

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236046**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415351**

(22) Data zgłoszenia: **17.12.2015**

(51) Int.Cl.

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

(54) **Sposób namnażania in vitro limfocytów T regulatorowych CD4⁺ FoxP3⁺**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

19.06.2017 BUP 13/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.11.2020 WUP 19/20

(73) Uprawniony z patentu:

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
Gdańsk, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**NATALIA MAREK-TRZONKOWSKA,
Gdańsk, PL**

PIOTR TRZONKOWSKI, Sopot, PL

MAŁGORZATA MYŚLIWIEC, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Małgorzata Matyka

PL 236046 B1

Opis wynalazku

Dziedzina wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób namnażania (ekspansji) *in vitro* subpopulacji limfocytów T CD4⁺ o właściwościach immunosupresyjnych i fenotypie CD4⁺ FoxP3⁺ zwanych dalej limfocytami Treg pozwalający na kliniczne zastosowanie tych komórek w terapii chorób o podłożu autoimmunologicznym takich jak np. stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca typu 1, a także do hamowania niepożądanych reakcji immunologicznych w tym między innymi odrzucania przeszczepu, reakcji alergicznych i choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. graft versus host disease GVHD).

Podstawy wynalazku

Limfocyty Treg stanowią około 1% wszystkich limfocytów krwi obwodowej, lecz mają istotne znaczenie dla utrzymania tolerancji własnych tkanek (Trzonkowski P 2009) (Vignali DA 2008) (Yi S 2012). Brak komórek regulatorowych prowadzi do wystąpienia szeregu chorób autoimmunizacyjnych oraz nadwrażliwości, co widać na przykładzie pacjentów ze sprzężonym z chromosomem X zespołem dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii (ang. immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked; IPEX) (Gambineri E 2003). Limfocyty Treg można nazwać „inteligentnymi sterydami”, ponieważ podobnie do sterydów hamują reakcje zapalne i działają immunosupresyjnie, ale w przeciwieństwie do nich fizjologiczne działanie supresorowe komórek Treg dotyczy tylko reakcji patologicznych (np. skierowanych przeciwko własnym tkankom). Wyniki badań klinicznych, w których zastosowano komórki Treg- w tym również nasze obserwacje – wskazują, że terapia limfocytami Treg jest bezpieczna i nie upośledza odpowiedzi immunologicznej przeciwko obcym oraz niebezpiecznym antygenom (wirusy, bakterie, komórki nowotworowe) (Marek-Trzonkowska N 2012) (Marek-Trzonkowska N 2014) (Martelli MF 2014) (Bluestone JA 2015).

Nasz zespół badawczy od ponad 10 lat prowadzi badania nad biologią i klinicznym zastosowaniem limfocytów Treg. Jako pierwsi użyliśmy namnożonych *in vitro* komórek Treg najpierw w terapii choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD) u osób dorosłych (NKEBN/458-310/2008) (Trzonkowski P 2009) (Trzonkowski P 2013), a następnie w cukrzycy typu 1 (DM1) u dzieci (TregVAC ISRCTN06128462; TregVAC2.0EudraCT:2014-004319-35) (Marek-Trzonkowska N 2012) (Marek-Trzonkowska N 2014) i w stwardnieniu rozsianym (TregSM EudraCT:2014-004320-22) (Trzonkowski P 2015). Obecnie badania kliniczne z zastosowaniem komórek Treg prowadzone są również przez inne ośrodki na świecie i dotyczą terapii/prewencji GVHD (m.in. Treg002EudraCT:2012-002685-12) (Di Ianni M 2011), leczenia DM1 u osób dorosłych (NCT01210664), a także indukcji tolerancji w przeszczepie nerki (m.in. NCT02091232 i NCT02129881) oraz wątroby (ThRIL NCT02166177 i NCT01624077) (Trzonkowski P 2015).

W ostatnich latach rozpoczął się dynamiczny rozwój terapii komórkowych wykorzystujących limfocyty Treg jako narzędzie terapeutyczne. Wszystkim tym projektom przyświeca jeden cel, a mianowicie inteligentna immunosupresja, która pozwoliłaby na zahamowanie niepożądanych reakcji immunologicznych bez upośledzenia fizjologicznej odpowiedzi odpornościowej.

Wszystkie te badania zmagają się również z tymi samymi problemami technicznymi związanymi z izolacją i hodowlą komórek Treg. Pierwszy z nich stanowiła niska czystość pozyskiwanej populacji, wpływająca na bezpieczeństwo i powodzenie terapii (Trzonkowski P 2009) (Tang Q 2013). Problem ten udało się jednak rozwiązać wprowadzając sorter komórkowy do izolacji komórek Treg co zostało opisane w patencie PL 218400 B. Niemniej jednak żaden ze znanych do tej pory sposobów namnażania komórek Treg nie jest w stanie zapewnić ich intensywnej proliferacji z jednoczesnym utrzymaniem pełnego fenotypu, w tym zwłaszcza wysokiej ekspresji czynnika FoxP3 przez cały okres trwania hodowli (10–14 dni). Zawsze, nawet w hodowli prowadzonej zgodnie ze standardami dobrej praktyki produkcyjnej (ang. good manufacturing practice; GMP) w drugim tygodniu ekspansji limfocytów Treg obserwuje się istotne obniżenie odsetka komórek FoxP3⁺ w populacji. Zmiany te mają swoje bezpośrednie przełożenie na obniżenie aktywności supresorowej komórek Treg oraz wzrost produkcji cytokin prozapalnych, w tym interferonu γ (IFN- γ), a tym samym odpowiedzialne są za zmniejszenie skuteczności terapii (Marek N 2011) (Hoffmann P 2009) (Tang Q 2013).

W opisie WO 2013/050596 A1 przedstawiono sposób namnażania komórek Treg *in vitro* w obecności rapamycyny – inhibitora kinazy m-Tor (ang. mammalian target for rapamycin), kwasu suberanilohydroksamowego (vorinostat) – inhibitora deacetylazy histonów oraz azacytydyny – inhibitora metylacji DNA. Wykazano, że uzyskanie względnej stabilności komórek Treg można osiągnąć jedynie stosując

kombinację wszystkich trzech wymienionych związków równocześnie. Niemniej jednak zastosowane chemioterapeutyki nie zapobiegają całkowicie obniżeniu ekspresji czynnika FoxP3 podczas hodowli i już po 7 dniach odsetek komórek FoxP3⁺ spada poniżej 90%. Wiadomo ponadto, że wszystkie trzy stosowane związki obniżają żywotność oraz zdolności proliferacyjne komórek Treg.

W opisie WO 2010/135255 A1 ujawniono metodę ekspansji *ex vivo* limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺, która w czasie 3 tygodni pozwala na 100- 1000-krotne zwielokrotnienie wyjściowej liczby komórek, natomiast dla okresu 14 dni są to wielkości od 60 do 500. Opisane w patencie magnetyczne metody izolacji komórek Treg umożliwiają uzyskanie populacji o niskiej czystości (40–75% w dniu „0”), a co za tym idzie odsetek komórek FoxP3⁺ już w drugim tygodniu hodowli wynosi średnio 40–50%.

Publikacja WO 2006/090291 ujawnia metodę ekspansji komórek Treg w obecności rapamycyny. Dodanie chemioterapeutyka do hodowli komórek Treg ma za zadanie zahamowanie wzrostu komórek T efektorowych, stanowiących zanieczyszczenie hodowli. Przedstawione w patencie zwielokrotnienie liczby komórek CD4⁺CD25⁺ w hodowli z rapamycyną po 14 dniach wynosi mniej niż 20, a po 21 dniach mniej niż 40.

Żadne ze znanych opisów wynalazków, ani publikacji naukowych nie opisuje hodowli komórek Treg w temperaturze poniżej 37°C. Metoda namnażania komórek Treg, będąca przedmiotem niniejszego wynalazku jest pierwszą, która stosując zmianę temperatury hodowli pozwala na uzyskanie istotnie wyższej liczby komórek bez jednoczesnego obniżenia ich jakości i aktywności supresorowej. Wszystkie opatentowane do tej pory metody hodowli limfocytów Treg stosowały wyłącznie temperaturę 37°C. Nasz zespół jako pierwszy przetestował temperatury < 37°C w hodowli komórek Treg, wykazując, że temperatura 33°C pozwala na otrzymanie ponad trzykrotnie wyższej liczby limfocytów Treg w określonej jednostce czasu w porównaniu z wynikami uzyskiwanymi dla hodowli prowadzonych w standardowych warunkach temperatury (tj. 37°C).

Opracowanie bezpiecznej, prostej do zastosowania i jednocześnie ekonomicznie opłacalnej metody namnażania stabilnych komórek Treg, charakteryzujących się wysoką ekspresją czynnika FoxP3 oraz wysokim potencjałem supresorowym ma kluczowe znaczenia dla rozwoju i sukcesu badań klinicznych wykorzystujących komórki Treg jako narzędzie terapeutyczne.

Możliwość regulacji odpowiedzi immunologicznej ma istotne znaczenie z terapeutycznego punktu widzenia. Fizjologicznie układ odpornościowy rozpoznaje i niszczy obce oraz niebezpieczne antygeny, jednocześnie tolerując własne tkani. Niemniej jednak w przypadku chorób autoimmunologicznych takich, jak np. stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis; MS), cukrzyca typu 1 (ang. diabetes mellitus type 1; DM1), łuszczyca, toczeń rumieniowaty układowy (ang. systemie lupus erythematosus; SLE) czy reumatoidalne zapalenie stawów (ang. rheumatoid arthritis; RA) dochodzi do upośledzenia tego mechanizmu (Sénécal V 2015) (Trzonkowski P 2015) (Marek-Trzonkowska N 2012) (Pujol-Autonell I 2013) (Lima XT 2015) (Mu Q 2015) (Orent W 2015). Układ odpornościowy zaczyna niszczyć własne tkanki i narządy chorego, prowadząc do nieodwracalnych zmian. Obecnie leczenie chorób autoimmunologicznych sprowadza się najczęściej do niespecyficznego immunosupresji oraz hamowania odpowiedzi zapalnej. Taka terapia okazuje się jednak nieskuteczna na przestrzeni czasu. Mimo początkowej poprawy, nie udaje się całkowicie zahamować postępu choroby, a jej przerwanie zwykle wiąże się z zaostrzeniem choroby. Leczenie to jest ponadto związane z obniżeniem odporności (Gupta S 2012). W związku z tym pacjent staje się podatny na infekcje, które u chorych przyjmujących leki immunosupresyjne mają znacznie poważniejszy przebieg niż u osób zdrowych. Niespecyficzna immunosupresja to ponadto wzrost ryzyka rozwoju nowotworów (wyższy odsetek zachorowań wśród chorych przyjmujących leki immunosupresyjne) (Andrés A 2005) (Rama I 2010).

Regulacja odpowiedzi immunologicznej to również istotne zagadnienie z punktu widzenia transplantologii. Przeszczep narządowy jest zwykle procedurą ratującą życie, wiąże się jednak z koniecznością stałego przyjmowania silnych leków immunosupresyjnych. Przerwanie terapii wiąże się z nasileniem odpowiedzi immunologicznej przeciw tkankom przeszczepionego narządu, co w krótkim czasie prowadzi do jego zniszczenia. Stosowanie leków immunosupresyjnych, podobnie jak w przypadku terapii chorób autoimmunologicznych, jest obarczone występowaniem poważnych niepożądanych skutków ubocznych. Ponadto, niektóre z tej grupy leków mimo, że chronią przeszczepiony narząd przed niszczącym wpływem układu immunologicznego pacjenta, równocześnie działają toksycznie na przeszczep lub inne tkanki. Przykład stanowią tu nefrotoksyczne inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna i takrolimus) stosowane w przeszczepie nerki (Prókai Á1 2015) lub stosowana u biorców wysp trzustkowych rapamycyna, która upośledza działanie przeszczepionych komórek β (Zhang N1 2006) (Berney T 2009).

Problem immunosupresji i regulacji odpowiedzi immunologicznej związany jest również ściśle z przeszczepami szpiku. Zasadnicza różnica pomiędzy przeszczepem narządowym, a przeszczepem szpiku polega na tym, że w przypadku pierwszego medycyna próbuje ochronić przeszczepiony organ przed niszczącym działaniem układu immunologicznego biorcy, natomiast w przypadku drugiego nie ma ryzyka odrzucenia przeszczepu, lecz to przeszczepiony szpik jest źródłem komórek, które atakują organizm biorcy i mogą doprowadzić do jego śmierci (Di Ianni M 2011) (Zhao K 2015). Bez względu jednak na pochodzenie komórek układu odpornościowego atakujących organizm pacjenta, walka z nadmierną odpowiedzią immunologiczną sprowadza się tu również do stosowania niespecyficznego immunosupresji.

Pozornie innym zagadnieniem jest nadmierna odpowiedź immunologiczna przeciw niegroźnym antygenom obcym, z czym mamy do czynienia w przypadku różnych typów nadwrażliwości, które potocznie są zbiorczo nazywane alergiami. Większość z tych zaburzeń udaje się z powodzeniem leczyć objawowo stosując dostępne leki. Niemniej jednak w przypadku astmy oskrzelowej problem jest bardziej złożony. Proces chorobowy często postępuje z czasem, stan zapalny nasila się, prowadząc do trwałych zmian strukturalnych w drogach oddechowych, a stosowane leki przestają być skuteczne (Panettieri RA Jr 2008) (Barbaro MP 2014).

Podsumowując, w pełni skuteczne i bezpieczne leki stosowane zarówno w terapii chorób autoimmunologicznych, alergicznych, jak i u biorców przeszczepów to takie, które działają dokładnie na dany mechanizm powodujący wystąpienie choroby/uszkodzenie przeszczepionego narządu i jednocześnie nie upośledzają fizjologicznej odpowiedzi immunologicznej na obce i niebezpieczne antygeny. Szansą na tzw. inteligentną immunosupresję są właśnie limfocyty Treg. Warunkiem sukcesu terapii klinicznej z zastosowaniem komórek Treg jest jednak opracowanie bezpiecznego dla pacjenta protokołu ekspansji tych limfocytów, który gwarantowałby otrzymanie wysokiej liczby komórek z jednoczesnym utrzymaniem ich stabilności i aktywności supresorowej przez cały czas trwania hodowli (Tang Q 2013).

Opisana w niniejszym zgłoszeniu patentowym metoda spełnia wyżej opisane wymagania i może być z powodzeniem zastosowana do ekspansji zarówno poliklonalnych, jak i antygenowo specyficznych komórek Treg.

Istota wynalazku

Obniżenie temperatury ekspansji limfocytów Treg poniżej 37°C, a w szczególności prowadzenie hodowli w temperaturze 33°C w istotny sposób poprawia jakość oraz stabilność tych komórek. Limfocyty Treg namnażane w temperaturze 33°C charakteryzuje stała i wysoka ekspresja czynnika FoxP3 oraz podjednostki α receptora dla IL-2 (CD25), co związane jest z wyższą aktywnością supresorową oraz potencjałem proliferacyjnym tych komórek.

Do tej pory istotnym problemem w hodowli komórek Treg był niski potencjał proliferacyjny oraz spadek odsetka komórek FoxP3⁺ w hodowli na przestrzeni czasu (Marek N 2011) (Hoffmann P 2009) (Tang Q 2013). Manipulując jedynie temperaturą, udało się nam wyeliminować oba te problemy. Hodowla w 33°C pozwala otrzymać w ciągu 14 dni kilkukrotnie wyższą liczbę limfocytów Treg (Fig. 1) o wyższej ekspresji czynnika FoxP3 (Fig. 2) w porównaniu z metodami stosującymi standardową temperaturę ekspansji wynoszącą 37°C.

Dzięki temu technika będąca przedmiotem niniejszego patentu pozwala na skrócenie czasu namnażania komórek Treg, a tym samym poddanie terapii większej liczby pacjentów w określonym czasie przy jednoczesnym utrzymaniu wyższej jakości/stabilności namnożonych komórek (Fig. 3). Wysoki potencjał proliferacyjny obserwowany w przypadku hodowli w temperaturze 33°C jest przynajmniej częściowo związany z wyższą (Fig. 4) i bardziej stabilną (Fig. 5) ekspresją cząsteczki CD25 na powierzchni tych komórek (wyższy odsetek komórek CD25^{high} i wyższa intensywność produkcji cząsteczki CD25 na przestrzeni czasu). CD25 jest elementem receptora o wysokim powinowactwie do interleukiny 2 (IL-2), cytokiny będącej mitogenem wszystkich limfocytów T i jednocześnie czynnikiem niezbędnym dla powstawania, proliferacji i prawidłowej funkcji komórek Treg (Malek TR 2003) (Malek TR 2010). Spośród trzech podjednostek (α , β i γ) wchodzących w skład receptora IL-2 o wysokim powinowactwie w naszym badaniu oznaczaliśmy tylko ekspresję łańcucha α (CD25) jako, że jest on jednym z powszechnie uznanych markerów komórek Treg. Niemniej jednak można przypuszczać, że po obniżeniu temperatury hodowli do 33°C dochodzi do wzrostu ekspresji nie tylko cząsteczki CD25, ale również pozostałych podjednostek receptora dla IL-2 i stąd komórki hodowane w tych warunkach stają się bardziej wrażliwe na działanie IL-2 i intensywniej proliferują.

Na uwagę zasługuje również fakt, że limfocyty Treg hodowane w temperaturze 33°C charakteryzuje istotnie wyższy odsetek komórek o najwyższej intensywności ekspresji czynnika FoxP3 (FoxP3^{High})

przez cały okres trwania hodowli w porównaniu z limfocytami Treg namnażanymi równolegle w temperaturze 37°C (Fig. 6). Ponadto podczas ekspansji w temperaturze 33°C populacja FoxP3^{High} wykazuje istotnie wyższą produkcję cząsteczki CD25 (Fig. 7), jak również większą stabilność ekspresji czynnika FoxP3 (Fig. 8) na przestrzeni czasu w porównaniu z komórkami FoxP3^{High} namnażanymi w temperaturze 37°C.

Powszechnie wiadomo natomiast, że komórki FoxP3^{High} stanowią najbardziej aktywną supresorowo frakcję limfocytów Treg, ponieważ aktywność immunoregulacyjna komórek Treg koreluje pozytywnie z intensywnością ekspresji czynnika FoxP3 (Marek N 2011) (Ryba M 2011). Z tego względu wysoki odsetek komórek FoxP3^{High} gwarantuje wyższą skuteczność terapii, w której stosowane są komórki Treg. W przeprowadzonych przez nas testach funkcjonalnych analizowaliśmy wpływ komórek Treg na proliferację limfocytów T CD4⁺ efektorowych (Teff) oraz na produkcję interferonu γ (IFN- γ) przez te komórki. Otrzymane wyniki wskazują, że komórki Treg hodowane w temperaturze 33°C wykazują tendencję do silniejszego hamowania proliferacji komórek Teff oraz produkcji IFN- γ przez te komórki w porównaniu z limfocytami Treg hodowanymi w temperaturze 37°C (Fig. 9–10). Ponadto, ekspansja limfocytów Treg w temperaturze 33°C związana jest z zaledwie śladową syntezą IFN- γ podczas 14-dniowej hodowli, kiedy komórki namnażane w temperaturze 37°C produkują ponad dwukrotnie większe ilości tej cytokiny (Fig. 11). Należy w tym miejscu również pamiętać, że komórki Treg dysponują szeregiem innych kluczowych dla rozwoju tolerancji mechanizmów działania, których nie przeanalizowaliśmy w naszych badaniach. Należy do nich m.in. hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych (ang. dendritic cell; DC), w konsekwencji czego powstają tzw. tolerogenne DC. Ponadto w wyniku bezpośredniego kontaktu z DC limfocyty Treg indukują w tych komórkach ekspresję 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO), która katalizuje następnie rozkład tryptofanu, prowadząc tym samym do zahamowania proliferacji aktywowanych limfocytów T cytotoksycznych (Tc) oraz pomocniczych (Th) (Vignali DA 2008) (Marek-Trzonkowska N 2013). W naszym modelu doświadczalnym nie używaliśmy komórek dendrytycznych. W związku z tym powyżej opisany mechanizm nie mógł zostać zweryfikowany. Próba oceny funkcjonalności komórek Treg w testach *in vitro* zawsze spotyka się z szeregiem ograniczeń. Z tego względu o stopniu funkcjonalnej przewagi komórek Treg namnażanych w temperaturze 33°C będzie można się dopiero w pełni przekonać w eksperymentach *in vivo*. Niemniej jednak, od lat naukowcy niezmiennie dochodzą do konkluzji, że gen kodujący czynnik transkrypcyjny FoxP3 jest głównym genem regulującym rozwój i funkcję komórek Treg. Transfer tylko tego jednego genu do konwencjonalnych, naiwnych limfocytów T nadaje im fenotyp i właściwości komórek Treg (Wang YM 2006) (Fontenot JD 2003). Tak zmodyfikowane limfocyty podobnie, jak komórki Treg produkują zaledwie wykrywalne ilości cytokin prozapalnych, wykazują ekspresję markerów powierzchniowych (np. CTLA-4), które są charakterystyczne dla komórek Treg, jak również hamują proliferację komórek Teff w sposób wprost proporcjonalny do ekspresji czynnika FoxP3. Podsumowując istnieje ścisła korelacja pomiędzy wysoką ekspresją czynnika FoxP3 a silnym działaniem supresorowym komórek Treg (Wang YM 2006) (Fontenot JD 2003; Marek N 2011) (Ryba M 2011).

Przeprowadzone przez nas doświadczenia wykazały jednocześnie, że 33°C to optymalna temperatura hodowli komórek Treg. Obniżanie temperatury ekspansji poniżej tej wartości nie jest wskazane, ponieważ hamuje intensywność proliferacji. Dolna granica temperatury, w której limfocyty Treg zachowują żywotność przez co najmniej 14 dni, to 29°C. Niemniej jednak w tych warunkach dochodzi już do całkowitego zahamowania namnażania i utraty charakterystycznych cech fenotypowych limfocytów Treg (Fig. 12–13). Jak w przypadku wszystkich żywych organizmów i komórek zakres tolerancji temperatury limfocytów Treg jest ściśle określony. Zaskakująco jednak – w stosunku do obecnego stanu wiedzy – nasze obserwacje wykazały jednocześnie, że optimum hodowli komórek Treg znajduje się poniżej fizjologicznej temperatury ciała człowieka, tj. w temperaturze 33°C.

Przedmiotem wynalazku jest sposób namnażania *in vitro* subpopulacji limfocytów Treg CD4⁺ o właściwościach immunosupresyjnych i fenotypie CD4⁺FoxP3⁺ zwanych dalej limfocytami Treg, gdzie proces namnażania komórek Treg odbywa się przez cały czas trwania hodowli lub okresowo w temperaturze w zakresie od >29°C do <37°C.

Sposób, gdzie namnażanie limfocytów Treg odbywa się przez cały okres trwania hodowli lub okresowo w temperaturze 33°C.

Sposób, który pozwala na zastosowanie otrzymanych komórek Treg w terapii klinicznej niepożądanym reakcji immunologicznych.

Sposób, gdzie komórki Treg stanowią komórki poliklonalne i/lub komórki antygenowo specyficzne.

Sposób, gdzie przez niepożądane reakcje immunologiczne rozumie się: choroby autoimmunizacyjne, odrzucanie przeszczepu, reakcje alergiczne oraz chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi.

Zaletami niniejszego wynalazku są:

- 1) wyższa liczba komórek Treg otrzymana podczas 14-dniowej hodowli niż w przypadku znanych do tej pory metod, które mogłyby zostać zastosowane do ekspansji komórek Treg w terapii klinicznej (Fig. 1).
- 2) w przypadku klinicznego zastosowania komórek Treg metoda ta umożliwia:
 - skrócenie czasu przygotowania preparatu komórek, a tym samym poddanie terapii większej liczby pacjentów
 - i/lub
 - uzyskanie wyższej o około 300% liczby komórek Treg w określonym czasie trwania ekspansji, pozwalając na podwyższenie dawki terapeutycznej komórek, która wpływa na efektywność leczenia
 - i/lub
 - namnożenie istotnej terapeutycznie liczby komórek Treg po pobraniu objętości krwi mniejszej od 250 ml, co sprawi, że komórki Treg będzie można zastosować także do leczenia najmłodszych dzieci, od których niemożliwe jest pobranie dużej ilości krwi
- 3) bardzo wysoka stabilność komórek Treg w czasie hodowli; ekspresja czynnika FoxP3 (Fig. 3, 8) oraz cząsteczki CD25 (Fig. 5) utrzymuje się przez cały czas trwania ekspansji na istotnie wyższym poziomie niż w przypadku hodowli w temperaturze 37°C czy w przypadku zastosowania chemioterapeutyków (np. rapamycyny) mających za zadanie utrzymać stabilność komórek Treg w hodowli; w przeciwieństwie do chemioterapeutyków zastosowana temperatura hodowli nie obniża żywotności komórek Treg, nie jest toksyczna dla komórek i nie stwarza ryzyka dla pacjenta
- 4) przez cały okres trwania hodowli limfocyty Treg hodowane w temperaturze 33°C charakteryzuje istotnie wyższy odsetek komórek FoxP3^{High} (Fig. 6), które wykazują większą stabilność w porównaniu z limfocytami Treg namnażanymi równolegle w temperaturze 37°C (Fig. 8), co pozytywnie wpływa na skuteczność terapii komórkowej wykorzystującej komórki Treg
- 5) komórki Treg namnażane w temperaturze 33°C produkują jedynie śladowe ilości IFN- γ (cytokina o działaniu prozapalnym) w trakcie całego czasu trwania hodowli (około 2% komórek IFN- γ ⁺), podczas kiedy ekspansja w temperaturze 37°C wiąże się ze stopniowym wzrostem odsetka komórek Treg IFN- γ ⁺ i jest ponad dwukrotnie wyższa w 14. dniu hodowli (Fig. 11) (Marek N 2011)
- 6) w porównaniu z limfocytami Treg hodowanymi w standardowej temperaturze 37°C, komórki Treg namnażane w temperaturze 33°C wykazują tendencję do silniejszego hamowania proliferacji limfocytów Teff (Fig. 9) oraz silniejszego hamowania produkcji IFN- γ przez te komórki (Fig. 10) – zjawisko to ma znaczenie dla skuteczności terapii komórkowych wykorzystujących komórki Treg
- 7) wysoka powtarzalność wyników dla hodowanych w 33°C komórek pochodzących od różnych dawców, różniących się m.in. płcią oraz wiekiem – gwarantuje m.in. większą przewidywalność procesu produkcji oraz efektu działania komórek Treg w przyszłych badaniach klinicznych
- 8) metoda nie niesie ze sobą ryzyka niepożądanych reakcji, które potencjalnie mogą wystąpić w przypadku, kiedy do hodowli komórek Treg dodawane są związki chemiczne/leki w celu poprawy ich stabilności czy proliferacji
- 9) w porównaniu z wcześniej opisanymi sposobami namnażania komórek Treg opracowana przez nas metoda
 - nie wymaga dodatkowych nakładów kosztów finansowych, ani dodatkowej pracy

Opis figur:

Fig. 1 – przedstawia zwielokrotnienie liczby limfocytów Treg w ciągu 14 dni hodowli. Na rycinie przedstawiono porównanie zwielokrotnienia liczby komórek Treg namnażanych w standardowo stosowanej temperaturze 37°C (kolumna w kolorze szarym; n=8) oraz w temperaturze 33°C (kolumna w kolorze białym; n=8) przez okres 14 dni. Wielkość tę obliczano jako stosunek końcowej liczby komórek uzyskanych w określonych warunkach hodowli w 14. dniu do wyjściowej liczby komórek przeznaczonych do ekspansji. Stąd otrzymane wyniki zwykle nie przyjmują wartości całkowitych (wyniki podano

z dokładnością dwóch miejsc po przecinku). Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. „*” oznacza wartość istotną statystycznie ($p < 0.05$).

Fig. 2 – przedstawia odsetek komórek $CD4^+FoxP3^+$ oraz intensywność ekspresji czynnika FoxP3 w tych komórkach. W górnej części ryciny przedstawiono cytometryczne wykresy kropkowe przedstawiające ekspresję czynnika FoxP3 w 14. dniu hodowli w limfocytach Treg pochodzących od tego samego dawcy namnażanych równolegle w temperaturze $37^\circ C$ (A) oraz $33^\circ C$ (B). Poniżej przedstawiono odsetek komórek $CD4^+FoxP3^+$ namnażanych w dwóch różnych warunkach temperatury (37 i $33^\circ C$) w 7. i 14. dniu hodowli (C; $n=8$) oraz intensywność ekspresji czynnika FoxP3 w tych komórkach w 14. dniu hodowli (D; $n=8$). Intensywność ekspresji czynnika FoxP3 jest wyrażona jako stosunek mediany intensywności fluorescencji (MFI) sygnału pozytywnego do mediany intensywności autofluorescencji niebarwionych komórek (INDEX MFI FoxP3). Kolumny wykresów w kolorze szarym przedstawiają wyniki otrzymane dla komórek hodowanych w temperaturze $37^\circ C$, natomiast kolumny w kolorze białym obrazują wyniki uzyskane dla komórek namnażanych w temperaturze $33^\circ C$. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. Wartości istotne statystycznie ($p < 0.05$) oznaczono „*”.

Fig. 3 – przedstawia stabilność ekspresji czynnika FoxP3 w całej populacji komórek Treg. Na rycinie przedstawiono różnicę pomiędzy odsetkiem komórek Treg $CD4^+FoxP3^+$ w 14. dniu hodowli, a odsetkiem tych komórek w 7. dniu hodowli dla całej populacji komórek Treg namnażanych równolegle w temperaturze $37^\circ C$ (kolumna w kolorze szarym; $n=8$) oraz w temperaturze $33^\circ C$ (kolumna w kolorze białym; $n=8$). Widoczny jest wyraźny spadek odsetka komórek $CD4^+FoxP3^+$ w czasie trwania hodowli tylko w przypadku komórek Treg namnażanych w temperaturze $37^\circ C$. Komórki namnażane w temperaturze $33^\circ C$ charakteryzuje stabilna ekspresja czynnika FoxP3 na przestrzeni czasu. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. „*” oznacza wartość istotną statystycznie ($p < 0.05$).

Fig. 4 – przedstawia odsetek komórek $CD25^{High}$ wśród limfocytów T $CD4^+FoxP3^+$ oraz intensywność produkcji cząsteczki CD25 przez te komórki w 7. i 14. dniu hodowli. W górnej części ryciny przedstawiono cytometryczne wykresy kropkowe przedstawiające ekspresję cząsteczki CD25 w 14. dniu hodowli na powierzchni pochodzących od tego samego dawcy limfocytów Treg namnażanych w temperaturze $37^\circ C$ (A) oraz komórek Treg hodowanych równolegle w temperaturze $37^\circ C$ (B) lub $33^\circ C$ (C). Poniżej przedstawiono odsetek komórek $CD25^{High}$ w populacji limfocytów Treg $CD4^+FoxP3^+$ namnażanych w dwóch różnych warunkach temperatury (37 i $33^\circ C$) w 7. i 14. dniu hodowli (D; $n=8$) oraz intensywność produkcji receptora CD25 przez te komórki w 7. i 14. dniu hodowli (E; $n=8$). Intensywność produkcji cząsteczki CD25 jest wyrażona jako stosunek mediany intensywności fluorescencji (MFI) sygnału pozytywnego do mediany intensywności autofluorescencji niebarwionych komórek (INDEX MFI CD25). Kolumny wykresów w kolorze szarym przedstawiają wyniki otrzymane dla komórek hodowanych w temperaturze $37^\circ C$, natomiast kolumny w kolorze białym ilustrują wyniki uzyskane dla limfocytów namnażanych w temperaturze $33^\circ C$. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. Wartości istotne statystycznie ($p < 0.05$) oznaczono „*”.

Fig. 5 – przedstawia stabilność ekspresji cząsteczki CD25 na powierzchni komórek Treg $CD4^+FoxP3^+$. Na rycinie ukazano różnicę pomiędzy odsetkiem komórek $CD25^{High}$ w 14. dniu hodowli, a odsetkiem tych komórek w 7. dniu hodowli dla całej populacji komórek Treg $CD4^+FoxP3^+$ namnażanych równolegle w temperaturze $37^\circ C$ (kolumna w kolorze szarym; $n=8$) oraz w temperaturze $33^\circ C$ (kolumna w kolorze białym; $n=8$). Widoczny jest wyraźny spadek odsetka komórek $CD25^+$ w czasie trwania hodowli tylko w przypadku komórek Treg namnażanych w temperaturze $37^\circ C$. Komórki hodowane w temperaturze $33^\circ C$ charakteryzuje wysoka i stabilna ekspresja cząsteczki CD25 na przestrzeni czasu. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. „*” oznacza wartość istotną statystycznie ($p < 0.05$).

Fig. 6 – przedstawia odsetek komórek $CD4^+FoxP3^{High}$ oraz intensywność ekspresji czynnika FoxP3 w tej populacji komórek. W górnej części ryciny przedstawiono cytometryczne wykresy kropkowe obrazujące różnicę pomiędzy częstotliwością występowania komórek Treg $CD4^+FoxP3^{High}$ wśród limfocytów Treg $CD4^+FoxP3^+$ pochodzących od tego samego dawcy namnażanych równolegle w temperaturze $37^\circ C$ (A) oraz $33^\circ C$ (B). Poniżej przedstawiono porównanie odsetka komórek $CD4^+FoxP3^{High}$ wśród limfocytów Treg $CD4^+FoxP3^+$ namnażanych w dwóch różnych warunkach temperatury

(37 i 33°C) w 7. i 14. dniu hodowli (C; n=8). Kolumny wykresów w kolorze szarym przedstawiają wyniki otrzymane dla komórek hodowanych w temperaturze 37°C, natomiast kolumny w kolorze białym ilustrują wyniki uzyskane dla komórek namnażanych w temperaturze 33°C. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. Wartości istotne statystycznie ($p < 0.05$) oznaczono „**”.

Fig. 7 – przedstawia odsetek komórek CD25^{High} wśród limfocytów T CD4⁺FoxP3^{High} oraz intensywność produkcji cząsteczki CD25 przez te komórki w 7. i 14. dniu hodowli. Rycina ilustruje porównanie odsetka komórek CD25^{High} w populacji limfocytów Treg CD4⁺FoxP3^{High} namnażanych w dwóch różnych warunkach temperatury (37 i 33°C) w 7. i 14. dniu hodowli (A; n=8) oraz intensywność produkcji cząsteczki CD25 przez te komórki w 7. i 14. dniu hodowli (B; n=8). Intensywność produkcji cząsteczki CD25 jest wyrażona jako stosunek mediany intensywności fluorescencji (MFI) sygnału pozytywnego do mediany intensywności autofluorescencji niebarwionych komórek (INDEX MFI CD25). Kolumny wykresów w kolorze szarym przedstawiają wyniki otrzymane dla komórek hodowanych w temperaturze 37°C, natomiast kolumny w kolorze białym ilustrują wyniki uzyskane dla komórek namnażanych w temperaturze 33°C. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. Wartości istotne statystycznie ($p < 0.05$) oznaczono „**”.

Fig. 8 – przedstawia stabilność ekspresji czynnika FoxP3 w populacji komórek Treg CD4⁺FoxP3^{High}. Na rycinie zilustrowano różnicę pomiędzy odsetkiem limfocytów Treg CD4⁺FoxP3^{High} w populacji komórek CD4⁺FoxP3⁺ w 14. dniu hodowli, a ich odsetkiem w 7. dniu ekspansji dla komórek namnażanych równolegle w temperaturze 37°C (kolumna w kolorze szarym; n=8) oraz w temperaturze 33°C (kolumna w kolorze białym; n=8). W przypadku limfocytów Treg namnażanych w temperaturze 37°C widoczny jest wyraźny spadek odsetka populacji CD4⁺FoxP3^{High} w czasie trwania hodowli. Komórki namnażane w temperaturze 33°C charakteryzuje istotnie większa stabilność ekspresji czynnika FoxP3 na przestrzeni czasu. Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. „**” oznacza wartość istotną statystycznie ($p < 0.05$).

Fig. 9 – ilustruje hamowanie proliferacji limfocytów T efektorowych przez komórki Treg pochodzące z 14-dniowych hodowli. Na rycinie przedstawiono procent hamowania proliferacji komórek T CD4⁺ efektorowych (Teff) przez limfocyty Treg hodowane uprzednio przez 14 dni w standardowo stosowanej temperaturze 37°C (wykres w kolorze szarym, n=4) oraz temperaturze 33°C (wykres w kolorze czerwonym, n=4). Przedstawiono wyniki hamowania proliferacji dla różnych proporcji komórek Teff do Treg. Wynik dla niestymulowanych limfocytów Teff hodowanych bez dodatku komórek Treg (K) traktowano za każdym razem jako tło, które odejmowano od wszystkich pozostałych wyników z danego eksperymentu, stąd przyjmuje on zawsze wartość 100% i oznacza, że 100% komórek Teff nie uległo nawet 1 podziałowi. Odpowiednio więc wynik dla komórek Teff stymulowanych i hodowanych bez dodatku limfocytów Treg (1:0) przyjmuje zawsze wartość 0% (całkowity brak hamowania). Różnice analizowano z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum.

Fig. 10 – ilustruje hamowanie produkcji IFN- γ w komórkach T efektorowych przez limfocyty Treg pochodzące z 14-dniowych hodowli. Na rycinie przedstawiono procent hamowania produkcji IFN- γ w limfocytach T CD4⁺ efektorowych (Teff) przez komórki Treg hodowane uprzednio przez 14 dni w standardowo stosowanej temperaturze 37°C (wykres w kolorze szarym, n=4) oraz temperaturze 33°C (wykres w kolorze czerwonym, n=4). Przedstawiono wyniki hamowania produkcji IFN- γ dla różnych proporcji komórek Teff do Treg. Wynik dla niestymulowanych limfocytów Teff hodowanych bez dodatku komórek Treg (K) traktowano za każdym razem jako tło, które odejmowano od wszystkich pozostałych wyników z danego eksperymentu, stąd przyjmuje on zawsze wartość 100% i oznacza, że 100% komórek Teff było IFN- γ . Odpowiednio więc wynik dla limfocytów Teff stymulowanych i hodowanych bez dodatku komórek Treg (1:0) przyjmuje zawsze wartość 0% (całkowity brak hamowania). Różnice analizowano z zastosowaniem testu U Mann'a-Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum.

Fig. 11 – ilustruje produkcję IFN- γ w limfocytach Treg w 14. dniu hodowli. Na rycinie przedstawiono różnicę pomiędzy odsetkiem komórek IFN- γ ⁺ w populacji limfocytów Treg CD4⁺FoxP3⁺ namnażanych równolegle przez 14 dni w temperaturze 37°C (kolumna w kolorze szarym; n=4) oraz w temperaturze 33°C (kolumna w kolorze białym; n=4). Różnice obliczono z zastosowaniem testu U Mann'a-

Whitney'a dla danych nieparametrycznych. Wartości przedstawiono jako medianę oraz minimum i maksimum. „*” oznacza wartość istotną statystycznie ($p < 0.05$).

Fig. 12 – przedstawia przykładowe cytometryczne wykresy kropkowe ilustrujące odsetek komórek CD25^{High} w 14. dniu hodowli w populacji limfocytów Treg CD4⁺FoxP3⁺ pochodzących od tego samego dawcy namnażanych równolegle w temperaturze 37°C (A), 33°C (B) oraz 29°C (C).

Fig. 13 – przedstawia przykładowe cytometryczne wykresy kropkowe ilustrujące odsetek komórek CD4⁺ FoxP3⁺ w hodowli limfocytów Treg pochodzących od tego samego dawcy namnażanych równolegle przez 14 dni w temperaturze 37°C (A), 33°C (B) oraz 29°C (C).

Wynalazek ilustruje następujący przykład wykonania, nie stanowiący jego ograniczenia

P r z y k ł a d:

Izolacja limfocytów Treg i komórek T CD4⁺ efektorowych

Limfocyty Treg oraz T CD4⁺ efektorowe (Teff) krwi obwodowej pozyskiwano z kożuszków płytkowo-leukocytarnych honorowych dawców krwi obu płci. Z otrzymanego materiału izolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells; PBMC) poprzez wirowanie w gradiencie stężeń Ficoll/Uropolina. Następnie metodą negatywnej selekcji immunomagnetycznej izolowano limfocyty T CD4⁺ (czystość izolacji 90–99%). W tym celu używano zestawu „EasySep Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit” (Stemcell Technologies), który umożliwia eliminację komórek wykazujących ekspresję następujących antygenów: CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123, TCR γ/δ oraz glikoforyna A. Wyizolowane limfocyty T CD4⁺ znakowano następnie przeciwciałami monoklonalnymi (ang. monoclonal antibodies; mAb; 5 μ l mAb/10⁶ komórek) rozpoznającymi następujące antygeny: CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, CD25 oraz CD 127 (BD Biosciences). Spośród wymienionych przeciwciał, przeciwciała rozpoznające antygeny: CD14, CD16, CD19 i CD8 były skoniugowane z tym samym fluorochromem. Celem takiego sposobu barwienia jest eliminacja komórek pozytywnych dla wymienionych antygenów (odpowiednio: monocyty, komórki NK, limfocyty B i T cytotoksyczne, oznaczone wspólnie w algorytmie izolacji jako *lineage*) bez konieczności wprowadzania dodatkowych barwników, zmniejszając tym samym niepożądane zjawisko nakładania się widm fluorescencji.

Następnie komórki były sortowane przy użyciu cytometru sortującego do limfocytów Treg o następującym fenotypie: CD3⁺CD4⁺CD25^{high} CD127^{-/Low}doublet⁻lineage⁻dead⁻ oraz limfocytów Teff, które charakteryzował następujący wzór antygenów CD3⁺CD4⁺CD25⁻doublet⁻lineage⁻dead⁻.

Czystość wyizolowanych komórek Treg wynosiła ~100% [mediana(min-max): 98%(97–99)]. W tym miejscu należy nadmienić, że zastosowany sorter komórkowy Influx (BD Biosciences) został zaadaptowany do wymogów dobrej praktyki produkcyjnej (ang. good manufacturing practice; GMP). Jego dużą zaletą z punktu widzenia terapii klinicznej jest wymienna linia przepływu próbki, co eliminuje ryzyko kontaminacji komórek patogenami pochodzącymi z wcześniej przetwarzanego materiału innych pacjentów. Niemniej jednak, w zależności od aplikacji (badania naukowe/terapia kliniczna) komórki Treg można pozyskiwać także z zastosowaniem innych typów sorterów komórkowych. Opisany przez nas algorytm izolacji, a następnie sposób namnażania będący przedmiotem niniejszego zgłoszenia pozwala na otrzymanie identycznych wyników ekspansji komórek Treg także w przypadku użycia innego modelu maszyny sortującej. Zastosowany w przykładzie sorter komórkowy nie stanowi więc ograniczenia niniejszego wynalazku.

Wyizolowane limfocyty Treg oraz komórki Teff były następnie wysiewane na oddzielne płytki hodowlane i inkubowane w temperaturze 37°C oraz 33°C w pożywce hodowlanej SCGM (CellGro), która spełnia standardy GMP. Pożywka zawierała antybiotyki (penicylina 100 U/ml i streptomycyna 100 mg/ml) i była suplementowana ludzką inaktywowaną surowicą AB (10%) oraz interleukiną 2 (IL-2; 2000 U/ml; Proleukin; Chiron, San Diego, CA). Ponadto, w pierwszym i 7. dniu do hodowli dodawano mikrosfery magnetyczne opłaszczone przeciwciałami anti-CD3 i anti- CD28 (Invitrogen; Carlsbad, CA) w stosunku 1:1 z hodowanymi komórkami Treg. Wyżej wymienione mikrosfery naśladują działanie komórek prezentujących antygen, stymulując tym samym proliferację limfocytów Treg.

W przypadku niektórych hodowli część komórek Treg inkubowano także w temperaturze 29°C w celu określenia dolnej granicy temperatury, w której komórki Treg utrzymują żywotność, zdolności proliferacyjne i pożądany fenotyp.

Zwielokrotnienie wyjściowej liczby komórek w czasie 14-dniowej hodowli

Po 14 dniach zbierano wszystkie hodowane limfocyty Treg, płukano buforem PBS, oczyszczano z mikrosfer stymulujących i liczone. Zwielokrotnienie wyjściowej liczby limfocytów Treg hodowanych

w określonych warunkach temperatury obliczano dzieląc uzyskaną na końcu ekspansji (dzień 14.) całkowitą liczbę komórek Treg przez liczbę limfocytów Treg wysianych do hodowli w dniu zero.

Zaobserwowano, że hodując limfocyty Treg w temperaturze 33°C otrzymuje się w ciągu 14 dni około trzykrotnie wyższą liczbę komórek niż w przypadku ekspansji w standardowo stosowanej temperaturze 37°C (Fig. 1). Wykazano ponadto, że 29°C stanowi dolną granicą temperatury, w której można utrzymać w hodowli żywe komórki Treg. W temperaturze tej dochodzi jednak do zahamowania proliferacji limfocytów Treg. Z tego względu obniżenie temperatury hodowli poniżej 33°C jest niewskazane, a temperatura 33°C jest optymalną temperaturą hodowli komórek Treg.

Przedłużenie czasu ekspansji do 4–5 tygodni prowadziło do istotnego obniżenia odsetka komórek FoxP3⁺ w przypadku limfocytów Treg namnażanych w temperaturze 37°C (\approx 40–45% komórek FoxP3⁺), podczas kiedy limfocyty Treg hodowane w temperaturze 33°C niezmiennie charakteryzowała wysoka ekspresja czynnika FoxP3 (\approx 90–95% komórek FoxP3⁺) i jednocześnie intensywna proliferacja. Po 4 i 5 tygodniach hodowli zwiokrotnienie wyjściowej liczby komórek Treg namnażanych w 33°C wynosiło odpowiednio \approx 6000 i \approx 115 000. Z tego względu przedłużenie czasu hodowli komórek Treg w 33°C jest możliwe bez obniżenia ich jakości i z jednoczesnym uzyskaniem wielokrotnie wyższej liczby komórek. Podjęcie decyzji o wydłużeniu czasu ekspansji zależy jednak od aplikacji, w której komórki Treg mają zostać użyte. W terapii klinicznej czas 7–14 dni w zupełności wystarcza by otrzymać istotną terapeutycznie liczbę komórek Treg (Marek-Trzonkowska N 2012) (Marek-Trzonkowska N 2014).

W przypadku komórek utrzymywanych w temperaturze w 29°C hodowle kończyły się po 3 tygodniach z powodu niskiej żywotności komórek i zahamowania ich proliferacji.

Kontrola fenotypu

Każdego 7. i 14. dnia hodowli zbierano próbkę komórek Treg hodowanych w temperaturze 33, 37°C oraz 29°C i znakowano je następującymi przeciwciałami monoklonalnymi: anty-CD3, anty-CD4, anty-CD25 andty-CD127, anty-CD62L, anty- CD45RA oraz anty-FoxP3 z zastosowaniem zestawu *Foxp3 Staining Buffer Set* (eBiosciences). Następnie komórki analizowano z zastosowaniem cytometru przepływowego (Canto II, BD Biosciences).

Zaobserwowano, że komórki Treg hodowane w temperaturze 33°C w porównaniu z limfocytami Treg namnażanymi w standardowo stosowanej temperaturze 37°C charakteryzował istotnie wyższy odsetek komórek FoxP3⁺ zarówno w 7. ($p=0.049$) jak i w 14. ($p=1 \times 10^{-4}$) dniu ekspansji. Różnice te były szczególnie widoczne w ostatnim dniu hodowli. Ponadto w 14. dniu ekspansji komórki Treg FoxP3⁺ namnażane w temperaturze 33°C wykazywały większą intensywność ekspresji czynnika FoxP3 ($p=0.037$) mierzoną jako stosunek mediany intensywności fluorescencji (MFI) sygnału pozytywnego do mediany intensywności autofluorescencji niebarwionych komórek (INDEX MFI FoxP3) (Fig. 2).

Porównanie odsetka limfocytów Treg FoxP3⁺ w 14. dniu z odsetkiem tych komórek w dniu 7., wykazało, że komórki Treg hodowane w temperaturze 33°C charakteryzuje istotnie większa stabilność ekspresji czynnika FoxP3 w czasie trwania hodowli, niż komórki Treg namnażane w temperaturze 37°C. Spadek odsetka komórek Treg FoxP3⁺ w 14. dniu hodowli w przypadku komórek namnażanych w 33°C wynosił zwykle 2% (mediana), podczas, kiedy w przypadku ekspansji w 37°C był on ponad sześciokrotnie większy i wynosił 12.9% (mediana) (Fig. 3; $p=0.001$).

Podobne różnice zaobserwowano w przypadku ekspresji cząsteczki CD25. Mianowicie, hodowla w temperaturze 33°C była związana z istotnie wyższym odsetkiem komórek CD25^{High} wśród komórek CD4⁺FoxP3⁺ w 7. ($p=0.006$) i 14. ($p=0.003$) dniu ekspansji. Ponadto komórki CD4⁺FoxP3⁺CD25^{High} namnażane w temperaturze 33°C wykazywały większą intensywność ekspresji receptora CD25 (INDEX MFI CD25) niż limfocyty tej populacji hodowane w temperaturze 37°C zarówno w 7. ($p=0.014$), jak i w 14. ($p=0.006$) dniu hodowli (Fig. 4).

Podobnie, jak w przypadku czynnika FoxP3, ekspresja cząsteczki CD25 była bardziej stabilna w komórkach Treg namnażanych w temperaturze 33°C. Spadek odsetka komórek Treg CD4⁺FoxP3⁺CD25^{High} w 14. dniu hodowli w przypadku komórek namnażanych w 33°C wynosił zwykle 1.65% (mediana), podczas, kiedy w przypadku ekspansji w 37°C był on około sześciokrotnie większy i wynosił 6.2% (mediana) (Fig.5).

Zaobserwowano ponadto, że limfocyty Treg hodowane w temperaturze 33°C charakteryzował istotnie wyższy odsetek komórek o najwyższej intensywności ekspresji czynnika FoxP3 (FoxP3^{High}) w 7. ($p=0.049$) i 14. ($p=1 \times 10^{-4}$) dniu hodowli w porównaniu z limfocytami Treg namnażanymi równolegle w temperaturze 37°C (Fig.6). Ponadto podczas ekspansji w temperaturze 33°C populacja CD4⁺FoxP3^{High} charakteryzowała się wyższym odsetkiem komórek CD25^{High} zarówno w 7. ($p=0.002$)

i w 14. ($p=0.003$) dniu hodowli, jak i większą intensywnością produkcji receptora CD25 (INDEX MFI CD25) niż limfocyty tej populacji hodowane w temperaturze 37°C (dzień 7. $p=0.010$; dzień 14. $p=0.049$; Fig. 7).

Podobnie, jak w przypadku wszystkich komórek CD4⁺FoxP3⁺, stabilność ekspresji czynnika FoxP3 ($p=0.037$) w subpopulacji CD4⁺FoxP3^{High} była istotnie wyższa w przypadku, kiedy limfocyty Treg namnażano w temperaturze 33°C (Fig. 8).

W porównaniu z komórkami namnażanymi zarówno w 33°C, jak i w standardowo stosowanej temperaturze 37°C komórki Treg hodowane w 29°C charakteryzowała szybka utrata charakterystycznych cech fenotypowych. Po 14 dniach hodowli w temperaturze 29°C zaledwie 7–20 % limfocytów Treg zachowywało typowy dla tej populacji fenotyp komórek CD25^{High} (Fig. 12). Zjawisko to obserwowano już po pierwszym tygodniu ekspansji. Obniżenie temperatury hodowli do 29°C miało również niekorzystne działanie na ekspresję czynnika FoxP3. Mimo, że po pierwszych 7 dniach hodowli w 29°C komórki Treg wykazywały stosunkowo wysoką ekspresję tego markera ($\approx 80\%$ komórek FoxP3⁺), to w 14. dniu odsetek limfocytów Treg FoxP3⁺ wynosił zaledwie $\approx 20\%$ (Fig. 13). Między pierwszym a drugim tygodniem hodowli w 29°C około 60% komórek Treg traciło więc ekspresję głównego markera i regulatora ich funkcji, jakim jest czynnik FoxP3. Przeprowadzone doświadczenia wykazały więc, że temperatura 33°C jest optymalną temperaturą hodowli komórek Treg, która nie tylko pozwala na zintensyfikowanie ich namnażania, lecz pozwala również na utrzymanie wysokiej jakości oraz stabilności limfocytów Treg. Dalsze obniżanie temperatury hodowli jest niewskazane, a 29°C stanowi dolną granicę temperatury, w której limfocyty Treg przeżywają, lecz jednocześnie przestają proliferować i szybko tracą typowe cechy fenotypowe.

Test hamowania proliferacji limfocytów Teff przez komórki Treg

Po 8 dniach z hodowli komórek Treg namnażanych w 33 i 37°C pobierano próbki do testu funkcjonalnego w celu potwierdzenia hamującego wpływu komórek Treg na proliferację autologicznych limfocytów Teff CD4⁺. Równolegle pobierano próbkę komórek Teff, które wcześniej namnażano w standardowej temperaturze hodowli (37°C) i w takiej samej pożywce hodowlanej, jak badane komórki Treg. Komórki przeznaczone do testu (Treg oraz Teff) płukano buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS), oczyszczano z mikrosfer używanych do stymulacji oraz liczone. Następnie komórki zawieszano w świeżej pożywce hodowlanej zawierającej antybiotyki oraz ludzką inaktywowaną surowicę AB (10%). Przez kolejne 2 dni komórki Treg nadal hodowano osobno w 33 i 37°C, a limfocyty Teff w 37°C. Do pożywki hodowlanej zarówno limfocytów Treg, jak i Teff nie dodawano przez ten czas IL-2 oraz aktywujących mikrosfer. Dzięki temu komórki Treg oraz Teff wchodziły w stan spoczynku. Zabieg ten miał na celu doprowadzenie wszystkich badanych komórek do porównywalnego poziomu aktywacji, dzięki czemu możliwe było obiektywne porównanie zdolności supresorowych badanych populacji komórek Treg.

Po upływie 48h komórki przeznaczone do testu (Treg oraz Teff) płukano buforem (PBS) oraz ponownie liczone. Następnie komórki Teff barwiono roztworem sukcynimidylowego estru diocjanu karboksylfluoresceiny (CFDA; Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen; 5 μ M; 15 min., 37°C) w celu przeprowadzenia analizy ich proliferacji w obecności limfocytów Treg uprzednio hodowanych w temperaturze 33 i 37°C.

Znakowane CFDA autologiczne limfocyty Teff mieszano w następujących proporcjach z komórkami Treg hodowanymi uprzednio w 33 i 37°C: 1:1, 1:1/2 i 1/4. Liczba komórek Teff była za każdym razem stała, a liczba limfocytów Treg zmienna. Komórki te były zawieszane w świeżej pożywce hodowlanej zawierającej ludzką inaktywowaną surowicę AB (10%) oraz interleukinę 2 (IL-2; 100 U/ml). Do komórek dodawano ponadto mikrosfery opłaszczane przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 w proporcji 1 mikrosfera na 1 limfocyt Teff. Za każdym razem przygotowywano również kontrolę pozytywną i negatywną zawierającą odpowiednio, stymulowane i niestymulowane komórki Teff hodowane bez limfocytów Treg. Dodatkową kontrolę stanowiły również stymulowane i niebarwione komórki Treg, które hodowano bez limfocytów Teff.

Wysiane w ten sposób komórki hodowano przez następne 4 dni w 37°C, tj. do dnia 14., który był jednocześnie ostatnim dniem hodowli. Po upływie tego czasu komórki zbierano, znakowano przeciwciałami anti-CD4 i anti-FoxP3 z zastosowaniem zestawu *Foxp3 Staining Buffer Set* (eBiosciences), a następnie analizowano przy użyciu cytometru przepływowego (Canto II, BD Biosciences).

Dzięki znakowaniu przeciwciałem anti-FoxP3 bez trudu można było odróżnić niewielki odsetek komórek Teff, które w czasie 4 dni trwania hodowli szczególnie intensywnie proliferowały. W wyniku licznych podziałów w niektórych przypadkach może dojść do znacznego rozcieńczenia CFDA w komórkach Teff nawet w krótkim czasie. W efekcie czego widmo fluorescencji komórek, w których doszło do

znacznego rozcieńczenia CFDA może pokrywać się z widmem autofluorescencji. W związku z tym, znakowanie przeciwciałem anti-FoxP3 pozwala uniknąć błędów wynikających z tego zjawiska. Bez znakowania FoxP3 w teście proliferacyjnym z CFDA (lub innymi barwnikami działającymi na podobnej zasadzie) intensywnie proliferujące komórki Teff o niskiej fluorescencji znacznika mogą zostać błędnie zinterpretowane jako niebarwione komórki Treg, zaciemniając prawdziwy rezultat testu.

Wynik dla niestymulowanych limfocytów Teff hodowanych bez dodatku komórek Treg (K) interpretowano za każdym razem jako tło, które odejmowano od wszystkich pozostałych wyników z danego eksperymentu, stąd przyjmował on zawsze wartość 100%, co oznaczało, że 100% komórek Teff nie uległo nawet 1 podziałowi. Odpowiednio więc wynik dla komórek Teff stymulowanych i hodowanych bez dodatku limfocytów Treg (1:0) przyjmował zawsze wartość 0% (całkowity brak hamowania).

Otrzymane wyniki wskazują, że komórki Treg hodowane w temperaturze 33°C wykazują tendencję do silniejszego hamowania proliferacji komórek Teff CD4⁺ w porównaniu z limfocytami Treg hodowanymi w temperaturze 37°C (Fig. 9). Różnice te nie osiągnęły jednak znamienności statystycznej.

W przypadku komórek namnażanych w temperaturze 29°C przeprowadzenie testów funkcjonalnych nie było możliwe z przyczyn technicznych. Mianowicie z powodu całkowitego zahamowania proliferacji w temperaturze 29°C nie uzyskano odpowiedniej liczby komórek Treg, która mogłaby zostać użyta zarówno do kontroli fenotypu, jak i do oceny aktywności supresorowej tych komórek.

Test hamowania produkcji interferonu γ (IFN- γ) oraz analiza produkcji tej cytokiny przez komórki Treg

Po 11 dniach z hodowli komórek Treg namnażanych w 33 i 37°C pobierano próbki do testu funkcjonalnego, mającego na celu potwierdzenie hamującego wpływu komórek Treg na produkcję IFN- γ (cytokina o działaniu prozapalnym) przez autologiczne komórki Teff CD4⁺. Równolegle pobierano próbkę komórek Teff, które wcześniej namnażano w standardowej temperaturze hodowli (37°C) i w takiej samej pożywce hodowlanej, jak badane komórki Treg. Tak samo, jak w przypadku opisanego powyżej testu hamowania proliferacji komórki przeznaczone do testu hamowania produkcji IFN- γ płukano i oczyszczano ze stymulujących proliferację mikrosfer, wprowadzając je w stan spoczynku w ciągu 48h (hodowla bez mikrosfer i IL-2).

Po upływie 2 dni, tj. 13. dnia hodowli komórki przeznaczone do testu (Treg oraz Teff) płukano buforem (PBS) i liczone. Następnie komórki Teff barwiono roztworem CFDA (5 μ M; 15 min., 37°C) w celu ich późniejszego odróżnienia od niebarwionych komórek Treg. Znakowane CFDA autologiczne limfocyty Teff mieszano w następujących proporcjach z komórkami Treg hodowanymi uprzednio w 33 i 37°C: 1:1, 1:½, 1:¼, i 1:⅙, gdzie liczba komórek Teff była stała, a liczba limfocytów Treg zmienna. Komórki te były zawieszane w świeżej pożywce hodowlanej zawierającej ludzką inaktywowaną surowicę AB (10%) oraz interleukinę 2 (1L-2; 100 U/ml). Do komórek dodawano ponadto mikrosfery opłaszczane przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 w ilości 1 mikrosfera na 1 limfocyt Teff oraz monenzynę tj. inhibitor transportu białek (*GolgiStop*, BD Biosciences; 2 μ l/1000 μ l pożywki), w celu zahamowania wydzielania wyprodukowanego IFN- γ poza komórkę. Ponadto za każdym razem przygotowywano również kontrolę pozytywną, kontrolę negatywną oraz analizowano produkcję IFN- γ w komórkach Treg inkubowanych bez dodatku limfocytów Teff. Kontrolę pozytywną stanowiły stymulowane komórki Teff inkubowane bez dodatku limfocytów Treg. Przez kontrolę negatywną rozumiano niestymulowane limfocyty Teff również inkubowane bez dodatku komórek Treg. Po 24h stymulacji w 37°C (w 14. dniu hodowli) badane komórki znakowano przeciwciałami anti-CD4 i anti-IFN- γ z zastosowaniem zestawu do barwienia antygenów wewnątrzkomórkowych [*BD Cytotfix/CytoPermPlus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop*; BD Biosciences) i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego (Canto II, BD Biosciences).

Wszystkie testy funkcjonalne przeprowadzano w standardowej temperaturze hodowli limfocytów T, tj. w 37°C. Temperatura ta została wybrana do testów z tego względu, że jest ona jednocześnie fizjologiczną temperaturą ciała ludzkiego, w której hodowane komórki Treg będą musiały funkcjonować po podaniu pacjentowi.

Wynik dla komórek Teff niestymulowanych i hodowanych bez dodatku limfocytów Treg (K) interpretowano jako tło, które odejmowano za każdym razem od wszystkich analizowanych wyników. Z tego względu przyjmował on zawsze wartość 100% co oznaczało, że w przypadku niestymulowanych hodowli 100% komórek Teff było IFN- γ . Dla komórek Teff stymulowanych i hodowanych bez dodatku limfocytów Treg (1:0) wynik ten przyjmował zawsze wartość 0% (całkowity brak hamowania).

Zaobserwowano, że komórki Treg hodowane w temperaturze 33°C wykazywały tendencję do silniejszego hamowania produkcji IFN- γ przez limfocyty Teff w porównaniu z komórkami Treg namnażanymi w temperaturze 37°C (Fig. 10). Różnice te nie osiągnęły jednak znamienności statystycznej.

Ponadto wykazano, że limfocyty Treg hodowane w temperaturze 33°C produkowały zaledwie śladowe ilości IFN- γ po 14-dniowej ekspansji (mediana 2.5%), podczas kiedy odsetek komórek IFN- γ ⁺ był ponad dwukrotnie większy w populacji limfocytów Treg namnażanych w temperaturze 37°C (5.3% mediana; p=0.031 (Fig. 11).

Podobnie, jak wykonanie testów hamowania proliferacji limfocytów Teff, tak i przeprowadzenie analizy hamowania produkcji IFN- γ z udziałem komórek Treg hodowanych w temperaturze 29°C nie było możliwe z powodu niewystarczającej liczby tych komórek.

Literatura:

- Andrés A (2005). „Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation.” *Crit Rev Oncol Hematol* **56** (1): 71–85.
- Barbaro MP, Spanevello A, Palladino GP, Salerno FG, Lacedonia D, Carpagnano GE, (2014). „Exhaled matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in different biological phenotypes of asthma.” *Eur J Intern Med* **25** (1): 92–96.
- Berney T, Secchi A (2009). „Rapamycin in islet transplantation: friend or foe?” *Transpl Int* **22** (2) 153–161.
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, Liu W, Long SA, Masiello LM, Nguyen V, Putnam AL, Rieck M, Sayre PH, Tang Q, (2015). „Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells.” *Sci Transl Med* **7**(315): 315ra189.
- Bluestone JA, Trotta E, Xu D, (2015). „The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease.” *Expert Opin Ther Targets* **19** (8): 1091–1103.
- Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF, (2011). „Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation.” *Blood* **117**(14): 3921–398.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY, (2003). „Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.” *Nat Immunol* **4**(4): 330–336.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD, (2003). „Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis.” *Curr Opin Rheumatol* **15**: 430–435.
- Gupta S, (2012). „Immunotherapies in diabetes mellitus type 1.” *Med Clin North Am* **96**(3): 621–634.
- Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wiczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Edinger M, (2009). „Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive *in vitro* stimulation.” *Eur J Immunol* **39**(4): 1088–1097.
- Lima XT, Cintra ML, Piazza AC, Mamoni RL, Oliveira RT, Magalhães RF, Blotta MH, (2015). „Frequency and characteristics of circulating CD4⁺ CD28(null) T cells in patients with psoriasis.” *Br J Dermatol* **173**(4): 998–1005.
- Malek TR (2003). „The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells.” *J Leukoc Biol* **74**(6): 961–965.
- Malek TR, Castro 1 (2010). „Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity.” *Immunity* **33**(2): 153–165.
- Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, Wujtewicz MA, Witkowski P, Młynarski W, Balcerska A, Myśliwska J, Trzonkowski P, (2012). „Administration of CD4⁺CD25^{High} CD127[–] regulatory T cells preserves β -cell function in type 1 diabetes in children.” *Diabetes Care* **35**(9): 1817–1820.
- Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Siebert J, Trzonkowski P, (2013). „Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes.” *Pediatr Diabetes* **14**(5): 322–332.
- Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, Owczuk R, Szadkowska A, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P, (2014). „Therapy of type 1 diabetes with CD4⁺CD25^{High}CD127[–]

- regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets – results of one year follow-up.” Clin Immunol **153**(1): 23–30.
- Marek N, Bieniaszewska M, Krzystyniak A, Juścińska J, Myśliwska J, Witkowski P, Hellmann A, Trzonkowski P, (2011). „The time is crucial for *ex vivo* expansion of T regulatory cells for therapy.” Cell Transplant **20** (11–12k) 1747–1758.
- Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Pierini A, Massei MS, Amico L, Urbani E, Del Papa B, Zei T, Iacucci Ostini R, Cecchini D, Tognellini R, Reisner Y, Aversa F, Falini B, Velardi A, (2014). „HLA haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse.” Blood **124**(4): 638–644.
- Mu Q, Zhang H, Luo XM, (2015). „SLE: another autoimmune disorder influenced by microbes and diet?” Front Immunol **6**(artykuł 608): 1–10.
- Orent W, McHenry AR, Rao DA, White C, Klein HU, Bassil R, Srivastava G, Replogle JM, Raj T, Frangieh M, Cimpean M, Cuerdo N, Chibnik L, Khoury SJ, Karlson EW, Brenner MB, De Jager P, Bradshaw EM, Elyaman W, (2015). „Rheumatoid arthritis-associated RBPJ polymorphism alters memory CD4+ T cells.” Hum Mol Genet DOI: **10.1093/hmg/ddv474** (w druku).
- Panettieri RA, Jr Covar R, Grant E, Hillyer EV, Bacharier L, (2008). „Natural history of asthma: persistence versus progression-does the beginning predict the end?” J Allergy Clin Immunol **121**(3): 607–613.
- Prókai Á, Csohány R, Sziksz E, Pap D, Balicza-Himer L, Boros S, Magda B, Vannay Á, Kis-Petik K, Fekete A, Peti-Peterdi J, Szabó AJ, (2015). „Calcineurin-inhibition results in upregulation of local renin and subsequent vascular endothelial growth factor production in renal collecting ducts.” Transplantation DOI: **10.1097/TP.0000000000000961** (w druku).
- Pujol-Autonell I, Ampudia RM, Monge P, Lucas AM, Carrascal J, Verdager J, Vives-Pi M, (2013). „Immunotherapy with Tolerogenic Dendritic Cells Alone or in Combination with Rapamycin Does Not Reverse Diabetes in NOD Mice.” ISRN Endocrinol **2013**(ID 346987): 1–5.
- Rama I, Grinyó JM (2010). „Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression.” Nat Rev Nephrol **6**(9): 511–519.
- Ryba M, Marek N, Hak Ł, Rybarczyk-Kapturska K, Myśliwiec M, Trzonkowski P, Myśliwska J, (2011). „Anti-TNF rescue CD4+FoxP3+ regulatory T cells in patients with type 1 diabetes from effects mediated by TNF.” Cytokine **55**(3): 353–361.
- Sénécal V, Deblois G, Beauseigle D, Schneider R, Brandenburg J, Newcombe J, Moore CS, Prat A, Antel J, Arbour N, (2015). „Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses.” Glia DOI: **10.1002/glia.22948** (w druku).
- Tang Q, Bluestone JA (2013). „Regulatory T-cell therapy in transplantation-moving to the clinic.” Cold Spring Harb Perspect Med **3**(11): pii: a015552.
- Trzonkowski P, Bacchetta R, Battaglia M, Berglund D, Bohnenkamp HR, ten Brinke A, Bushell A, Cools N, Geissler EK, Gregori S, Marieke van Ham S, Hilkens C, Hutchinson JA, Lombardi G, Madrigal JA, Marek-Trzonkowska N, Martinez-Caceres EM, Roncarolo MG, Sanchez-Ramon S, Saudemont A, Sawitzki B, (2015). „Hurdles in therapy with regulatory T cells.” Sci Transl Med **7**(304): 304ps18.
- Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, Hellmann A, (2009). „First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human *ex vivo* expanded CD4+CD25+CD127 – T regulatory cells.” Clin Immunol **133**(1): 22–26.
- Trzonkowski P, Dukat-Mazurek A, Bieniaszewska M, Marek-Trzonkowska N, Dobyszuk A, Juścińska J, Dutka M, Myśliwska J, Hellmann A, (2013). „Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells.” BioDrugs **27**(6): 605–614.
- Trzonkowski P, Szaryńska M, Myśliwska J, Myśliwski A, (2009). „*Ex vivo* expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy.” Cytometry A **75**(3): 175–188.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ, (2008). „How regulatory T cells work.” Nat Rev Immunol **8**(7): 523–532.

- Wang YM, Zhang GY, Wang Y, Hu M, Wu H, Watson D, Hori S, Alexander IE, Harris DC, Alexander SI, (2006). „Foxp3–transduced polyclonal regulatory T cells protect against chronic renal injury from adriamycin.” *J Am Soc Nephrol* **17**(3): 697–706.
- Yi S, Ji M, Wu J, Ma X, Phillips P, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, (2012). „Adoptive transfer with *in vitro* expanded human regulatory T cells protects against porcine islet xenograft rejection via interleukin-10 in humanized mice.” *Diabetes* **61** (5): 1180–1191.
- Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, Xu J, Bromberg JS, Dong HH, (2006). „Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function.” *Diabetes* **55**(9): 2429–2436.
- Zhao K, Ruan S, Yin L, Zhao D, Chen C, Pan B, Zeng L, Li Z, Xu K, (2015). „Dynamic regulation of effector IFN- γ -producing and IL-17-producing T cell subsets in the development of acute graft-versus-host disease.” *Mol Med Rep* DOI: **10.3892/mmr.2015.4638** (w druku).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób namnażania *in vitro* subpopulacji limfocytów T CD4⁺ o właściwościach immunosupresyjnych i fenotypie CD4⁺FoxP3⁺ zwanych dalej limfocytami Treg **znamienny tym**, że:
– proces namnażania komórek Treg odbywa się przez cały czas trwania hodowli lub okresowo w temperaturze w zakresie od >29°C do <37°C.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że namnażanie limfocytów Treg odbywa się przez cały okres trwania hodowli lub okresowo w temperaturze 33°C.
3. Sposób według zastrz.1-2, **znamienny tym**, że pozwala na zastosowanie otrzymanych komórek Treg w terapii klinicznej niepożądanych reakcji immunologicznych.
4. Sposób według zastrz.1-3, **znamienny tym**, że komórki Treg stanowią komórki poliklonalne i/lub komórki antygenowo specyficzne.
5. Sposób według zastrz.3, **znamienny tym**, że przez niepożądane reakcje immunologiczne rozumie się: choroby autoimmunizacyjne, odrzucanie przeszczepu, reakcje alergiczne oraz chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi.

Rysunki

Fig. 1

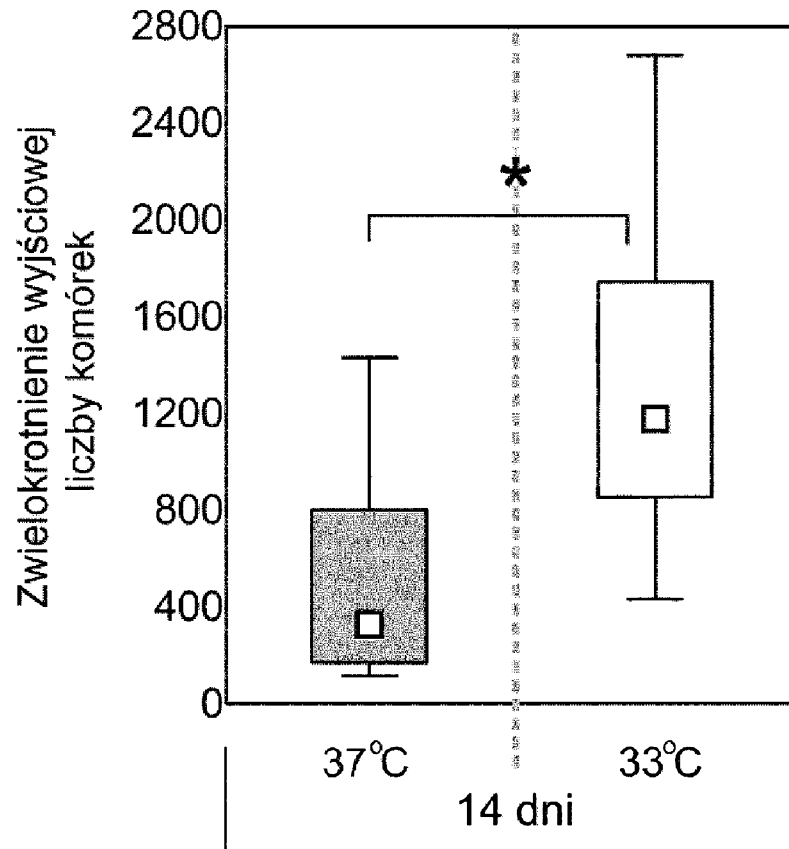


Fig. 2

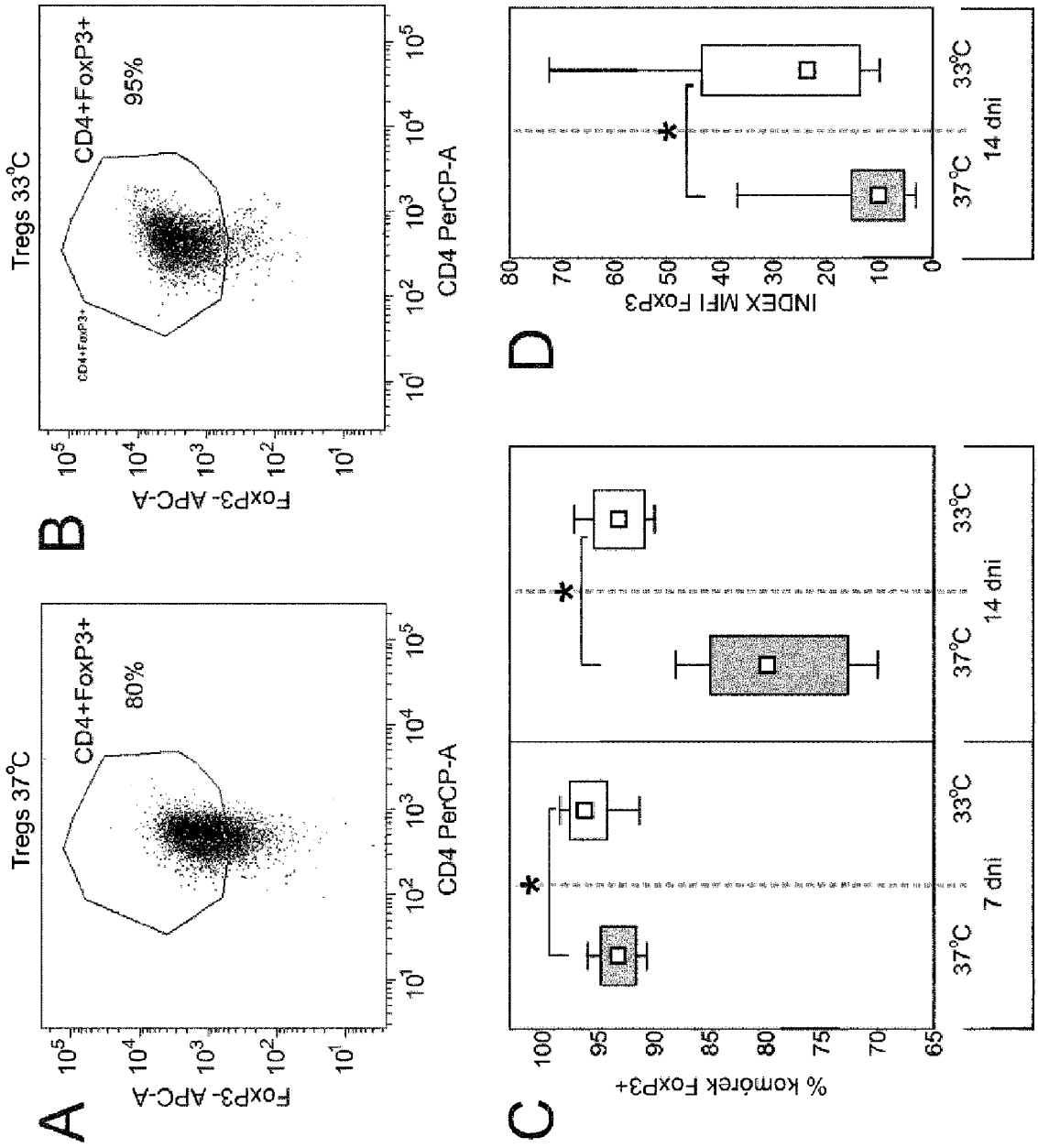


Fig. 3

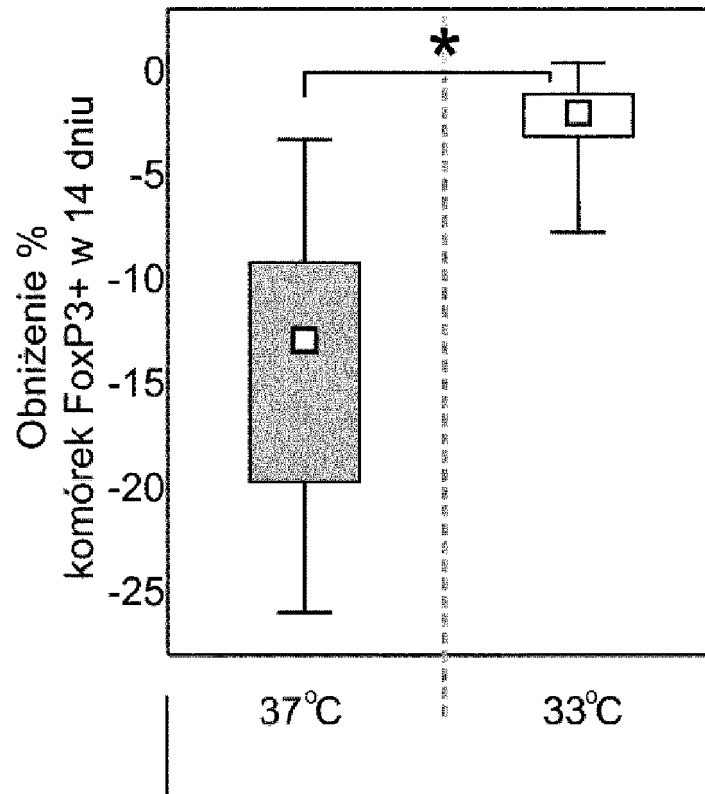


Fig.4

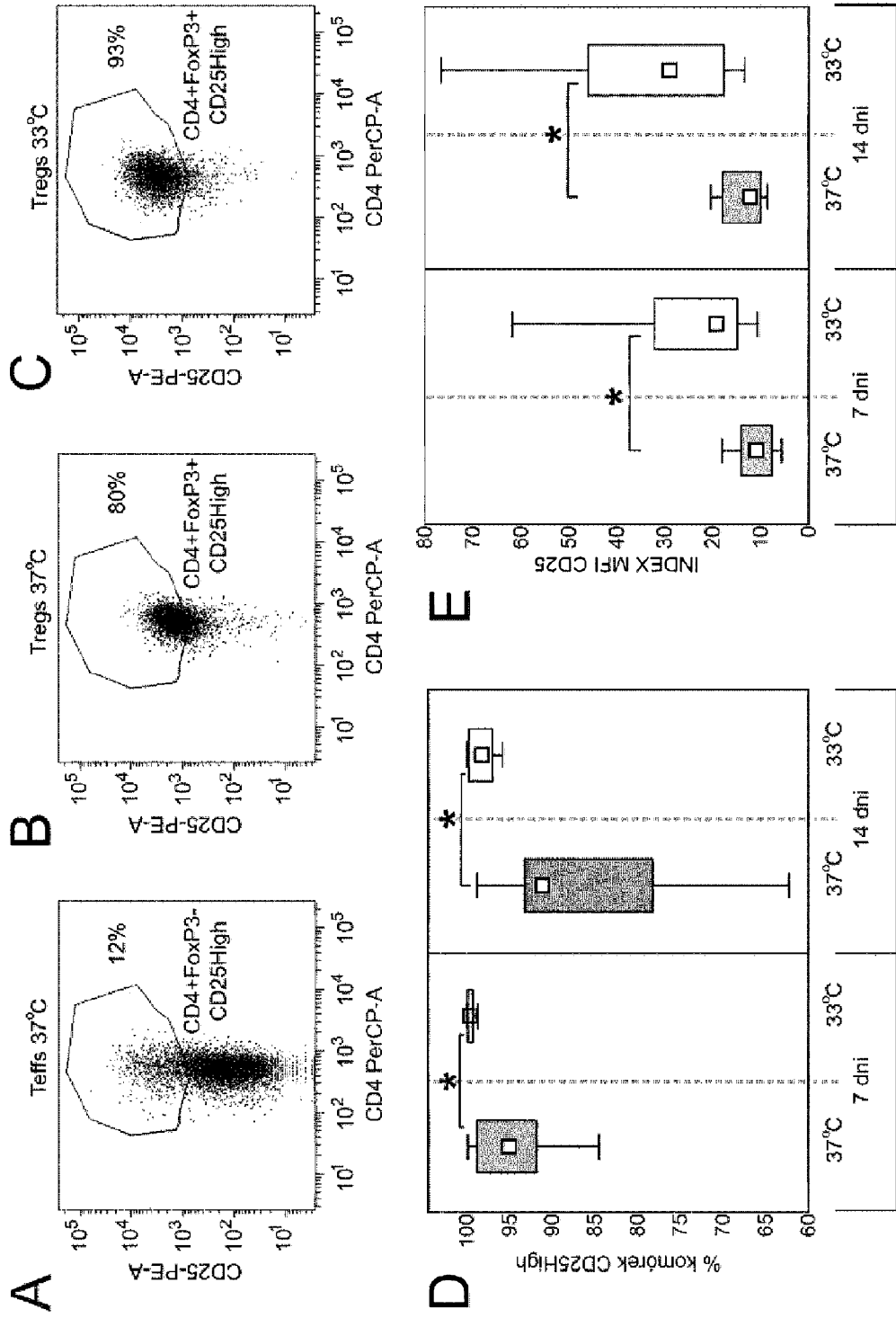


Fig.5

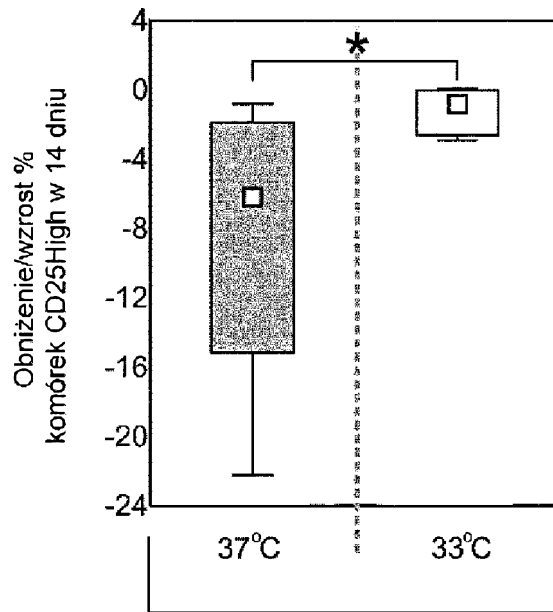


Fig.6

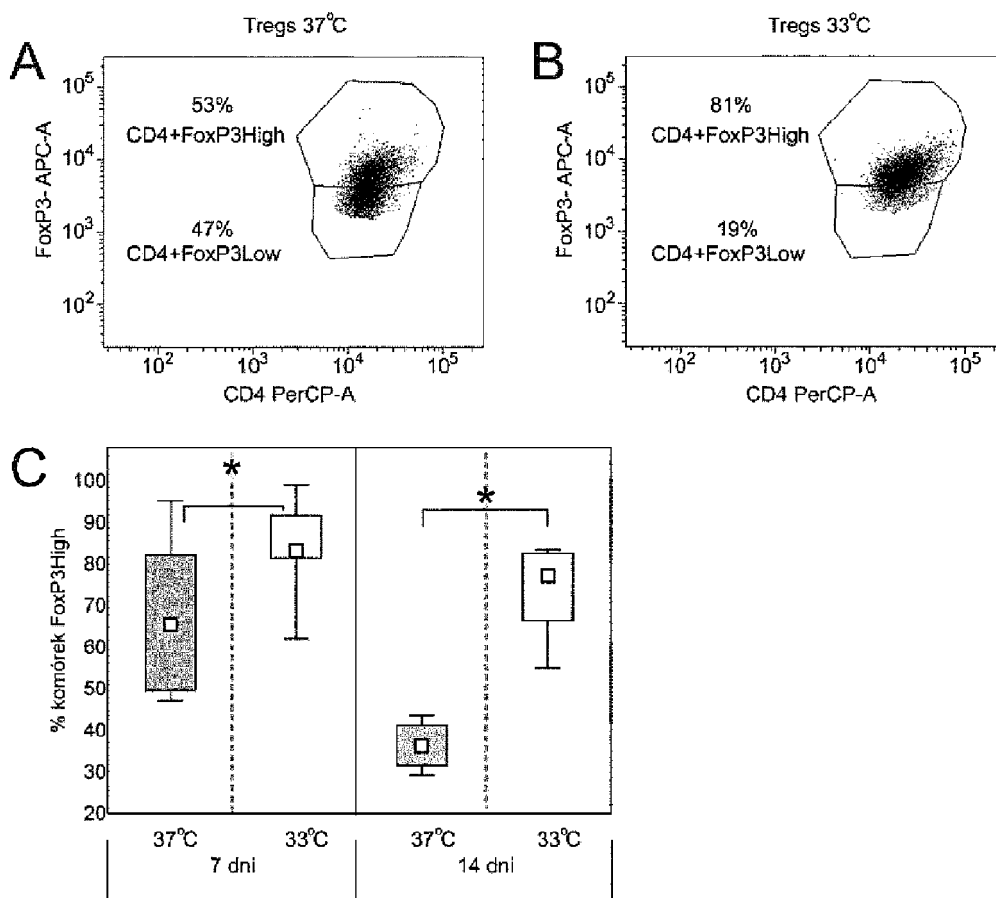


Fig.7

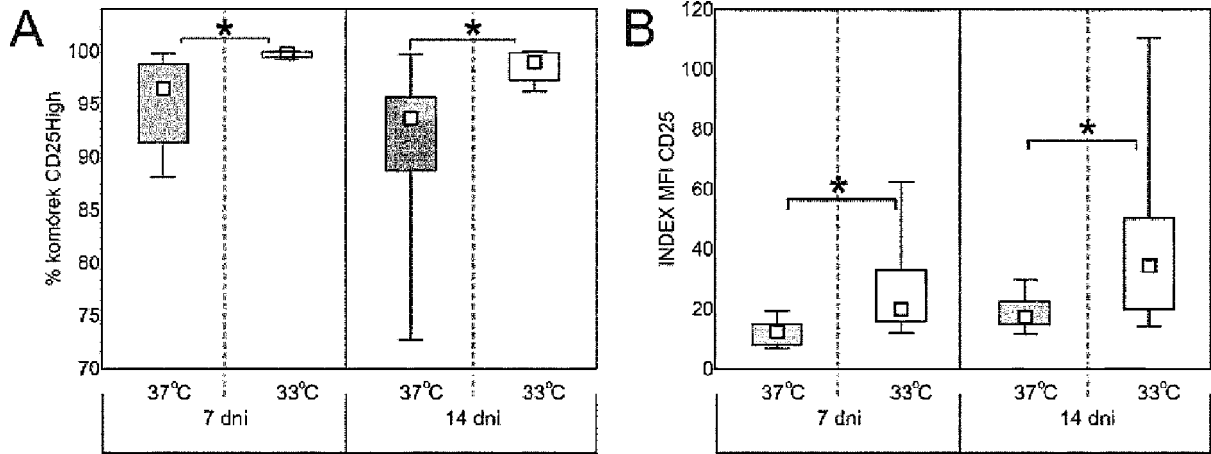


Fig.8

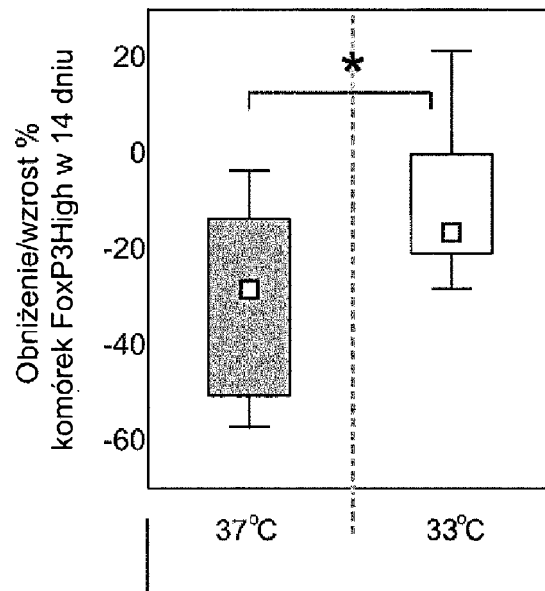


Fig. 9

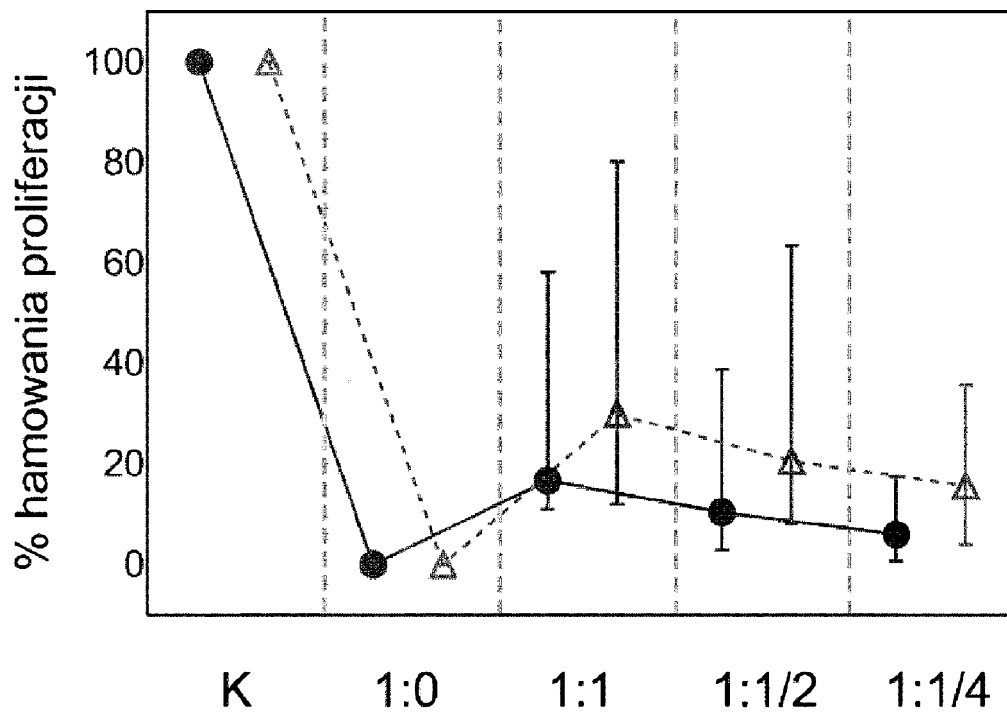


Fig. 10

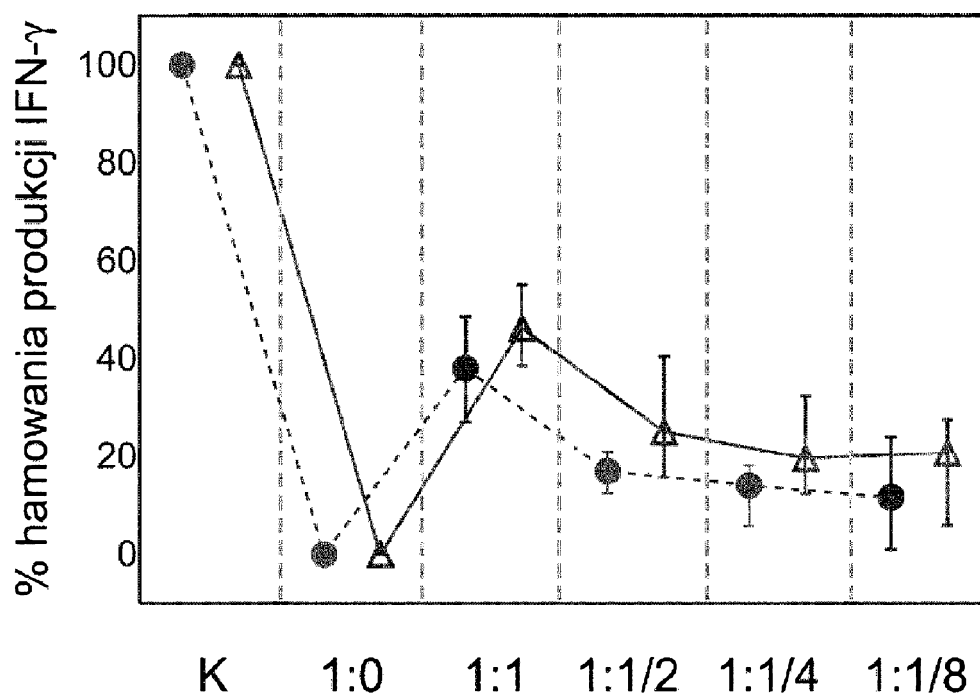


Fig. 11

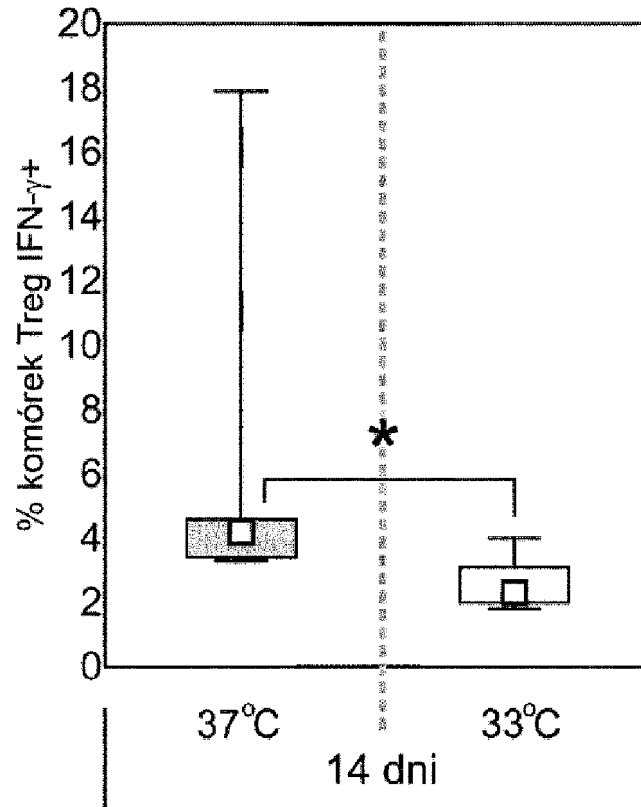


Fig. 12

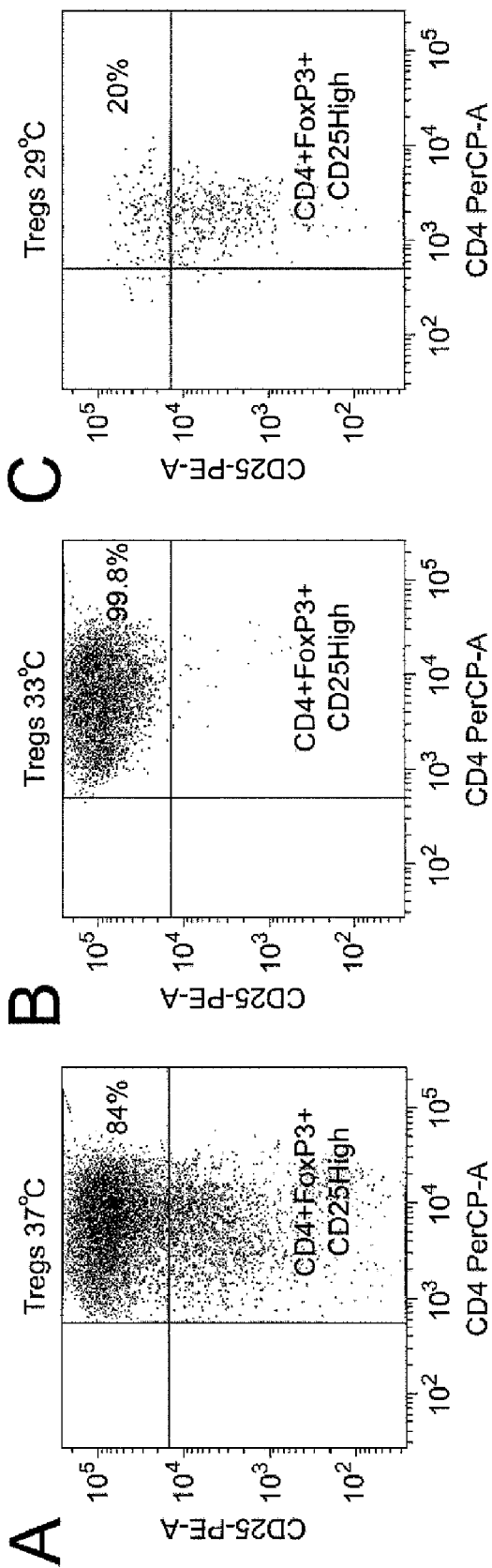


Fig. 13

