante tres a diez días

antes del contacto con IL-21.

- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, que comprende además comparar la cantidad de IL-10 producida o el porcentaje de células capaces de producir IL-10 con un control que tenga una función de linfocitos B10 normal, y determinar si la función de linfocitos B10 es normal o anormal en el sujeto y, opcionalmente, diagnosticar si el sujeto tiene linfocitos B10 normales, deficientes o hiperactivos.
- 10 12. El método de la reivindicación 11, que comprende además usar la comparación para diagnosticar si el sujeto tiene una enfermedad o una afección que afecte a la función de los linfocitos B10, en donde la enfermedad o la afección son una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de injerto frente a hospedador, rechazo de trasplantes, anticuerpos anti-fármacos o un trastorno inflamatorio.
- 15 13. El método de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además aislar los linfocitos B10 mediante la selección en cuanto a CD27.
14. El método de la reivindicación 1, en donde los linfocitos B10 resultantes son policlonales.

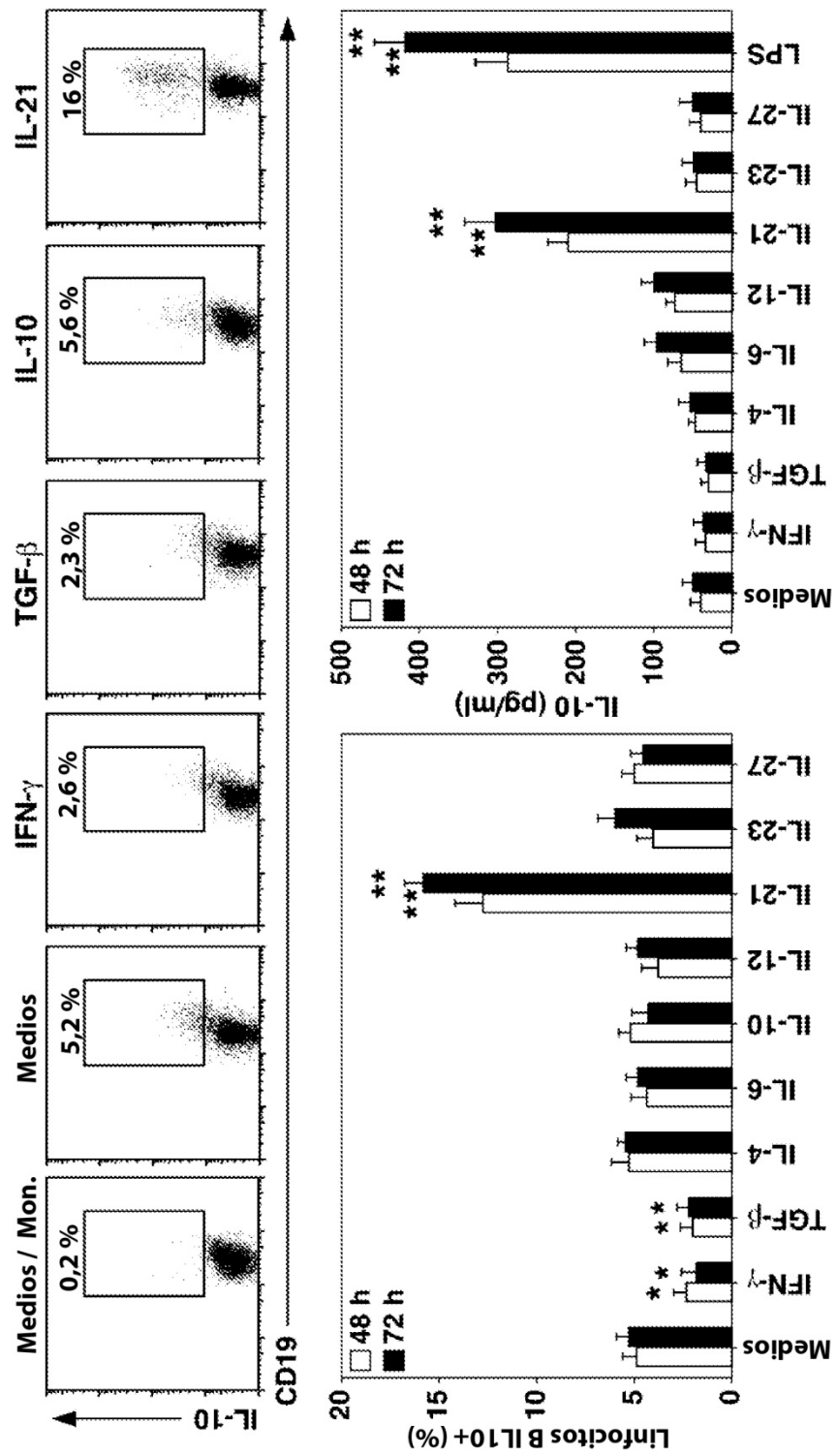


Fig. 1a

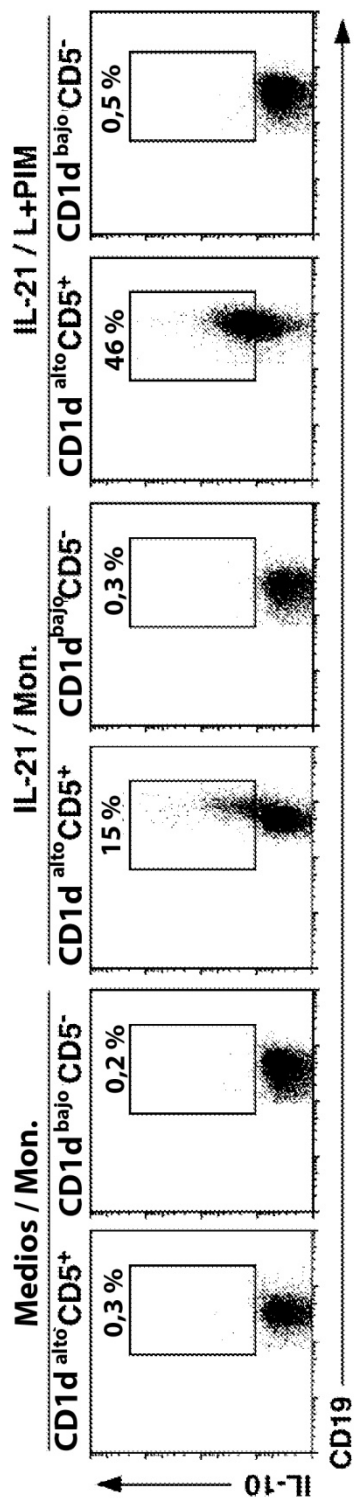


Fig. 1b

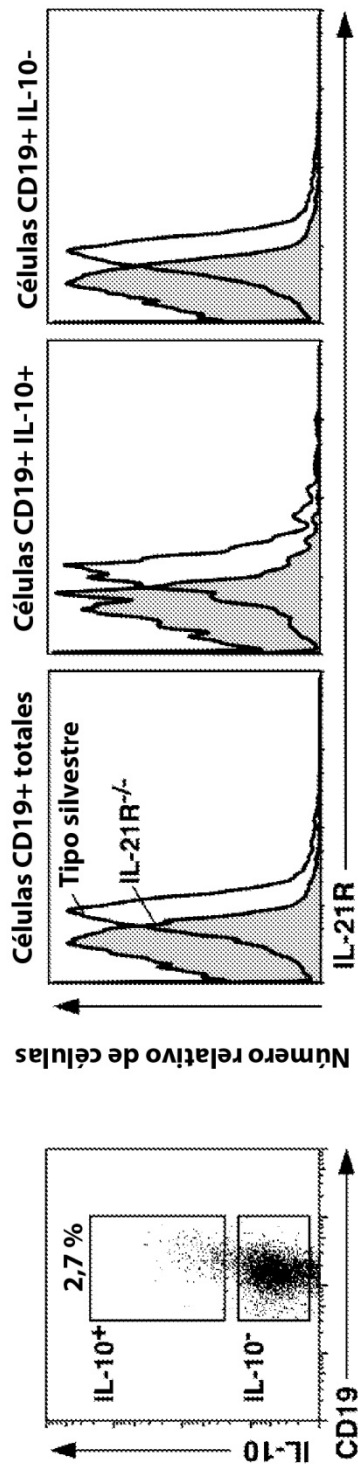
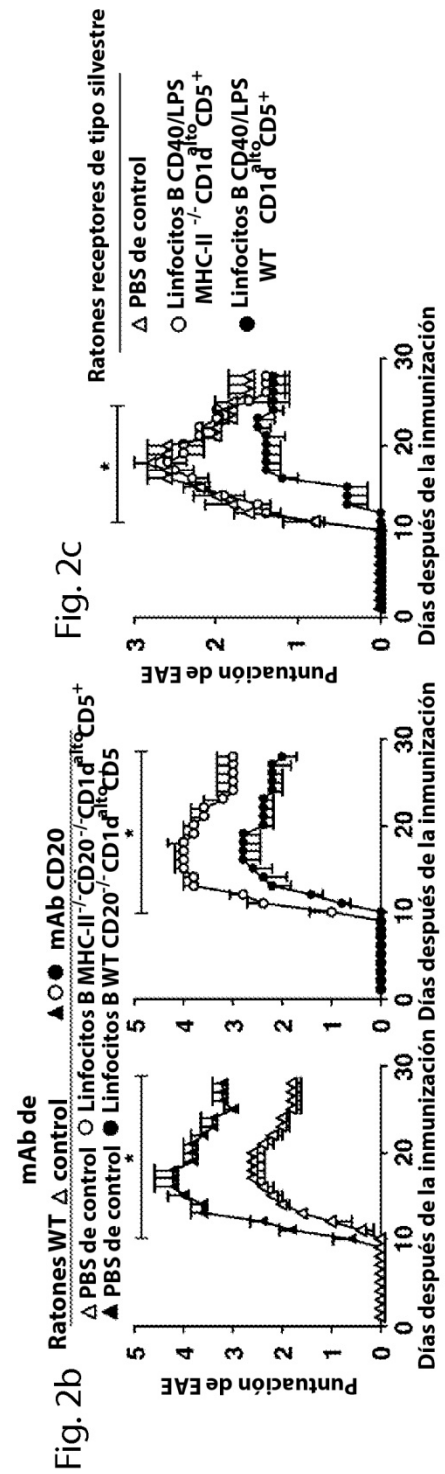
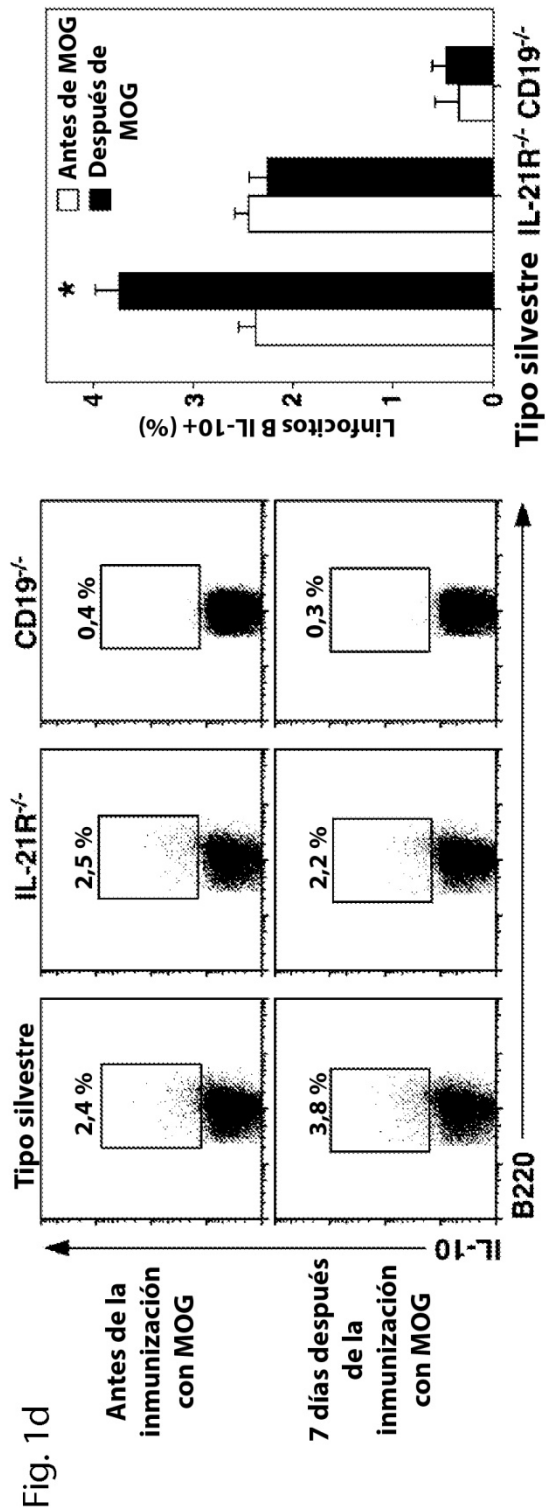


Fig. 1c



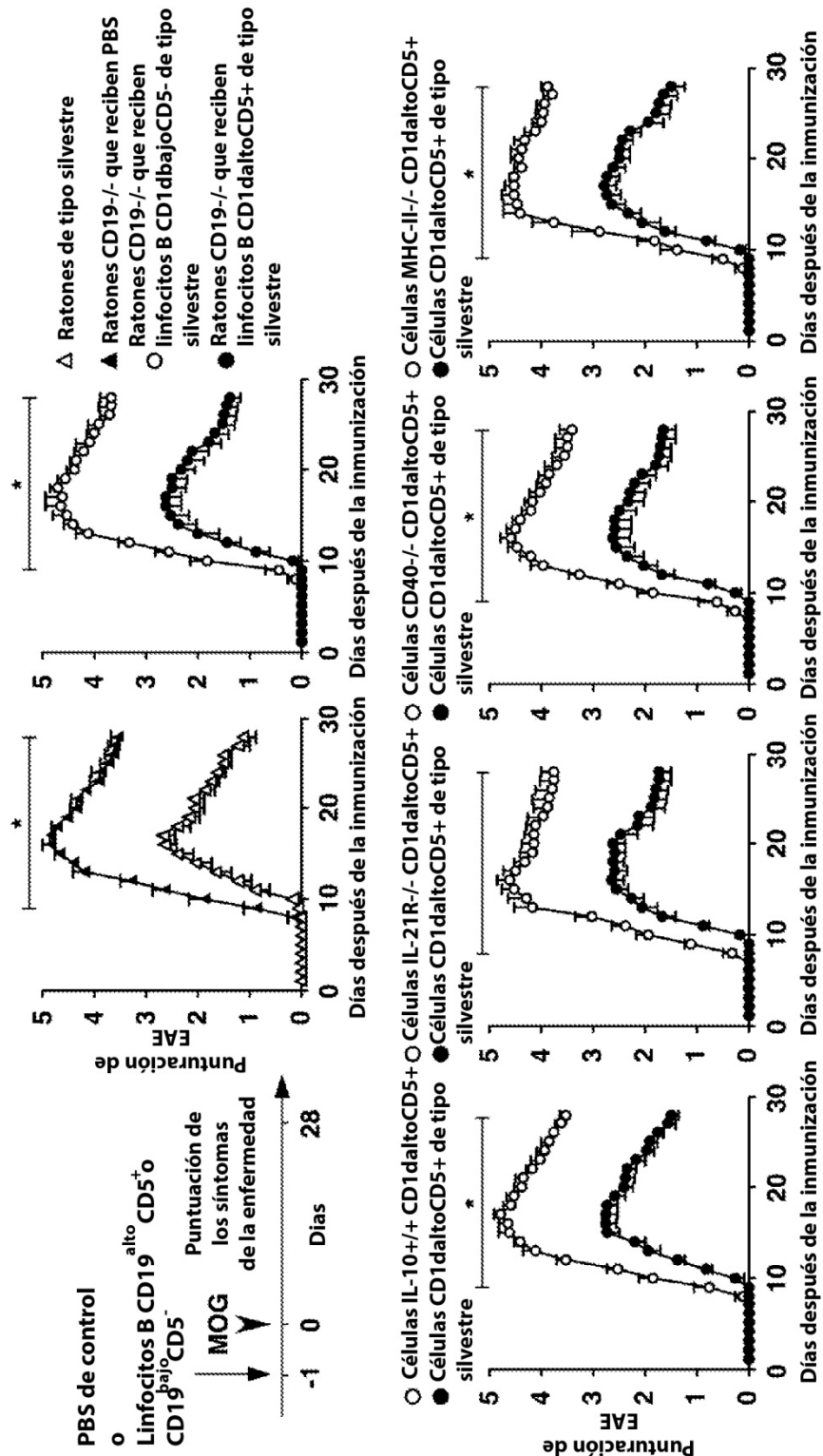


Fig. 2a

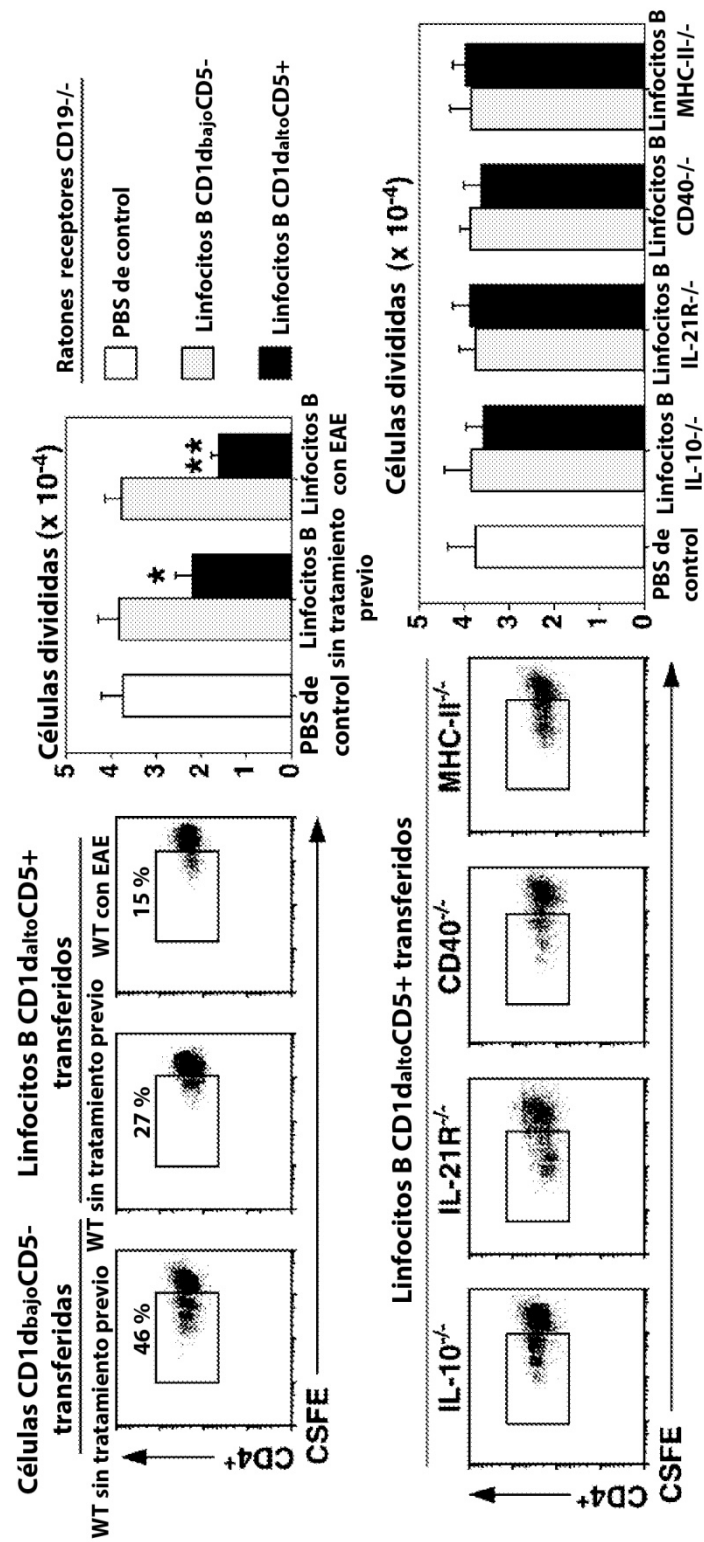


Fig. 3a

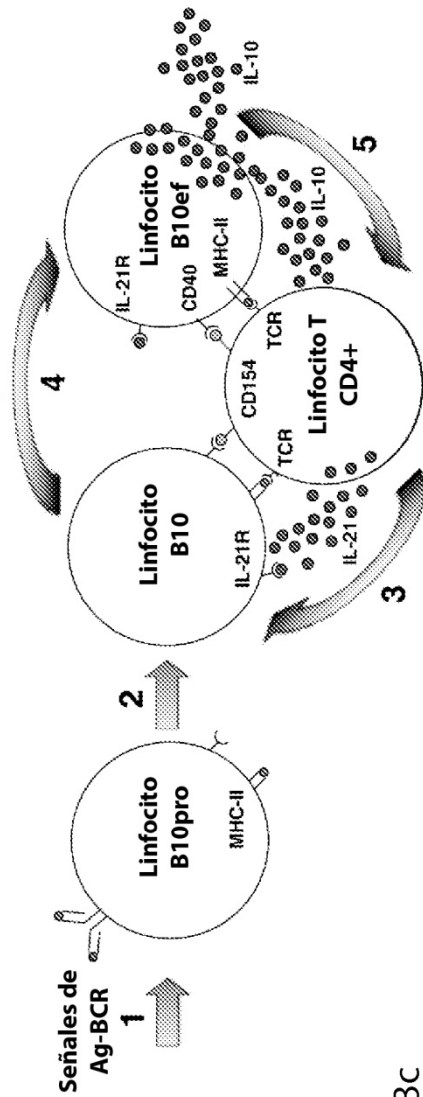
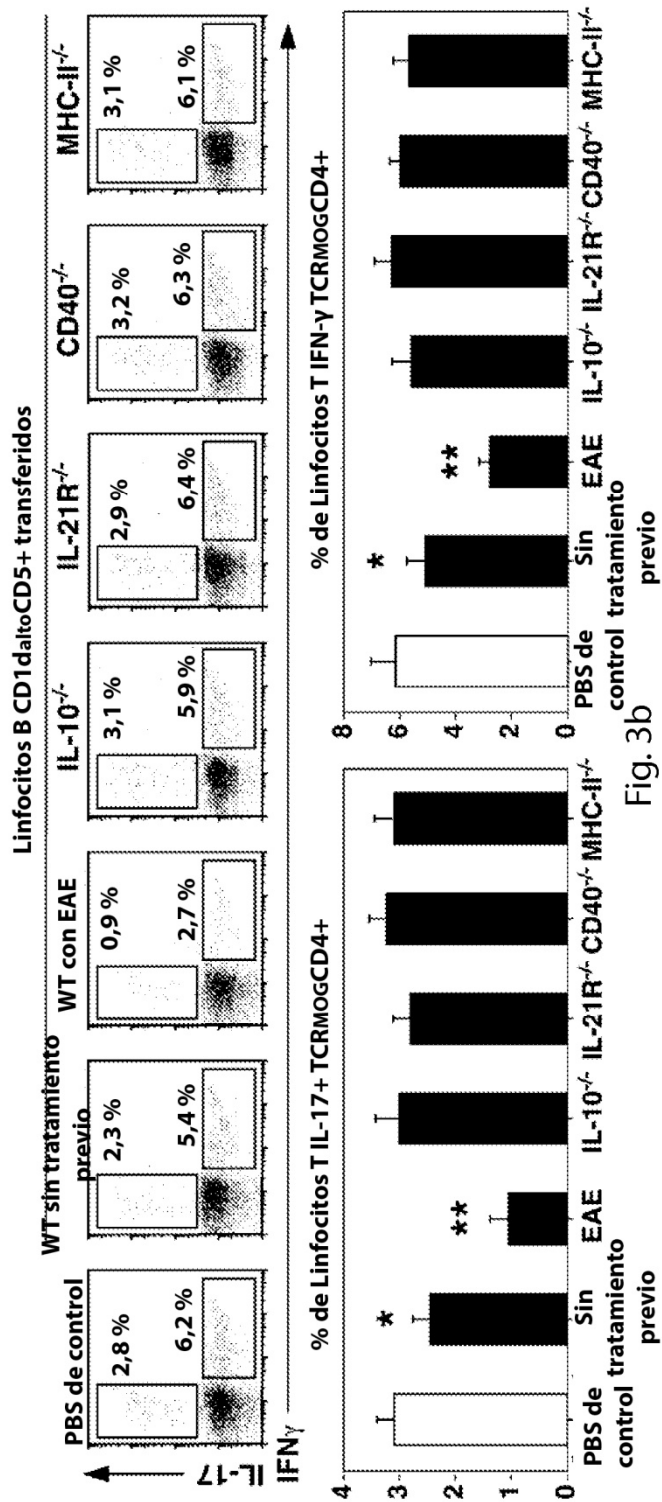
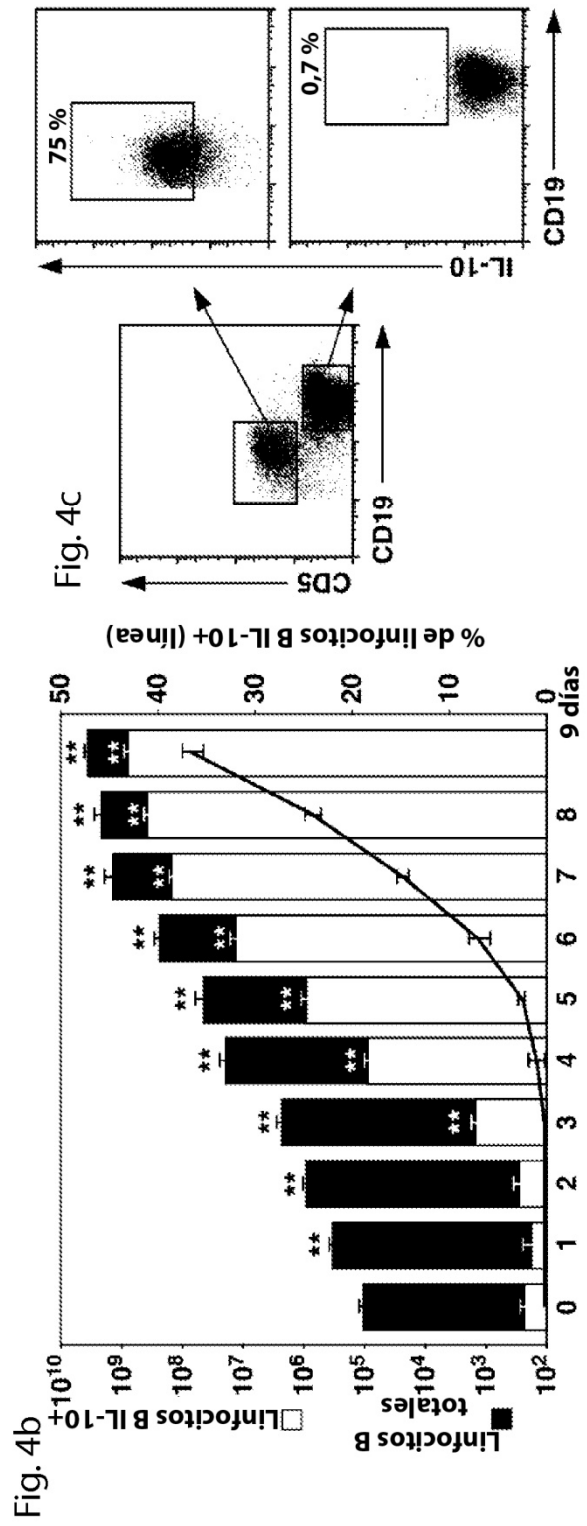
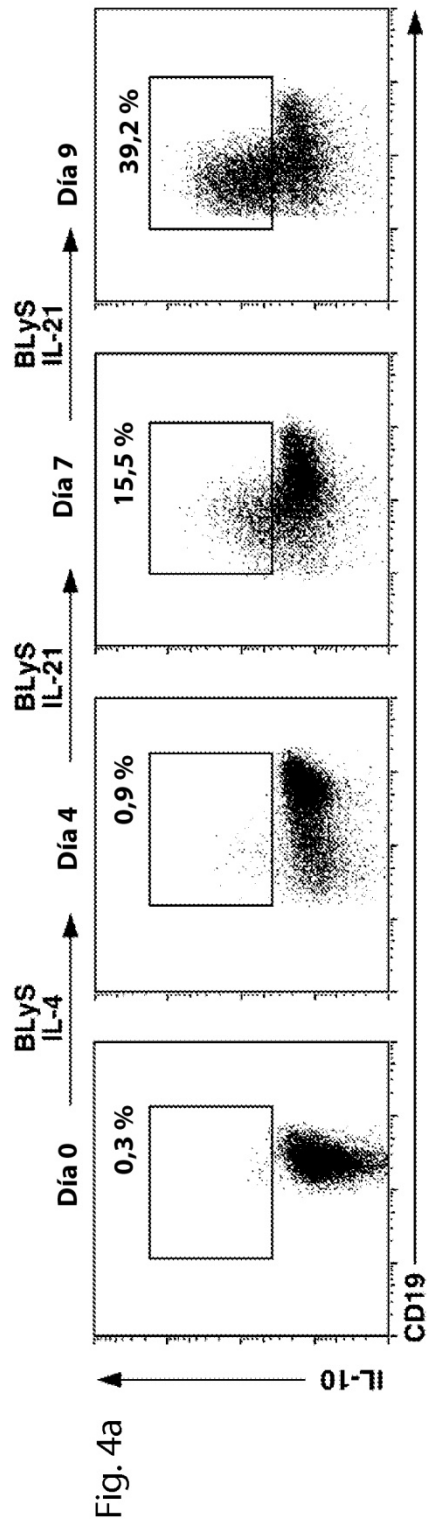
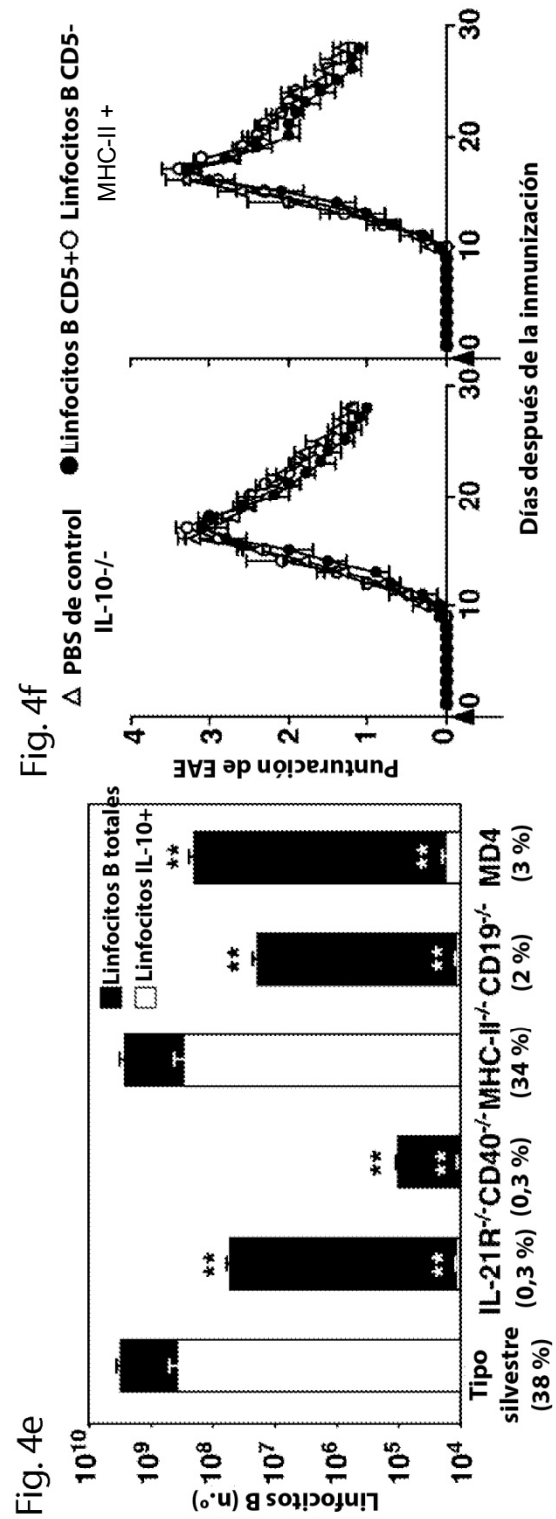
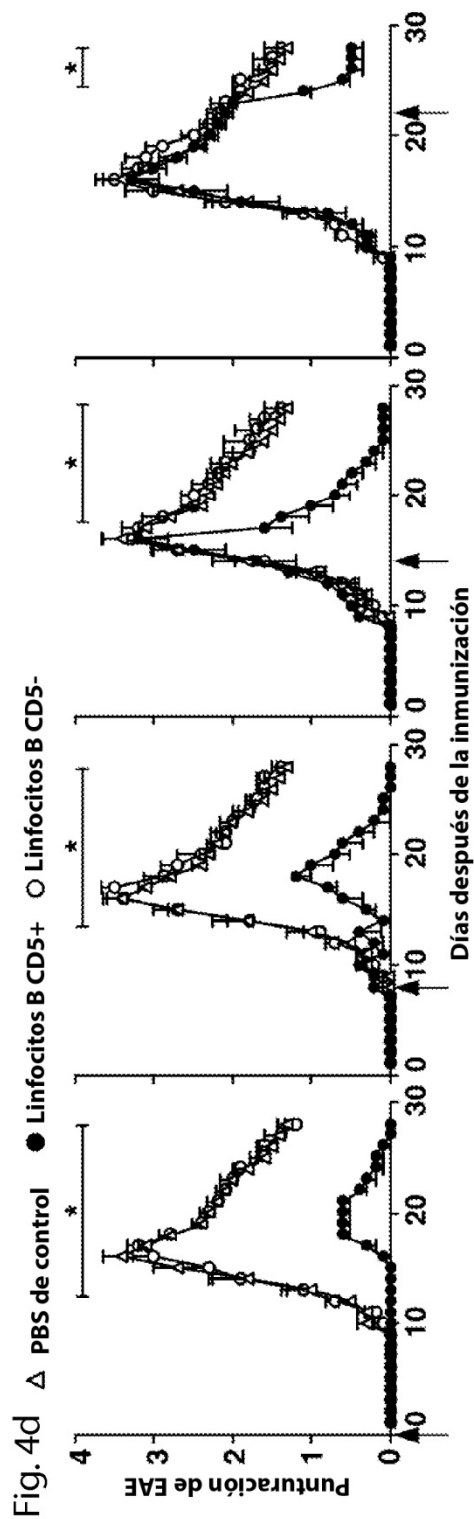
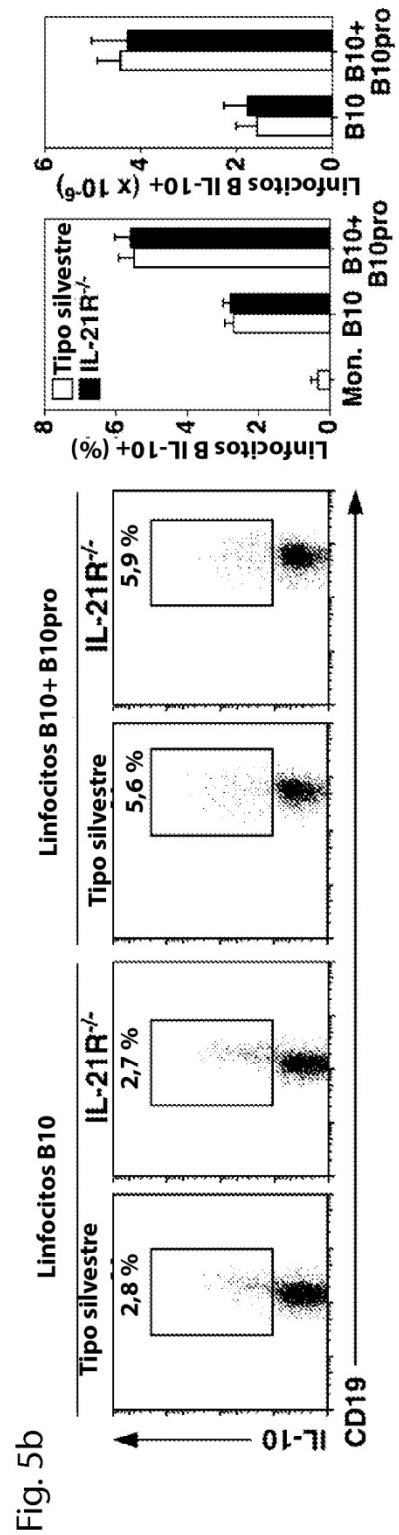
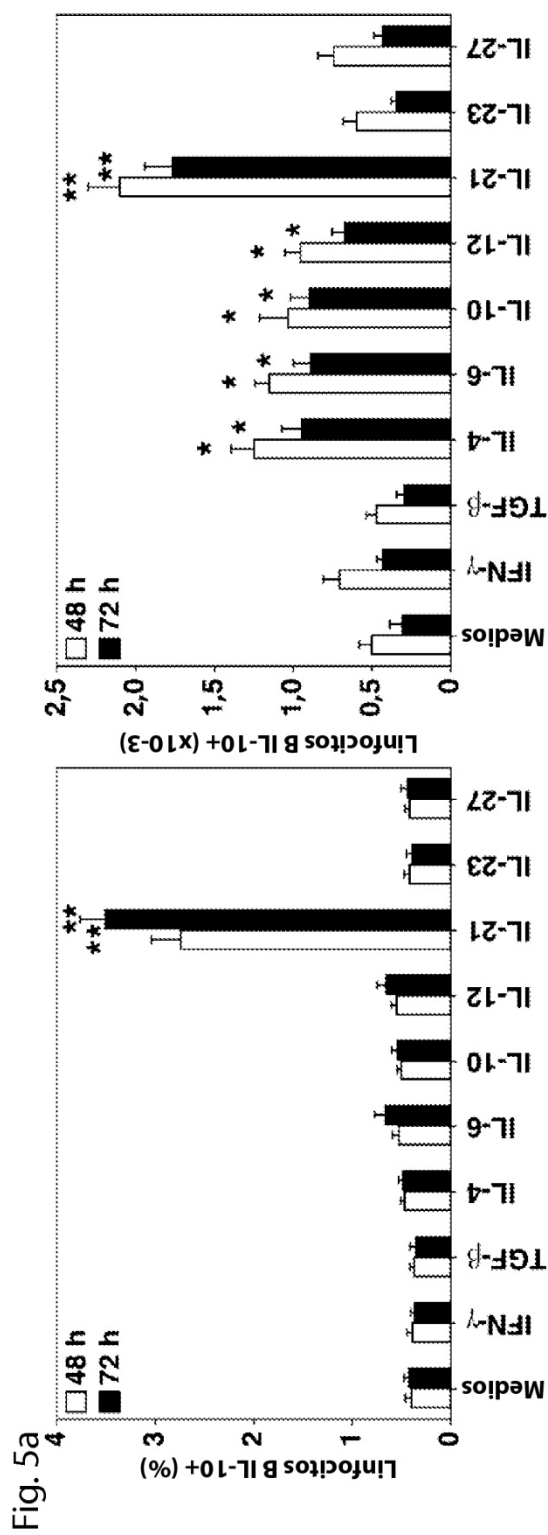
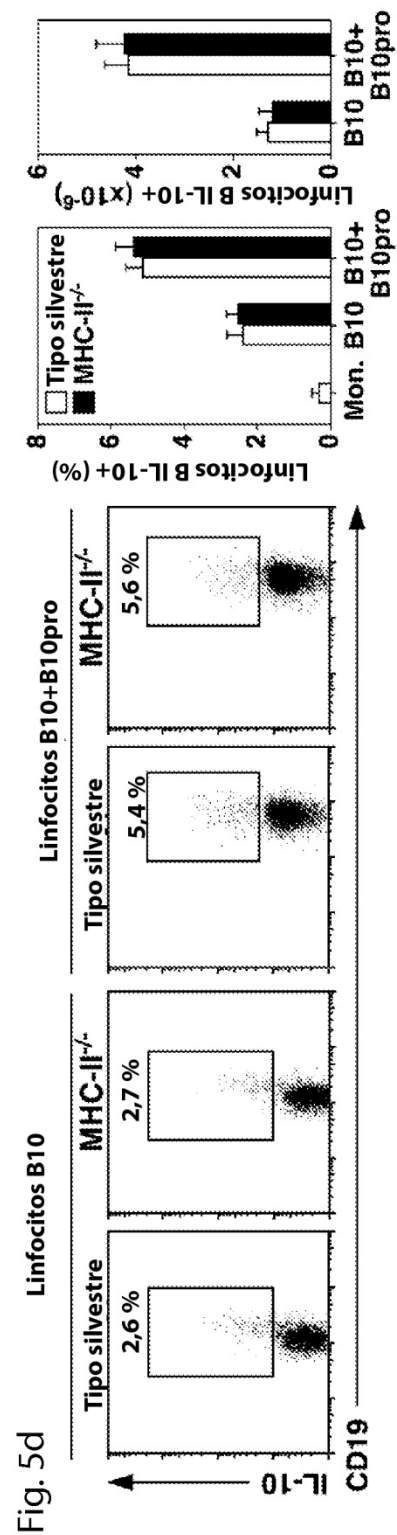
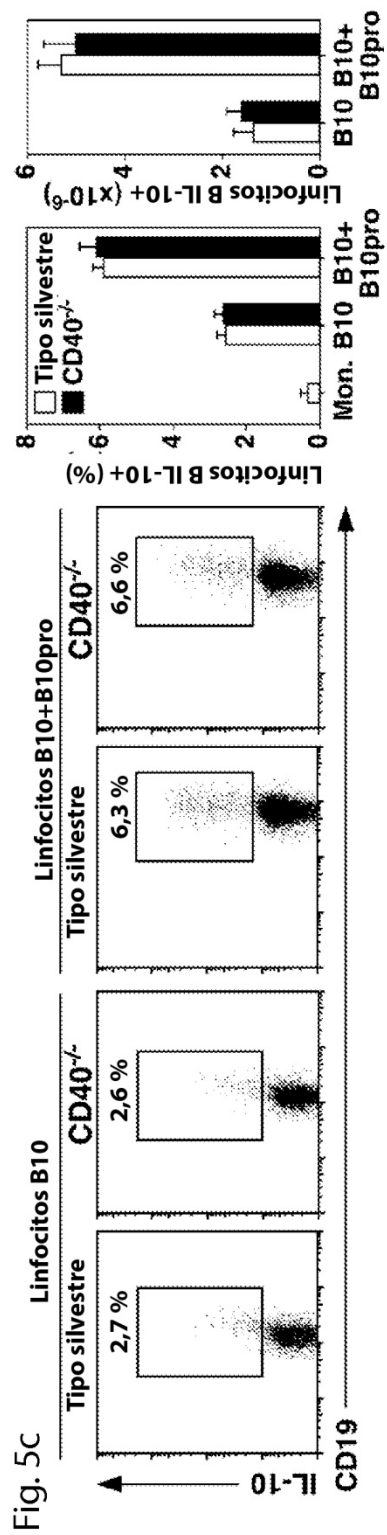


Fig. 3c









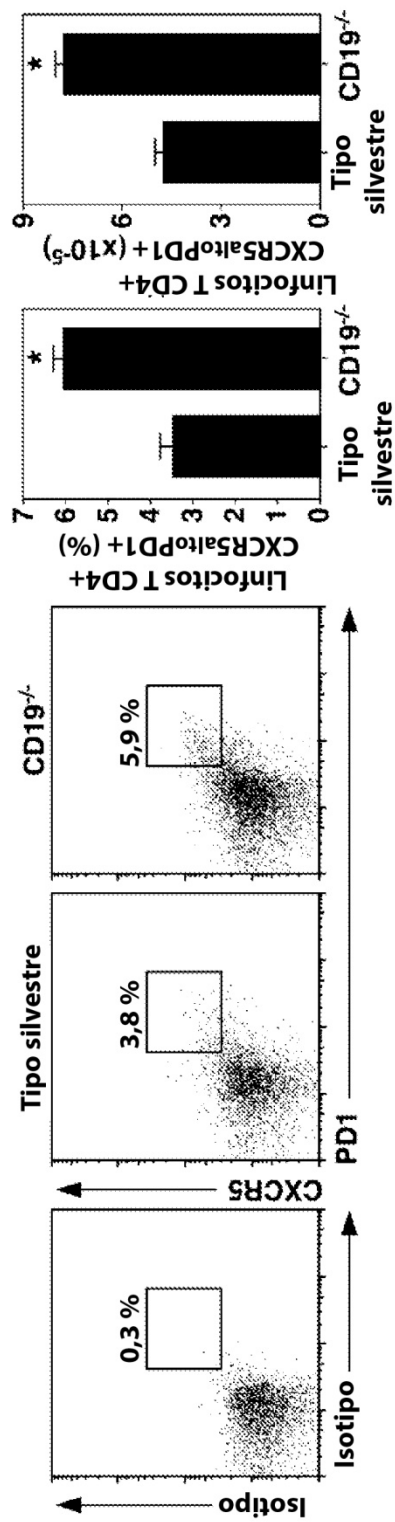


Fig. 6

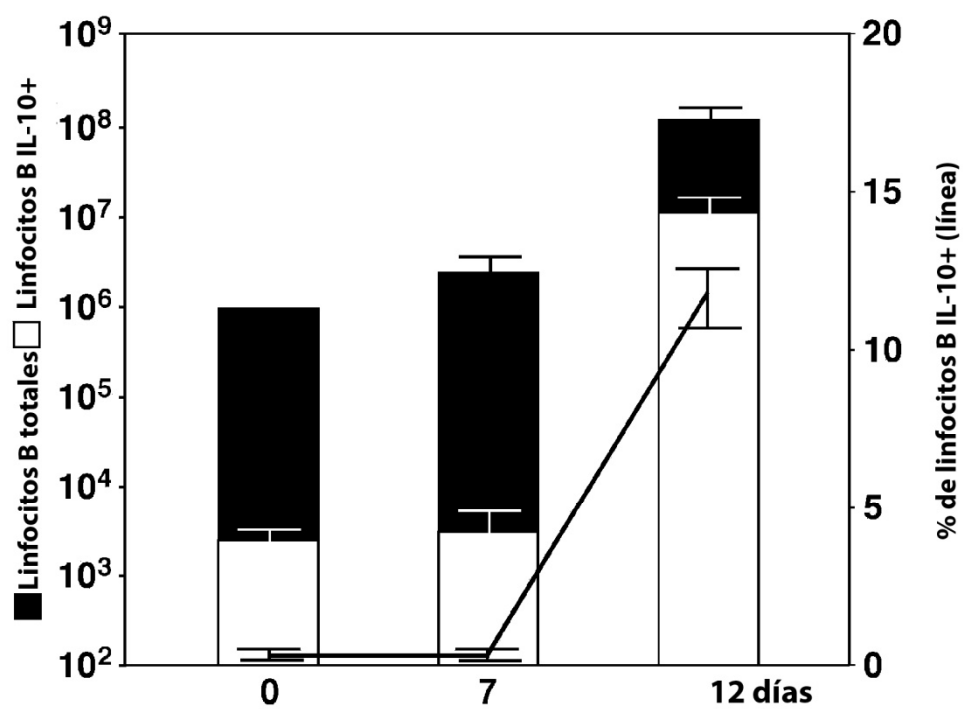


Fig. 7

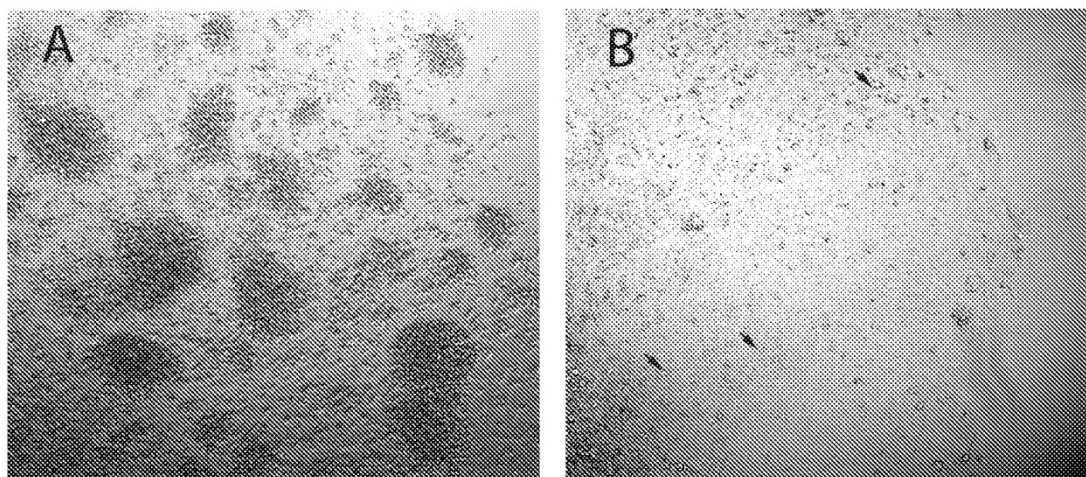


Fig. 8