



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 909**

51 Int. Cl.:  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/867** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05748024 .6**  
96 Fecha de presentación : **03.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1750773**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Fármacos para la prevención o el tratamiento de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunitarias o para la inducción de tolerancia inmunitaria.**

30 Prioridad: **04.06.2004 US 576613 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.05.2009**

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**  
**3, rue Michel-Ange**  
**75794 Paris Cédex 16, FR**  
**Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) y**  
**Université Montpellier II**

72 Inventor/es: **Taylor, Naomi;**  
**Klatzmann, David;**  
**Mongellaz, Cédric;**  
**Adjali, Oumeya;**  
**Jacquet, Chantal;**  
**Steinberg, Marcos y**  
**Marodon, Gilles**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 320 909 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

Fármacos para la prevención o el tratamiento de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunitarias o para la inducción de tolerancia inmunitaria.

5

La invención se refiere a la utilización de vectores virales para la preparación de fármacos para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, o para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios y no propios.

10

El timo es un órgano bilobulado derivado de la diferenciación del endodermo y mesodermo embrionarios y está ubicado justo por encima del corazón (revisado en [1a]). Es el principal órgano para la maduración de células T. Este proceso implica la interacción entre timocitos en desarrollo y células del estroma tímico. Las células del estroma tímico que forman la arquitectura tímica se han clasificado según su localización anatómica. Abarcan una serie muy diversa de tipos celulares, incluyendo células epiteliales corticales y medulares, fibroblastos, macrófagos y células dendríticas (revisado en [2a]). Las células del estroma controlan la diferenciación de precursores hematopoyéticos derivados del hígado o la médula ósea en linfocitos T: la diferenciación de células T se define mediante la adquisición de marcadores de maduración tales como CD4, CD8 y el complejo receptor de células T (TCR), que condiciona la reactividad de timocitos inmaduros con células del estroma tímico. Las células progenitoras de timocitos tempranos que entran en el timo no expresan moléculas específicas para células T, tales como CD3, la cadena alfa o beta del TCR o las moléculas CD4 y CD8. Estas células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, denominadas células dobles negativas (DN), se convierten luego en CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, la denominada fase doble positiva (DP), y entonces adquieren progresivamente moléculas de TCR. La maduración final de células T implica la pérdida selectiva de o bien las moléculas CD4 o bien las CD8 para generar células simples positivas (SP) completamente maduras con función citotóxica/supresora o auxiliar/reguladora, respectivamente.

25

Durante este proceso, la selección negativa y positiva mediada por el TCR de células T garantiza la selección de un repertorio de TCR diverso que puede reaccionar con péptidos extraños presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), pero tolerante frente a autoantígenos. Esta propiedad hace del timo un sitio atractivo para la manipulación de la tolerancia de células T. Hasta la fecha, los resultados sobre la inducción de tolerancia por medio de manipulación directa del timo han sido escasos (revisado en [3a]). Sin embargo, estudios previos que utilizaban inyección intratímica (IT) de células de islotes pancreáticos [4a], antígenos solubles [5a] o vectores adenovirales [6a, 7a] han mostrado que la inducción de tolerancia frente a antígenos extraños en animales no inmunosuprimidos es viable. Dado que la producción y maduración de timocitos puede ser un proceso que dura toda la vida, una desventaja principal de la utilización de adenovirus o antígenos solubles es su expresión a corto plazo en el timo [8a]. De hecho, la modulación del proceso de selección debe detenerse tras la desaparición del antígeno, lo que podría ser un problema para la inducción de tolerancia a largo plazo.

30

Debido a su capacidad para infectar células en reposo y para integrarse de manera estable en el genoma, los vectores lentivirales representan herramientas nuevas y poderosas para la expresión a largo plazo de un transgén dado *in vivo* [9a]. Se han utilizado satisfactoriamente *in vivo* vectores lentivirales para infectar hepatocitos y células musculares [10a], células presentadoras de antígeno [11a, 12a], así como células del sistema nervioso central [13a].

45

Los inventores postulan que los vectores lentivirales podrían ser más apropiados que los vectores adenovirales para la expresión IT a largo plazo de un gen extraño. Por tanto, investigaron el patrón de infección de un vector lentiviral ubicuo tras la inyección IT.

50

Se inyectó a ratones adultos jóvenes en el timo vectores lentivirales que expresaban eGFP o la hemaglutinina del virus Influenza bajo el control del promotor de la fosfoglicerato cinasa ubicuo. Se examinaron los timos de 5 a 90 días después directamente bajo un microscopio de luz UV y mediante citometría de flujo. La inyección intratímica de vectores lentivirales da como resultado predominantemente la infección de células del estroma que podría detectarse durante al menos 3 meses. De manera importante, la expresión de hemaglutinina por células del estroma tímico mediaba la selección negativa de timocitos que expresaban el receptor de células T relacionado. Además, y a pesar de la baja multiplicidad de infección, también se detectaron timocitos transducidos, incluso 30 días tras la inyección.

55

Por tanto, la presente invención se basa en la demostración realizada por los inventores de que células del estroma tímico se infectan de manera masiva y persistente, y que los timocitos en desarrollo muestran también un nivel de infección significativo. Además, los inventores muestran que la inyección IT de un vector lentiviral que codifica para el antígeno relacionado en ratones transgénicos (Tg) para TCR conduce a la selección negativa de timocitos en desarrollo.

60

Estos resultados demuestran que la administración intratímica de un vector lentiviral es un medio eficaz para obtener la expresión estable de un gen extraño en el timo.

65

Por tanto, el objetivo principal de la presente invención es proporcionar nuevas herramientas para la inducción de tolerancia frente a un antígeno específico y para la terapia génica de inmunodeficiencias combinadas graves, utilizando inserción génica mediante administración intratímica.

## ES 2 320 909 T3

La invención se refiere a la utilización tal como se definió anteriormente de vectores lentivirales que corresponden a secuencias derivadas del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1.

Los vectores lentivirales que pueden utilizarse en la presente invención son o se derivan de vectores lentivirales ya conocidos, por ejemplo en el artículo de revisión de C. Delenda, en *The Journal of Gene Medicine*, 2004; 6: S125-S138.

La invención se refiere más particularmente a la utilización tal como se definió anteriormente de vectores lentivirales que comprenden la región U3 del virus del sarcoma de Rous, la región R-U5 de la repetición terminal larga en 3' (LTR), una parte de gag, un tramo de polipurina central, la región R-U5 de la LTR en 5' del VIH de tipo 1, pero que no comprende la región U3 de la LTR en 3', la mitad de gag, pol, nef, vpr, vpu, env, la región U3 de la LTR en 5' de dicho VIH de tipo 1.

La invención se refiere asimismo a la utilización tal como se definió anteriormente de vectores lentivirales que contienen una secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios o no propios, o para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, estando dicha secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada bajo el control de elementos que dirigen su expresión en células eucariotas.

La invención se refiere más particularmente a la utilización tal como se definió anteriormente de vectores lentivirales en los que la secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada se inserta entre el tramo de polipurina central y la LTR en 3'.

La invención se refiere asimismo a la utilización de lentivirus tal como se definieron anteriormente para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de células del estroma tímico para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios o no propios, y para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

En este sentido, la invención se refiere más particularmente a la utilización de vectores virales tal como se definieron anteriormente para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de células del estroma tímico para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus, colitis, enfermedades musculares inflamatorias, enfermedades oculares inflamatorias o diabetes tipo 1.

La invención se refiere más particularmente a la utilización de vectores virales tal como se definieron anteriormente para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de células del estroma tímico, conteniendo dichos vectores virales secuencias de nucleótidos recombinantes predeterminadas seleccionadas de entre:

- secuencias que codifican para autoantígenos de la mielina, en el marco de la prevención o el tratamiento de la miastenia grave,
- secuencias que codifican para receptores de la acetilcolina, en el marco de la prevención o el tratamiento de la esclerosis múltiple,
- o secuencias que codifican para la insulina, en el marco de la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1.

La invención se refiere asimismo más particularmente a la utilización tal como se definió anteriormente del vector lentiviral ubicuo que contiene una secuencia que codifica para la insulina de mamífero tal como el vector pRRL.sin.cppt.PGK.Ins2.GTX.eGFP.pre correspondiente a la siguiente secuencia SEC ID n°: 1.

La invención se refiere asimismo más particularmente a la utilización de vectores virales tal como se definieron anteriormente para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de células del estroma tímico para la prevención o el tratamiento de rechazo de injertos, tal como un órgano sólido, rechazo de trasplantes alogénicos de células o tejidos, rechazo de trasplantes de células madre hematopoyéticas o rechazo de productos terapéuticos transgénicos o corregidos genéticamente.

En este sentido, la invención se refiere más particularmente a la utilización de vectores virales tal como se definieron anteriormente para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de células del estroma tímico, conteniendo dichos vectores virales secuencias de nucleótidos recombinantes predeterminadas seleccionadas de secuencias que codifican para un aloantígeno, tales como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad humano como el antígeno leucocitario A2, factor VIII humano, factor IX humano, distrofina y eritropoyetina, en el marco de la prevención o el tratamiento de rechazos mencionados anteriormente.

La invención se refiere asimismo más particularmente a la utilización tal como se definió anteriormente del vector lentiviral específico para células T que contiene una secuencia que codifica para ZAP-70 de mamífero tal como el vector pRRL.sin.cppt.CD4pME.hZAP-70.IRES.eGFP.pre correspondiente a la siguiente secuencia SEC ID n°: 2.

## ES 2 320 909 T3

La invención se refiere más particularmente a la utilización de vectores virales tal como se definieron anteriormente para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de linfocitos intratímicos, siendo dichos vectores virales vectores lentivirales específicos para células T, es decir, vectores lentivirales que presentan la propiedad de expresar un transgén terapéutico específicamente en linfocitos T.

En este sentido, la invención se refiere más particularmente a la utilización tal como se mencionó anteriormente de vectores lentivirales específicos para células T correspondientes a vectores lentivirales tales como se definieron anteriormente, en los que se integra una secuencia de ADN específica para células T responsable de la especificidad con respecto a las células T de los vectores lentivirales, eligiéndose ventajosamente dicha secuencia de ADN específica para células T entre secuencias del gen CD4 humano o murino, tal como a partir de las secuencias reguladoras del gen CD4 correspondientes a:

- el promotor CD4 proximal mínimo y el potenciador murino, y que presenta la siguiente secuencia:

SEC ID n°: 3: CD4pmE (promotor CD4 mínimo y potenciador murino);

- o el promotor CD4 proximal mínimo, el potenciador murino y el silenciador humano.

La invención se refiere más particularmente a la utilización de vectores lentivirales específicos para células T tal como se definieron anteriormente, en los que la secuencia de ADN específica para células T se inserta entre el tramo de polipurina central y la LTR en 3'.

La invención se refiere más particularmente a la utilización de vectores lentivirales específicos para células T tal como se definieron anteriormente, tales como:

- pRRL.sin.PPT.CD4pmE.eGFP.pre privado de la secuencia que codifica para eGFP, correspondiente a la siguiente secuencia SEC ID n°: 4.

- pRRL.sin.PPT.CD4pmE.Sil.eGFP.pre privado de la secuencia que codifica para eGFP, correspondiente a la siguiente secuencia SEC ID n°: 5.

La invención se refiere asimismo a la utilización de vectores virales tal como se definieron anteriormente para la fabricación de una composición farmacéutica adecuada para una administración intratímica mediante inyección, y en la que la dosificación de dichos vectores está comprendida entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas infecciosas por mililitro.

La invención se refiere asimismo a los vectores lentivirales tal como se definieron anteriormente, transformados con una secuencia predeterminada útil para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios o no propios, y para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

La invención se refiere a las células del estroma tímico transformadas caracterizadas porque contienen vectores lentivirales que contienen una secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios o no propios, o para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, integrados de manera estable en su genoma y seleccionados de entre los siguientes:

- vectores lentivirales específicos para células T que contienen una secuencia que codifica para ZAP-70 de mamífero tales como pRRL.sin.cppt.CD4pmE.hZAP-70.IRES.eGFP.pre (SEC ID n°: 2)

- vectores lentivirales ubicuos que contienen una secuencia que codifica para HA viral tales como pRRL.sin.cppt.PGK.HA.pre correspondiente a la siguiente secuencia representada por SEC ID n°: 6.

- vectores lentivirales ubicuos que contienen una secuencia que codifica para la insulina de mamífero tales como pRRL.sin.cppt.PGK.Ins2.GTX.eGFP.pre (SEC ID n°: 1).

La invención se refiere asimismo a las células transformadas del linaje de células T, caracterizadas porque contienen vectores virales que contienen una secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios o no propios, o para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como vectores lentivirales tal como se definieron anteriormente, integrados de manera estable en su genoma.

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden vectores lentivirales tal como se definieron anteriormente, o células transformadas tal como se mencionó anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéutico adecuado.

La invención se refiere más particularmente a composiciones farmacéuticas tal como se definieron anteriormente, adecuadas para una administración intratímica mediante inyección.

La invención se refiere más particularmente a las composiciones farmacéuticas tal como se definieron anteriormente, en las que la dosificación de dichos vectores lentivirales está comprendida entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas infecciosas por mililitro.

5 La invención describe asimismo unos procedimientos de terapia génica que comprenden la administración, por vía intratímica, de vectores virales tal como se definieron anteriormente que contienen una secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada bajo el control de elementos que dirigen su expresión en células eucariotas, a un paciente que necesita de los mismos para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios o no propios, o para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tal como se mencionó anteriormente.

15 La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de transformación de células del estroma tímico, o de linfocitos intratímicos o precursores de linfocitos, con vectores de la invención tal como se describió anteriormente.

#### I) Corrección *in vivo* de la inmunodeficiencia de ZAP-70 mediante transferencia génica intratímica (fuera de la invención)

##### 20 1) Resumen

Se han tratado satisfactoriamente pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) mediante la administración de células madre corregidas genéticamente *ex vivo*. Sin embargo, a pesar de su eficacia probada, un tratamiento de este tipo conlleva dificultades y riesgos específicos. Los inventores supusieron que algunas de estas desventajas pueden superarse mediante corrección génica *in situ* de células progenitoras de linfocitos T en el timo. De hecho, la transferencia intratímica *in vivo* de un gen que proporciona una ventaja selectiva para protimocitos transducidos debe dar como resultado la generación de progenie de linfocitos T funcionales que permite una reconstitución inmunitaria a largo plazo. Los inventores evaluaron la viabilidad de este enfoque en el modelo murino de SCID deficiente en ZAP-70. Se inyectó un vector lentiviral que expresaba ZAP-70 específico para células T en los timos de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> adultos, sin acondicionamiento previo. Esto dio como resultado la diferenciación a largo plazo de timocitos TCR $\alpha\beta$  maduros, indicando que el vector se había integrado en las células progenitoras. Además, células T que expresaban ZAP-70 periféricas mostraron un repertorio de receptores parcialmente diversificado y eran sensibles a aloantígenos *in vitro* e *in vivo*. Se logró una mejora de la eficacia del tratamiento en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> lactantes en los que el timo es mayor y un porcentaje superior de protimocitos están en ciclo. Por tanto, la inyección intratímica de un vector lentiviral representa una alternativa simplificada y potencialmente más segura para el trasplante de células madre hematopoyéticas modificadas genéticamente *ex vivo* para la terapia génica de inmunodeficiencias de células T.

Las abreviaturas utilizadas a continuación en la presente memoria son las siguientes: adenosina desaminasa, ADA; trasplante de médula ósea, BMT; antígeno leucocitario humano, HLA; célula madre hematopoyética, HSC; intratímico, IT; virus de la leucemia murina, VLM; inmunodeficiencia combinada grave, SCID; unidades de transducción, TU; tipo natural, WT.

##### 45 2) Introducción

La inmunodeficiencia combinada grave (SCID) es un grupo heterogéneo de trastornos genéticos que es casi universalmente mortal en la infancia, debido al advenimiento de infecciones oportunistas. La SCID puede tratarse mediante trasplante de células madre alogénicas, pero la mayoría de los pacientes no presentan donantes histocompatibles. En ausencia de donantes histocompatibles, los pacientes con SCID reciben algunas veces un trasplante de HSC a partir de donantes haploidénticos para HLA. Aunque recientes modificaciones de este protocolo han aumentado la supervivencia hasta niveles que se aproximan al 75%, hay complicaciones a corto plazo y a largo plazo significativas y la aparición de un número significativo de células T vírgenes circulantes requiere a menudo más de 150 días (1-3). Alternativamente, la SCID representa un entorno favorable único para estrategias de terapia génica ya que los linfocitos corregidos genéticamente deben presentar una ventaja selectiva. De hecho, un enfoque de este tipo ha demostrado ya ser beneficioso en varios pacientes con SCID deficientes en  $\alpha\text{c}$  y deficientes en ADA (4-7). La extensa capacidad de las células progenitoras T para experimentar expansión masiva se traduce en la posibilidad de que sólo algunas células progenitoras corregidas pueden reconstituir el compartimento de células T, tal como se destaca mediante “experimentos de naturaleza”. Específicamente, se ha encontrado que varios individuos con mutaciones heredadas que se sabe que dan como resultado SCID (deficiencia en ADA y X-SCID) están relativamente sanos, con un número de células T relativamente normal (8-11). En cada uno de estos pacientes, esto se debía probablemente a una mutación por inversión en una única célula madre/progenitora hematopoyética dado que un acontecimiento de este tipo es estadísticamente improbable (8-10). Estos “experimentos de terapia génica naturales” sugieren fuertemente que la corrección génica de una única célula progenitora, si puede proliferar, diferenciarse y migrar, puede eliminar potencialmente los síntomas críticos asociados con la SCID.

Basándose en estas premisas, los ensayos clínicos de terapia génica para trastornos de SCID se han basado por tanto hasta el momento en transferencia génica *ex vivo* en células madre hematopoyéticas (HSC)/progenitoras (CD34+) utilizando vectores retrovirales no específicos. A pesar de su eficacia probada (4, 6, 7, 12, 13), un enfoque de este tipo

conlleva dificultades y riesgos específicos (14). En primer lugar, ya que la transferencia génica con vectores retrovirales basados en el virus de la leucemia murina (VLM) no puede producirse en ausencia de mitosis, este enfoque requiere el cultivo *ex vivo* de células CD34+ en presencia de un cóctel de citocinas. Esto es una manipulación engorrosa que puede afectar a la funcionalidad a largo plazo de estas células. En segundo lugar, la expresión ectópica del gen terapéutico en toda la progenie de células madre podría generar efectos secundarios graves, de manera notable cuando el transgén participa en rutas de transducción de señales. Finalmente, la inserción oncorretroviral *per se*, modificando la expresión de genes celulares, puede participar en la leucemogénesis (14, 15).

Los inventores supusieron que algunas de estas desventajas podrían superarse mediante corrección génica *in situ* de células progenitoras linfoides T en el timo utilizando vectores lentivirales específicos para células T. Esta hipótesis estaba apoyada por las siguientes observaciones: (i) los vectores lentivirales han dado como resultado una transferencia génica *in vivo* eficaz en hepatocitos, células presentadoras de antígeno, células musculares, así como células del sistema nervioso central (16-21); (ii) las células progenitoras linfoides T tempranas (ETP) en el timo parecen sostener la producción de la progenie del linaje T durante periodos de tiempo más largos que las células progenitoras linfoides comunes (CLP) encontradas en la BM (23). Por tanto, los inventores razonaron que la inyección IT de un vector lentiviral específico para células T que codificaba para un gen que proporciona una ventaja selectiva para pro-timocitos transducidos podría dar como resultado la generación de progenie de linfocitos T funcionales con posterior reconstitución inmunitaria a largo plazo.

La viabilidad de este enfoque se evaluó en un modelo murino de deficiencia en ZAP-70. ZAP-70 es una proteína tirosina cinasa (PTK) de 70 Kd que se recluta en el receptor de células T (TCR) tras su estimulación (24). Se expresa a niveles aproximadamente equivalentes en timocitos, células T maduras y células NK (25). Su ausencia da como resultado un fenotipo de SCID con un bloqueo en el desarrollo de células T, en la fase de timocitos CD4+CD8+ (26-28). Para obviar los posibles obstáculos/riesgos referentes a la expresión ubicua de ZAP-70, se introdujo el gen wt en un vector lentiviral específico para células T (29). En la presente memoria, los inventores demuestran que la inyección intratímica directa de este vector lentiviral que expresa ZAP-70 da como resultado la reconstitución de células T policlonales y funcionales.

### 3) Resultados

#### a) Desarrollo de timocitos en ratones a los que se les inyectó por vía intratímica un vector lentiviral que expresa ZAP-70

En un intento de reconstituir células del linaje T a través de transferencia génica *in situ*, los inventores inyectaron un vector lentiviral específico para células T que codifica para ZAP-70 humano (pT-ZAP) directamente en los timos de ratones deficientes en ZAP-70 de 8-12 semanas de edad. En pT-ZAP, el casete ZAP-70/IRES/eGFP está bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras específicas para células T derivadas del gen CD4 (figura 1). En el contexto de este vector lentiviral, la expresión de ZAP-70 y eGFP concuerdan (figura 1 en línea). Tras cirugía torácica, los inventores inyectaron por vía intratímica (IT) 10-20  $\mu$ l de preparaciones de vector que contenían 2-4 X 10<sup>7</sup> unidades de transducción (UT) de pT-ZAP. Es notable que esto se traduce en una multiplicidad de infección global muy baja (MOI <0,1), tal como se determina mediante la razón de partículas infecciosas con respecto al número global total de timocitos y células del estroma en el timo. Además, puesto que los inventores mostraron más adelante en la presente memoria que las inyecciones IT conducen a una infección preferente de las células del estroma tímico, la MOI para los timocitos es incluso menor.

La ausencia de ZAP-70 está asociada con un bloqueo relativamente tardío en la diferenciación de células T, en la fase de timocitos CD4+CD8+ DP (26-28) (figura 2a). Tal como se esperaba a partir de la MOI muy baja utilizada, el porcentaje real de timocitos transducidos fue extremadamente bajo (0,3%, figura 2b) y por tanto, no se esperaba que las inyecciones IT de pT-ZAP alterasen drásticamente el porcentaje global de timocitos SP en comparación con los animales deficientes (figura 2a). Sin embargo, aunque la regulación por incremento de TCR $\beta$  está bloqueada en ratones deficientes en ZAP-70, los ratones a los que se les inyectó por vía IT demostraron un aumento significativo de los timocitos TCR $\beta$  CD4 SP. Además, el análisis de las células eGFP+ TCR $\beta$  mostró que los porcentajes de timocitos simple positivo CD4 y CD8 maduros eran similares a los detectados en ratones de tipo natural, representando más del 80% de las células (figura 2b). En marcado contraste, el fenotipo de los timocitos dentro de la población eGFP- TCR $\beta$  de ratones a los que se les inyectó pT-ZAP, eran células DP en su mayor parte inmaduras (71%, figura 2b). Estos resultados indican que la expresión de ZAP-70 dirigida por pT-ZAP puede corregir el bloqueo de diferenciación en la deficiencia en ZAP-70.

Como los timocitos en diferenciación presentan una duración de vida limitada, es decir, las células DN pueden diferenciarse y migrar a través de la corteza en 15 días (30), la detección de los timocitos transducidos a las 7-52 semanas tras la transferencia génica sugiere fuertemente que el vector lentiviral ZAP-70 se integró satisfactoriamente en las células progenitoras (figura 2b). De manera notable, esta modulación en la diferenciación de los timocitos no se debía a un efecto no específico de los viriones inyectados ya que: i) no se detectaron timocitos maduros 14 semanas tras la inyección de un vector lentiviral de eGFP control (figura 2 en línea) y ii) ni la inyección de eGFP ni vectores lentivirales ZAP-70, a la dosis utilizada en este caso, modularon la diferenciación de los timocitos inmediatamente (72 horas) tras la inyección IT (figura 3 en línea).

b) *Desarrollo de células T en ratones a los que se les inyectó por vía intratímica un vector lentiviral que expresa ZAP-70*

Para determinar si la transferencia génica *in vivo* en el timo da como resultado la aparición de células T maduras en la periferia, se analizaron muestras de sangre periférica para determinar la presencia de linfocitos CD3+, empezando a las 4 semanas tras la inyección tímica (figura 3a). Los inventores pudieron detectar de hecho tales células en 6/26 ratones adultos tratados. El porcentaje de linfocitos CD3+ de sangre periférica a las 4 semanas alcanzó el 4-5%, similar al que los inventores observaron previamente tras el trasplante de células progenitoras de tipo natural o células progenitoras ZAP-70<sup>-/-</sup> transducidas con un vector retroviral que expresa ZAP-70 (31). De manera notable, en ratones reconstituidos, el porcentaje de linfocitos CD3+ de sangre periférica aumentó con el tiempo, con un 15% de linfocitos T CD4+ o CD8+ en la sangre periférica a las 6 semanas (figura 3a). No obstante, estos niveles son significativamente menores que los detectados en ratones WT. Tal como se muestra en la figura 3b, la inmensa mayoría de las células dentro del compartimento eGFP+ eran del fenotipo de células T CD4+ o CD8+. El incremento en el número de células T continuó en los ratones a los que se les inyectó por vía intratímica mayores porcentajes de linfocitos T detectados en los ganglios linfáticos y el bazo a las 8 semanas tras la inyección IT (figura 4a). En conjunto, estos datos demuestran que una corrección en la expresión de ZAP-70 mediante transferencia génica IT da como resultado la presencia de células T maduras en la periferia.

Se determinó el estado de activación de estos linfocitos T evaluando la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69. Las células T de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> a los que se les inyectó por vía intratímica pT-ZAP expresaron el marcador de activación CD25 a una proporción significativamente superior de células que la observada en ratones WT (44±11,7% (n=5) frente a 22±4,6% (n=5), p=0,001; figura 4b). La expresión del marcador de activación CD69 también se elevó en células T transducidas con ZAP-70 en comparación con células T en ratones WT, indicativo de la activación de las células T. Aunque se observaron tanto poblaciones de células T vírgenes como con “fenotipo de memoria” (32) en los ratones reconstituidos, el porcentaje de células T vírgenes (CD62L<sup>+</sup>) fue menor en los ratones a los que se les inyectó por vía intratímica pT-ZAP (figura 4b). De hecho, el porcentaje global de células T periféricas detectadas en ratones a los que se les inyectó pT-ZAP fue siempre menor que el observado en animales WT (tabla 1). Las células T de ganglio linfático CD3+ en los ratones a los que se les inyectó pT-ZAP alcanzaron el 26% mientras que las de los ratones WT promediaron aproximadamente el 60% (tabla 1). Digno de mención, el nivel de expresión de eGFP en las células T CD3+ varió ampliamente, desde el 14-66%. Como los niveles de células T en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> generalmente no superan el 4%, es extremadamente probable que la inmensa mayoría de células T detectadas en los ratones a los que se les inyectó pT-ZAP se diferenciaron debido a la presencia del transgén ZAP-70. Por tanto, la incapacidad para detectar eGFP en todas las células T se debe o bien a alguna discordancia entre la expresión de eGFP y ZAP-70 *in vivo* en el contexto del IRES corriente arriba (figura 1, tabla 1) o a bajos niveles regulados por disminución de eGFP no detectados mediante FACS.

c) *Expresión de ZAP-70 y diversidad de células T que se desarrollan en ratones a los que se les inyectó por vía intratímica un vector lentiviral que expresa ZAP-70*

Los inventores evaluaron a continuación el nivel de ZAP-70 expresado en linfocitos T periféricos, así como la diversidad de su repertorio de TCR (figura 5). Los niveles de ZAP-70 codificado por el lentivirus fueron similares a los de la proteína endógena en los ratones WT. La expresión ectópica del transgén ZAP-70 se estudió adicionalmente separando las células CD3+ y las células CD3 procedentes de ratones de tipo natural y ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> reconstituidos mediante inyección intratímica de pT-ZAP. De manera importante, la expresión ectópica de ZAP-70 se detectó casi exclusivamente en el compartimento de células T CD3+ tras su expresión a partir del vector lentiviral pT-ZAP (figura 5a). Por tanto, el promotor de CD4 parece dirigir la expresión de ZAP-70 en células T hasta niveles similares a los del promotor endógeno.

Los inventores investigaron a continuación la utilización relativa de cada región hipervariable de cadena 0 del receptor de células T (TCRBV) dentro de la población global de células T mediante citometría de flujo y el procedimiento con Immunoscope/Spectratype (33, 34). Utilizando una combinación de estos dos procedimientos, los inventores establecieron tanto las frecuencias de células que expresan BV como su diversidad de repertorio. El procedimiento con Immunoscope se basa en una RT-PCR de la región determinante de complementariedad hipervariable 3 (CDR3), que permite que se analicen las longitudes del ARNm que codifica para cada cadena  $\beta$  del TCR. En un entorno normal, cada pico individual se compone de múltiples secuencias reorganizadas de diferente manera. Por tanto, una distribución gaussiana de las longitudes de CDR3 es indicativa de una población de células T extremadamente diversa y no polarizada.

Los perfiles de longitud de CDR3 de células T procedentes de los ratones reconstituidos por vía IT con ZAP-70 presentaban una distribución gaussiana para un promedio del 26% de las 14 familias de BV analizadas (con un intervalo del 0 al 75%), apareciendo las restantes familias de BV como mono u oligoclonales. Esto es a diferencia de los ratones WT, en los que se encontró una distribución gaussiana para todas las familias de TCRBV analizadas (figura 5b). Los análisis mediante citometría de flujo de la expresión de TCRBV en 6 ratones reconstituidos también mostró un repertorio diverso aunque no normal tanto en las poblaciones de células T CD4 como CD8, variando la representación de BV para cada ratón reconstituido por vía IT con ZAP-70. Los inventores encontraron que en promedio, el 60% de las 11 familias de BV analizadas se detectaron mediante citometría de flujo (con un intervalo del 30 al 100%) y el 77% mediante el procedimiento con Immunoscope (con un intervalo del 50 al 100%). Esta diferencia se debe

probablemente a la mayor sensibilidad del procedimiento con Immunoscope en comparación con la citometría de flujo. Por tanto, los resultados muestran que el repertorio de células T de los ratones a los que se les inyectó pT-ZAP era bastante diverso en cuanto a la utilización de BV, pero se alteró con respecto tanto a las frecuencias como a la clonalidad.

5

d) *Función de células T que se desarrollan en ratones a los que se les inyectó por vía intratímica un vector lentiviral que expresa ZAP-70*

10 Se evaluó la funcionalidad de los linfocitos T que se desarrollaron en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> a los que se les inyectó por vía IT de varias maneras, incluyendo por su capacidad para responder a la estimulación del receptor de células T *ex vivo* (figura 6a). De manera notable, ZAP-70 desempeña un papel crítico en la activación de linfocitos T maduros. En ausencia de la proteína WT, son defectuosas las respuestas biológicas tempranas así como las tardías, tales como la proliferación (35). En ausencia de estimulación, no proliferaron significativamente ni células T transducidas con pT-ZAP ni WT, mostrando que la expresión ectópica de ZAP-70 no modulaba el estado proliferativo basal de las células T corregidas. Tras una estimulación de 3 días con o bien concanavalina A o bien  $\alpha$ -CD3/IL-2, un porcentaje significativo tanto de células T transducidas con pT-ZAP como WT habían experimentado hasta 4 divisiones. Por el contrario, no se indujo división en esplenocitos aislados de ratones deficientes en ZAP-70 control. Por tanto, las células T transducidas con pT-ZAP, como las células T WT, pueden responder a un estímulo específico para TCR.

20

Para evaluar si estas células T transducidas con pT-ZAP podían responder a una estimulación inmunitaria *in vivo*, se injertaron ratones con injertos de piel tanto singénicos (C57BL/6) como alogénicos totalmente no coincidentes (BALB/c) en los dos lados del lomo. Los ratones control incluían ratones deficientes en ZAP-70 no tratados (n=3) y ratones C57BL/6 de tipo natural (n=2), trasplantados con los mismos injertos de piel. Tal como se esperaba, los ratones deficientes en ZAP-70 no tratados, que no desarrollan células T, no rechazaron ni los injertos singénicos ni los alogénicos. En los ratones C57BL/6 control, el rechazo de aloinjerto fue agudo, apareciendo signos de necrosis desde el día 12 en adelante mientras que se mantuvieron los injertos singénicos. En los ratones a los que se les inyectó pT-ZAP, se observaron signos de rechazo en dos de los tres ratones entre los días 21 y 30. De manera importante, los dos ratones que presentaron eritema y engrosamiento del injerto alogénico presentaron mayores porcentajes de células T periféricas CD3+ (16% y 19% de células T esplénicas, respectivamente) que el ratón sin evidencia de rechazo (7%). Para analizar con más precisión los injertos, se realizaron biopsias entre los días 30-40 y se realizaron análisis histológicos en secciones de parafina. En las secciones singénicas y alogénicas trasplantadas en los ratones a los que se les inyectó pT-ZAP, hubo evidencia de hiperplasia de fibroblastos. Sin embargo, sólo en las secciones alogénicas había una infiltración de linfocitos predominante en las capas superficiales de la dermis y la epidermis (en los 2 de 3 ratones con evidencia clínica de rechazo, figura 6b). Además, los linfocitos T procedentes de los ratones a los que se les inyectó por vía IT proliferaron en respuesta a estos aloantígenos, tal como se observa en una reacción de linfocitos mixtos. Las células T de ganglio linfático de ratones reconstituidos con pT-ZAP con injertos de piel y de tipo natural (C57BL/6) proliferaron en respuesta a antígeno alogénicos de BALB/c (figura 6c). Por tanto, se indujo la estimulación inmunitaria alogénica de células T transducidas con pT-ZAP mediante la presencia de un injerto de piel no coincidente.

40

e) *La eficacia de reconstitución de células T se mejora significativamente con la inyección intratímica de un vector lentiviral que expresa ZAP-70 en ratones lactantes*

45 El conjunto de los datos presentados anteriormente demuestra que la inyección intratímica de un vector lentiviral que codifica para ZAP-70 puede dar como resultado la restauración de la diferenciación de células T en el timo y la periferia de ratones deficientes en ZAP-70. No obstante, los inventores sólo pudieron detectar una reconstitución significativa de células T en 6 de 26 ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> adultos a los que se les inyectó por vía intratímica el vector pT-ZAP (23%). Los inventores creen que esta eficacia relativamente baja se debe en gran parte a (i) cuestiones técnicas relacionadas con la inyección de la suspensión de viriones en el timo pequeño de ratones adultos y (ii) la baja MOI utilizada. Además, también pueden desempeñar un papel una insuficiente expresión del transgén ZAP-70 en el timo y/o una población insuficiente de células progenitoras de timocitos que son susceptibles de transducción lentiviral.

50

Para intentar solventar estos problemas, los inventores inyectaron el vector lentiviral pT-ZAP en los timos de ratones jóvenes (10-14 días). Como en los lactantes humanos, los timos de ratones lactantes deficientes en ZAP-70 son significativamente mayores que en los adultos. Además, los inventores encontraron que un mayor porcentaje de protimocitos en los timos de lactantes deficientes en ZAP-70 eran “de tipo blasto” tal como se evaluó mediante sus perfiles de FSC/SSC y en ciclo (Ki-67+), en comparación con sus homólogos adultos (figura 7a). Como los inventores y otros han mostrado que la las células T en ciclación son significativamente más susceptibles de transducción lentiviral que la población quiescente (36), también se esperaba que los protimocitos de ratones jóvenes fueran más susceptibles de transferencia génica. En línea con esta hipótesis, los inventores encontraron que un mayor porcentaje de los timocitos Ki-67+ en los lactantes eran de un fenotipo DN inmaduro (25% frente al 14%, figura 7b).

60

Puesto que la realización de cirugía torácica en ratones de 10-14 días de edad representa un desafío técnico, los inventores desarrollaron un enfoque “ciego” en el que se inyectó directamente la suspensión de viriones a través de la piel en la cavidad torácica inmediatamente por encima del esternón. Este enfoque dio como resultado una inyección intratímica dirigida apropiadamente, tal como se evaluó usando colorantes inyectados (observaciones no publicadas). Tras la inyección intratímica de pT-ZAP en estos timos de lactantes, se detectó reconstitución de células T en el 75%

65

de los animales que se inyectaron (15 de 20), con porcentajes de células T CD3+ en los ganglios linfáticos y los bazos similares a los observados en ratones adultos tratados con éxito (figura 5C y tabla 1). Por tanto, la inyección directa *in vivo* del vector lentiviral que expresa ZAP-70 en los timos de los lactantes da como resultado una tasa de éxito mejorada significativamente de reconstitución de células T.

5

#### 4) *Discusión*

En conjunto, estos datos demuestran que la inyección directa de un vector lentiviral específico para células T en los timos de ratones deficientes en ZAP-70 permite la reconstitución a largo plazo de células T y la expresión transgénica en linfocitos T periféricos. La eficacia de este tratamiento se debe en gran parte al contexto de SCID en el que el transgén confiere una fuerte ventaja selectiva (4-7). De manera importante, esta ventaja selectiva se aprovecha completamente mediante la inyección intratímica, puesto que los inventores no llegan a observar reconstitución de células T con la inyección IV del vector pT-ZAP.

15

##### a) *Transducción de células progenitoras de células T tempranas mediante inyecciones intratímicas de vector lentiviral*

Con la transferencia génica intratímica, hubiera sido posible que los linfocitos T periféricos en ratones tratados con pT-ZAP surgieran de la expansión de una población clonal u oligoclonal de timocitos maduros derivados de timocitos DP transducidos tras la reorganización de la cadena beta. Los resultados dan razones en contra de esta hipótesis. De hecho, los inventores notificaron previamente que las células DN transducidas, que contienen las células progenitoras de células T inmaduras, pueden detectarse justo después de las inyecciones lentivirales IT de un vector lentiviral específico para células T (figura 3 en línea) o no específico (21). Además, podrían detectarse los timocitos modificados genéticamente durante periodos significativos de tiempo, aunque en número pequeño y en un bajo porcentaje de animales (<25%). En un animal al que se le inyectó pT-ZAP que se mantuvo durante un año, todavía se detectaron timocitos DN y DP inmaduros que expresan eGFP (0,5%) (figura 4 en línea). No obstante, no está claro si esto se debe al mantenimiento de las células progenitoras en el timo o más probablemente, a la recirculación de las células progenitoras transducidas hacia el timo. La segunda hipótesis está respaldada por el hallazgo del inventor de que pueden detectarse células progenitoras negativas para el linaje transducido en la médula ósea a > 8 semanas tras la inyección de pT-ZAP en el timo (observaciones no publicadas). Por tanto, será importante evaluar la "historia" de las células progenitoras tímicas y determinar si una subpoblación de estas células puede migrar desde el timo y luego volver a entrar en momentos posteriores.

35

##### b) *Diversidad y función de las células T*

El procedimiento con Immunoscope se basa en una RT-PCR de la región determinante de complementariedad hipervariable 3 (CDR3), permitiendo que se analicen las longitudes del ARNm que codifica para cada cadena  $\beta$  del TCR. En un entorno normal, cada pico individual se compone de múltiples secuencias reorganizadas de diferente manera. La detección de picos individuales para algunas familias de BV es indicativa de la expansión de clones individuales que se amplificarían preferentemente mediante PCR, y como tal, pueden impedir la detección de otros productos de CDR3 que pueden estar presentes, no obstante.

45

El nivel y la diversidad de las células T periféricas reconstituidas con pT-ZAP es suficiente para dotar a los ratones inmunodeficientes en ZAP-70 de células T funcionales que responden a una estimulación mitógena *in vitro*, y montan respuestas inmunitarias *in vivo* frente a los aloinjertos de piel. Con la mejora de la metodología, será importante evaluar las respuestas inmunitarias frente a exposiciones infecciosas y/o antigénicas nominales. Sin embargo, es importante observar que los perfiles de TCRBV detectados en los animales ZAP<sup>-/-</sup> tratados por vía IT recuerda los de un paciente con X-SCID cuyas células T se desarrollaron a partir de una mutación inversa en un único precursor de células T (9), dando como resultado un estado clínico bastante bueno (37). Por tanto, el rescate de unas cuantas células madre/progenitoras puede promover la diferenciación de células T con un repertorio de TCR parcialmente diversificado, suficiente para proporcionar a los individuos protección frente a la infección y un buen desenlace clínico.

55

##### c) *Posibles ventajas de seguridad de la terapia génica *in situ* para SCID*

Es digno de mención que, en los ratones a los que se les inyectó el vector utilizado en la presente memoria, en el que eGFP estaba dirigido por un promotor de CD4 mínimo, no se detectó la expresión de eGFP ni en el estroma tímico ni en el hígado, que eran las dianas principales transducidas tras la inyección IT usando vectores lentivirales ubicuos. En general, ésta es una ventaja principal de los vectores lentivirales en los que puede obtenerse especificidad de linaje, contribuyendo a la seguridad global del enfoque. Otra ventaja de este enfoque es que se obtuvo la transferencia génica en ausencia de acondicionamiento previo. De hecho, la inmensa mayoría de estudios que trasplantan HSC modificadas genéticamente en modelos de SCID murino se realizaron en ratones irradiados con una dosis letal (31, 38, 39). Además, en pacientes humanos con deficiencia en ADA, se ha mostrado que un alto nivel de reconstitución inmunitaria tras la inyección de HSC corregidas genéticamente *ex vivo* requiere quimioterapia previa al trasplante (6). De manera importante, en ratones deficientes en ZAP-70, la reconstitución de células T mediante HSC corregidas

65

*ex vivo* con un vector retroviral ZAP-70 no se produce en ausencia de acondicionamiento. Aunque en conjunto, la inyección IT de vectores lentivirales específicos para células T sin preacondicionamiento representa una mejora en la seguridad para la terapia génica de SCID.

5 Los inventores muestran que se obtuvo una mayor frecuencia de reconstitución en lactantes en comparación con ratones adultos, destacando además el interés de este enfoque en niños deficientes en ZAP-70. En vista de una posible aplicación clínica, los inventores evaluaron recientemente este enfoque en macacos, realizando una inyección intratímica directa con guiado por ultrasonidos, y determinaron que era un detalle técnico sencillo y factible. La eficacia global de este enfoque mejorará significativamente en un entorno clínico. De hecho, la transferencia génica intratímica de vectores lentivirales no es óptima cuando se aplica a ratones: (i) a MOI similares y a niveles de activación equivalentes, las células T murinas son menos susceptibles de infección lentiviral que las células T humanas (observaciones no publicadas en la ref. 37); y (ii) el pequeño tamaño del timo de ratón no permite ni la inyección de grandes cantidades de vectores ni las inyecciones repetidas. Asimismo, aunque la traslación de la terapia génica de ratones a animales más grandes o incluso seres humanos ha dado como resultado generalmente una disminución de las eficacias, este no sería el caso en este entorno.

### 5) Procedimientos

20 *Construcción lentiviral y producción de virus.* Se ha descrito previamente el plásmido pGM1 que codifica para un vector lentiviral específico para células T que expresa eGFP (29). Para obtener un vector lentiviral específico para células T que codifica para ZAP-70 y eGFP, se insertó un casete ZAP-70-IRES-eGFP (40) en el plásmido pGM1 delecionado para las secuencias codificantes de eGFP originales. El siguiente vector lentiviral específico para células T pRRLSIN.PPT.CD4pmE.ZAP-70-IRES-eGFPpre se denomina a continuación en la presente memoria pT-ZAP. Están disponibles detalles precisos sobre la clonación, a petición. Se produjeron viriones mediante cotransfección con fosfato de calcio transitoria de células 293T con el plásmido vector, un plásmido de encapsidación que carece de las proteínas de VIH-1 accesorias Vif, Vpr, Vpu y Nef (p8.91), y un plásmido de expresión de la envuelta de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (pHCMV-G) (41). Se determinaron los títulos virales, expresados como unidades de transducción (UT), evaluando las transducciones de células T de Jurkat con diluciones en serie de las preparaciones de viriones. La expresión de ZAP-70 y eGFP a partir de este casete es proporcional tal como se evaluó *in vitro*, usando la línea de células T de Jurkat.

35 *Ratones e inyecciones intratímicas.* Se criaron ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos. Se realizaron inyecciones intratímicas o bien a las 2-3 semanas de edad (ratones lactantes) o bien a las 6-9 semanas de edad (ratones adultos). En el primer caso, se inyectaron los viriones, en un volumen total de 10  $\mu$ l, directamente a través de la piel en la cavidad torácica inmediatamente por encima del esternón, utilizando una jeringuilla para insulina de 0,3 ml, calibre 28, 8 mm. Se anestesiaron los ratones adultos con 40 mg/kg de pentobarbital. Se practicó una incisión central en la parte inferior del cuello para obtener acceso a la tráquea. Se practicó la incisión del esternón en las dos primeras costillas y se inyectaron los viriones en el timo que se visualizaba. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Revisión Institucional de la instalación para animales local.

45 *Análisis de inmunofenotipificación, proliferación y citometría de flujo.* Se sacrificaron y se diseccionaron los ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> 6-18 semanas tras la inyección. Se obtuvieron controles a partir de ratones 129/Sv de edad coincidente. Se tiñeron células procedentes de los ganglios linfáticos, bazo o timo con los anticuerpos conjugados indicados (Pharmlingen). Para los análisis de proliferación, se resuspendieron los esplenocitos a una concentración de 2,5X10<sup>6</sup> células/ml y se marcaron con el fluorocromo succinimidil éster de diacetato de 5-carboxifluoresceína (CFSE; Molecular Probes) tal como se describió (42). Se cultivaron las células tal como se indicó en RPMI complementado con un 10% de FCS y  $\beta$ -mercaptoetanol 10  $\mu$ M en presencia de un mAb  $\alpha$ CD3 soluble (1  $\mu$ g/ml, Pharmlingen) o concanavalina A (1  $\mu$ g/ml). Alternativamente, se realizó una reacción mixta de linfocitos cultivando células de ganglio linfático (5 X 10<sup>5</sup>/pocillo) en medios complementados con IL-2 (50 U/ml) en presencia o ausencia de esplenocitos de Balb/c alogénicos (5 X 10<sup>5</sup>/pocillo). Se realizaron todas las adquisiciones en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) y se realizaron los análisis con software CellQuest (Becton Dickinson) o FlowJo (Tree Star).

55 *Trasplante de piel.* Se realizaron injertos de piel en ratones de tipo natural anestesiados (C57B16) y deficientes en ZAP-70 así como en ratones deficientes en ZAP-70 con células T reconstituidas 3 meses tras la inyección IT de pT-ZAP-70. Se prepararon injertos de piel de espesor total (0,5 cm<sup>2</sup>) a partir de la base de colas de donante tanto C57/B16 singénico como BalbC alogénico. Se prepararon los lechos de injerto en los laterales izquierdo y derecho de los lomos de los ratones receptores. Se acoplaron los injertos de piel tanto de ratones C57/B16 como BalbC a los lomos de cada ratón con suturas interrumpidas de hilo de seda y se monitorizó el aspecto del injerto 3 veces a la semana. Se prepararon secciones de parafina tras fijación con formalina de injertos a los que se hicieron biopsias. Se tiñeron las secciones con hematoxilina y eosina.

65 *Análisis del tamaño de CDR3 de TCR.* Se preparó ARN total utilizando RNable (Eurobio, Les Ulis, Francia). Se sometieron a transcripción inversa cinco  $\mu$ g de ARN utilizando cebadores de oligo(dT) (Pharmacia Biotech) y transcriptasa inversa del VLM-M (Gibco BRL). Se amplificaron los ADNc (ciclos de 1 min. 94°C, 1 min. 60°C, 2 min. 72°C) utilizando 2,5 U de la AmpliTaq polimerasa (Roche) en una mezcla de reacción de 50  $\mu$ l con uno de los 14 cebadores específicos para la subfamilia de TCRBV y un cebador C $\beta$  que reconoce las regiones constantes C $\beta$ 1 y C $\beta$ 2 de la cadena beta del TCR. La concentración final era de 0,5  $\mu$ M para cada cebador, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM

## ES 2 320 909 T3

en 1X tampón de PCR (Roche). Se procesaron adicionalmente dos  $\mu\text{l}$  de cada PCR en una reacción de transcripción de tipo "run-off" (10 ciclos de 1 min. 94°C, 1 min. 60°C, 2 min. 72°C) utilizando 0,2  $\mu\text{M}$  de un cebador  $C\beta$  marcado con ROX (Prologo France, París, Francia) y 2,5 U de la AmpliTaq polimerasa (Roche). Se desnaturalizó cada producto de la transcripción de tipo "run-off" y se cargó en un gel para análisis de fluorescencia utilizando un secuenciador Applied Biosystem 377 (PerkinElmer). Para obtener los perfiles de longitud de CDR3 representados en la figura 6, se analizaron los datos sin tratar utilizando el software Immunoscope (Loginserm, París, Francia). La nomenclatura TCRBV propuesta por Arden *et al.* se utilizó en este estudio (43).

TABLA 1

*Porcentajes de linfocitos CD3+ en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> tras la inyección tímica in situ de un vector lentiviral que expresa ZAP-70*

Se inyectó a ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> el vector lentiviral que expresa ZAP-70 en las edades indicadas y se analizaron a las 12-52 semanas tras la inyección tal como se indica. Se determinaron los porcentajes de células T CD3+ en los ganglios linfáticos de los animales sacrificados así como los porcentajes de células eGFP+ dentro de las poblaciones CD3+ mediante citometría de flujo. Obsérvese que los análisis presentados de los ratones a los que se inyectó por vía IT se limitan a los ratones que muestran reconstitución de células T para los que se realizaron análisis de los ganglios linfáticos. Se muestran los porcentajes de células T en ratones WT y ZAP-70<sup>-/-</sup> control.

Ratón	Edad en la inyección	Tiempo tras la inyección	% de células T CD3	% de células T EGFP+
ZAP <sup>-/-</sup> 1	/	/	3	1
ZAP <sup>-/-</sup> 2	/	/	4	2
ZAP <sup>-/-</sup> 3	/	/	3	<0,5
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 5-13	12	20	23	14
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 5-10	12	1 año	19	44
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 2-6	9	8	26	66
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 3-2	9	10	13	35
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 5-6	4	20	23	25
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 4-3	2	20	11	15
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 4-4	2	20	20	25
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 4-5	2	20	16	41
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 6-5	2	15	11	48
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 7-2	2	17	16	42
ZAP <sup>-/-</sup> IT n° 7-3	2	17	10	14
WT 1	/	/	75	<0,5
WT 2	/	/	51	<0,5
WT 3	/	/	64	<0,5

### 6) Bibliografía

1. Antoine, C., Muller, S., Cant, A., Cavazzana-Calvo, M., Veys, P., Vossen, J., Fasth, A., Heilmann, C., Wulffraat, N., Seger, R., *et al.* 2003. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet* 361:553-560.

2. Buckley, R.H., Schiff, S.E., Schiff, R.I., Markert, L., Williams, L.W., Roberts, J.L., Myers, L.A., y Ward, F.E. 1999. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 340:508-516.

3. Patel, D.D., Gooding, M.E., Parrott, R.E., Curtis, K.M., Haynes, B.F., y Buckley, R.H. 2000. Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 342:1325-1332.

4. Kohn, D.B., Hershfield, M.S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E.M., Barsky, L.W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., *et al.* 1998. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA- deficient SCID neonates. *Nat Med* 4:775-780.

5. **Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., et al. 2000.** Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
6. **Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., et al. 2002.** Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296:2410-2413.
7. **Gaspar, H.B., Parsley, K.L., Howe, S., King, D., Gilmour, K.C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., et al. 2004.** Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364:2181-2187.
8. **Hirschhorn, R., Yang, D.R., Puck, J.M., Huie, M.L., Jiang, C.K., y Kurlandsky, L.E. 1996.** Spontaneous *in vivo* reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 13:290-295.
9. **Bousso, P., Wahn, V., Douagi, I., Horneff, G., Pannetier, C., Le Deist, F., Zepp, F., Niehues, T., Kourilsky, P., Fischer, A., et al. 2000.** Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived *in vivo* from a single human T cell precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:274-278.
10. **Stephan, V., Wahn, V., Le Deist, F., Dirksen, U., Broker, B., Muller-Fleckenstein, I., Horneff, G., Schroten, H., Fischer, A., y de Saint Basile, G. 1996.** Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *N Engl J Med* 335:1563-1567.
11. **Ariga, T., Oda, N., Yamaguchi, K., Kawamura, N., Kikuta, H., Taniuchi, S., Kobayashi, Y., Terada, K., Ikeda, H., Hershfield, M.S., et al. 2001.** T-cell lines from 2 patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency showed the restoration of ADA activity resulted from the reversion of an inherited mutation. *Blood* 97:2896-2899.
12. **Cavazzana-calvo, M., Hacein-Bey, S., De Saint Basile, G., Gross, F., Nusbaum, P., Yvon, E., Casanova, G.L., Le Deist, F., y Fisher, A. 1999.** Correction of SCID-XI disease phenotype following gc gene transfer by a retroviral vector into CD34+ cells in two children. *Abstract in Blood*, A. S. H. 94 sup 1:367a.
13. **Fischer, A., Hacein-Bey, S., y Cavazzana-Calvo, M. 2002.** Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 2:615-621.
14. **Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., et al. 2003.** A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255-256.
15. **Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., et al. 2002.** Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296:497.
16. **Esslinger, C., Chapatte, L., Finke, D., Miconnet, I., Guillaume, P., Levy, F., y MacDonald, H.R. 2003.** *In vivo* administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J Clin Invest* 111: 1673-1681.
17. **VandenDriessche, T., Thorrez, L., Naldini, L., Follenzi, A., Moons, L., Berneman, Z., Collen, D., y Chuah, M.K. 2002.** Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells *in vivo*. *Blood* 100:813-822.
18. **Yanay, O., Barry, S.C., Katen, L.J., Brzezinski, M., Flint, L.Y., Christensen, J., Liggitt, D., Dale, D.C., y Osborne, W.R. 2003.** Treatment of canine cyclic neutropenia by lentivirus-mediated G-CSF delivery. *Blood* 102:2046-2052. Epub 2003 May 2015.
19. **Palmowski, M., Salio, M., Dunbar, R.P., y Cerundolo, V. 2002.** The use of HLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev* 188:155-163.
20. **Kobinger, G.P., Louboutin, J.P., Barton, E.R., Sweeney, H.L., y Wilson, J.M. 2003.** Correction of the dystrophic phenotype by *in vivo* targeting of muscle progenitor cells. *Hum Gene Ther* 14:1441-1449.
21. **Baekelandt, V., Eggermont, K., Michiels, M., Nuttin, B., y Debysier, Z. 2003.** Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther* 10: 1933-1940.
23. **Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., y Bhandoola, A. 2003.** Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4:168-174.
24. **Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., y Weiss, A. 1992.** ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71:649-662.

25. **Chan, A.C., van Oers, N.S., Tran, A., Turka, L., Law, C.L., Ryan, J.C., Clark, E.A., y Weiss, A.** 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 152:4758-4766.
- 5 26. **Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., y Loh, D.Y.** 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435-438.
- 10 27. **Wiest, D.L., Ashe, J.M., Howcroft, T.K., Lee, H.M., Kemper, D.M., Negishi, I., Singer, D.S., Singer, A., y Abe, R.** 1997. A spontaneously arising mutation in the DLAARN motif of murine ZAP-70 abrogates kinase activity and arrests thymocyte development. *Immunity* 6:663-671.
- 15 28. **Kadlecek, T.A., van Oers, N.S., Lefrancois, L., Olson, S., Finlay, D., Chu, D.H., Connolly, K., Killeen, N., y Weiss, A.** 1998. Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J Immunol* 161:4688-4694.
- 20 29. **Marodon, G., Mouly, E., Blair, E.J., Frisen, C., Lemoine, F.M., y Klatzmann, D.** 2003. Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 101:3416-3423.
- 30 30. **Porritt, H.E., Gordon, K., y Petrie, H.T.** 2003. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* 198:957-962.
- 35 31. **Otsu, M., Steinberg, M., Ferrand, C., Merida, P., Rebouissou, C., Tiberghien, P., Taylor, N., Candotti, F., y Noraz, N.** 2002. Reconstitution of lymphoid development and function in ZAP-70-deficient mice following gene transfer into bone marrow cells. *Blood* 100:1248-1256.
- 30 32. **Bellier, B., Thomas-Vaslin, V., Saron, M.F., y Klatzmann, D.** 2003. Turning immunological memory into amnesia by depletion of dividing T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15017-15022. Epub 2003 Nov 15021.
- 35 33. **Puisieux, I., Bain, C., Merrouche, Y., Malacher, P., Kourilsky, P., Even, J., y Favrot, M.** 1996. Restriction of the T-cell repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from nine patients with renal-cell carcinoma. Relevance of the CDR3 length analysis for the identification of *in situ* clonal T-cell expansions. *Int J Cancer* 66:201-208.
- 35 34. **Pannetier, C., Even, J., y Kourilsky, P.** 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16:176-181.
- 40 35. **Williams, B.L., Schreiber, K.L., Zhang, W., Wange, R.L., Samelson, L.E., Leibson, P.J., y Abraham, R.T.** 1998. Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol* 18:1388-1399.
- 45 36. **Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., Marmon, S., y Littman, D.R.** 1999. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med* 189:1735-1746.
- 45 37. **Hirschhorn, R.** 2003. *In vivo* reversion to normal of inherited mutations in humans. *J Med Genet* 40:721-728.
- 50 38. **Lo, M., Bloom, M.L., Imada, K., Berg, M., Bollenbacher, J.M., Bloom, E.T., Kelsall, B.L., y Leonard, W.J.** 1999. Restoration of lymphoid populations in a murine model of X-linked severe combined immunodeficiency by a gene therapy approach. *Blood* 94:3027-3036.
- 50 39. **Otsu, M., Anderson, S.M., Bodine, D.M., Puck, J.M., O'Shea, J.J., y Candotti, F.** 2000. Lymphoid development and function in X-linked severe combined immunodeficiency mice after stem cell gene therapy. *Mol Ther* 1:145-153.
- 55 40. **Steinberg, M., Swainson, L., Schwarz, K., Boyer, M., Friedrich, W., Yssel, H., Taylor, N., y Noraz, N.** 2000. Retrovirus-mediated transduction of primary ZAP-70-deficient human T cells results in the selective growth advantage of gene-corrected cells: implications for gene therapy. *Gene Ther* 7:1392-1400.
- 60 41. **Yee, J.K., Miyanochara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Bums, J.C., y Friedmann, T.** 1994. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9564-9568.
- 65 42. **Dardalhon, V., Jaleco, S., Kinet, S., Herpers, B., Steinberg, M., Ferrand, C., Froger, D., Leveau, C., Tiberghien, P., Charneau, P., et al.** 2001. IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9277-9282.
43. **Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., y Mak, T.W.** 1995. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42:455-500.

## 7) Leyendas de las figuras

Figura 1. Representación esquemática del vector lentiviral pCD4 que codifica para ZAP-70 de tipo natural. Se indican las posiciones relativas de los elementos contenidos dentro del vector lentiviral pCD4. LTR en 5', repetición terminal larga (LTR); SD, donador de corte y empalme; SA, aceptor de corte y empalme; Ψ, señal de empaquetamiento; GA-RRE, secuencia gag truncada con el elemento sensible a rev; cypT, tramo de polipurina central del VIH; CD4pME, promotor mínimo de CD4 humano/casete potenciador murino (590 pb); ADNc de ZAP-70; IRES, sitio interno de entrada al ribosoma; eGFP, ADNc de proteína fluorescente verde potenciada; WPRE, elemento regulador que actúa en cis postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (587 pb); y LTR-SIN, LTR en 3' de autoinactivación (deleciónado de 400 pb en la región U3).

Figura 2. Diferenciación de timocitos en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> tras la inyección *in situ* de un vector lentiviral que expresa ZAP-70. Un vector lentiviral que expresa ZAP-70 (pT-ZAP) se inyectó por vía intratímica a ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> de 8-12 semanas de edad y se recogieron timocitos de los animales sacrificados 7-13 semanas más tarde. (A) Se tiñeron los timocitos totales con mAb αCD8 conjugados con Cy y αCD4 conjugados con APC. Se indican los porcentajes de timocitos dobles positivos y simples positivos (SP) CD4+ y CD8+ en ratones WT (C57/B16), ZAP-70<sup>-/-</sup>, y reconstituidos *in vivo* en cada gráfico de puntos. (B) Se muestran los porcentajes de células eGFP+ dentro del timo completo así como dentro del subconjunto de timocitos en el que TCRβ estaba regulado por incremento. Se muestran las distribuciones de CD4/CD8 de timocitos con TCRβ regulado por incremento dentro de la población EGFP- de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> y WT. Adicionalmente, se comparan las distribuciones de CD4/CD8 dentro de las poblaciones con TCRβ regulado por incremento EGFP- y EGFP+ en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> a los que se inyectó el lentivector pT-ZAP. Se sacrificó el ratón al que se inyectó por vía IT a las 8 semanas tras el tratamiento y los resultados son representativos de los datos obtenidos de 6 ratones

Figura 3. Cinética de migración de linfocitos T periféricos tras la inyección tímica *in situ* de un vector lentiviral que expresa ZAP-70. (A) Se monitorizó la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ en la sangre periférica de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> mediante citometría de flujo a las 4 y 6 semanas tras la inyección intratímica del vector lentiviral pT-ZAP. Se indica el porcentaje global de células T CD4+ y CD8+ dentro de la sangre periférica en estos momentos. También se muestran los análisis de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> y WT representativos. (B) Se muestran los porcentajes de células eGFP+ en la sangre periférica de todos los animales. Se evaluaron los fenotipos CD4/CD8 de las células eGFP+ aisladas de los ratones a los que se inyectó pT-ZAP a las 4 y 6 semanas mediante selección específica en esta población.

Figura 4. Reconstitución de linfocitos T en ratones ZAP-70<sup>-/-</sup> tras la inyección *in situ* de un vector lentiviral que expresa ZAP-70. Se recogieron los ganglios linfáticos de ratones WT, ZAP-70<sup>-/-</sup> y ZAP-70<sup>-/-</sup> a los que se inyectó por vía intratímica el vector lentiviral pT-ZAP (ZAP-70<sup>-/-</sup> IT). (A) Se indican los porcentajes de células CD4, CD8, CD3 y CD19. (B) Se determinó el estado de activación de la población de células T utilizando los mAb αCD69 y αCD25 conjugados con PE y se monitorizaron los porcentajes relativos de células T vírgenes y de memoria con un mAb que reconoce CD62L (CD62L+ y CD62L-, respectivamente). Los porcentajes de células teñidas de manera positiva se indican en cada histograma. Se sacrificó a los ratones reconstituidos por vía IT representativos presentados aquí a las 8 semanas tras la inyección.

Figura 5. Expresión de ZAP-70 y diversidad en linfocitos T reconstituidos mediante inyección intratímica del vector lentiviral pT-ZAP. (A) Se evaluaron los niveles de ZAP-70 en esplenocitos totales de ratones WT y ZAP-70 reconstituidos por vía IT así como en poblaciones CD3+ y CD3- separadas, mediante inmunotransferencias utilizando un mAb αZAP-70. (B) Se evaluó el repertorio de TCRBV mediante una comparación de la distribución de tamaños de CDR3 del receptor de células T (perfiles de Immunoscope) de células de ganglio linfático obtenidas de ratones WT y ZAP-70<sup>-/-</sup> adultos reconstituidos por vía IT. Se generaron productos de PCR mediante trascripción inversa con diferentes cebadores específicos para la subfamilia de TCRBV y 1 cebador consenso β constante (Cβ), seguido por una reacción de transcripción de tipo "run-off" con un cebador Cβ fluorescente. Los gráficos representan la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (eje y) representada gráficamente frente al tamaño de CDR3 (eje x). Se muestran los resultados representativos que muestran las distribuciones de tamaño dentro de 14 familias de TCRBV.

Figura 6. Sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de linfocitos T reconstituidos mediante inyección intratímica de pT-ZAP. (A) Se marcaron esplenocitos de ratones ZAP-70<sup>-/-</sup>, WT y ZAP-70<sup>-/-</sup> reconstituidos por vía IT con el colorante fluorescente CFSE y se cultivaron *in vitro* en presencia de concanavalina A o αCD3/IL-2 durante 3 días y se analizaron las células para determinar la intensidad de CFSE mediante citometría de flujo. Los números mostrados por encima de los picos indican el número de divisiones celulares. Se sacrificaron los ratones ZAP-70 reconstituidos por vía IT a las 8 semanas tras la inyección. (B) Se tiñeron con hematoxilina y eosina secciones histológicas de secciones de piel singénicas (C57B16) y alogénicas (BalbC), que se habían injertado ambas en el mismo ratón ZAP-70 reconstituido por vía IT. Se muestra la presencia de linfocitos (detectada como tinción púrpura oscura) que se infiltran en la epidermis en el recuadro ampliado. Se inyectó al ratón reconstituido por vía IT 14 semanas antes del injerto de piel y se realizó la histología de la piel 30 días más tarde. Se muestra un aumento de 20X. (C) Se marcaron células de ganglio linfático de un ratón WT (C57/B16) y un ratón ZAP-70 reconstituido por vía IT (injertado previamente tal como se describió anteriormente; sacrificado a las 6 semanas tras el injerto) con CFSE y se cultivaron en ausencia (-) o presencia (+) de esplenocitos BalbC alogénicos (MLR; reacción mixta de linfocitos). Tras 3 días, se tiñeron las células con un mAb αCD4 y los porcentajes de células CD4+ que se dividieron, tal como se evaluó mediante una pérdida de intensidad de CFSE, se indican en cada gráfico de puntos.

## ES 2 320 909 T3

Figura 7. Eficacia de reconstitución de células T mejorada tras la inyección intratímica de un vector lentiviral que expresa ZAP-70 en ratones lactantes. (A) se muestran perfiles de las dispersiones luminosas de ángulo frontal (FSC) y de ángulo lateral (SSC) de timos de un ratón ZAP-70 KO de 2 semanas de edad (lactante) y uno adulto. Se monitorizó la entrada en el ciclo celular de timocitos totales de un ratón ZAP-70 KO lactante y uno adulto evaluando la expresión intracelular del antígeno Ki-67 utilizando un mAb conjugado con fluorocromo. Se muestra la distribución de CD4/CD8 dentro de las fracciones de timocitos Ki67+. (B) Se monitorizó la reconstitución de células T en el ganglio linfático de un ratón lactante ZAP-70 KO al que se le inyectó por vía intratímica el vector lentiviral pT-ZAP, mediante citometría de flujo y es representativo de 9/10 ratones lactantes tratados por vía IT.

### II) Transducción *in situ* de células del estroma y timocitos tras la inyección intratímica de vector lentiviral (invención)

#### 1) Resultados

##### a) La inyección intratímica de vectores lentivirales da como resultado una infección eficaz y persistente de células del estroma tímico

Los inventores utilizaron una disolución madre viral concentrada del vector LvPGK-GFP ( $2 \cdot 10^9$  UT<sub>143B</sub>/ml) para inyectar entre  $7 \times 10^7$  y  $1,2 \times 10^8$  unidades infecciosas en el timo de ratones C57B1/6 normales. Pudieron detectarse fácilmente las células infectadas en el día 5 tras la inyección mediante examen directo de los timos bajo un microscopio UV (figura 8). Digno de mención, podían observarse todavía células transducidas a 1 (figura 8) y 3 meses (datos no mostrados) tras la inyección. La mayoría de las células transducidas presentaban una morfología fibroblástica. Para monitorizar un posible paso del vector a través del torrente sanguíneo, los inventores controlaron la presencia de células transducidas en el hígado, que es el principal órgano diana tras la inyección intravenosa de vectores lentivirales [14a]. De hecho, los inventores observaron numerosas células eGFP+ en el hígado (figura 8), sugiriendo un escape significativo hacia la circulación tras la inyección IT de hasta 30  $\mu$ l del vector. No obstante, los resultados demuestran una infección eficaz y persistente de células del estroma tímico tras la inyección IT de un vector lentiviral.

##### b) Inducción de selección negativa tras la inyección intratímica de vectores lentivirales

Los inventores quisieron investigar a continuación si las células del estroma tímico infectadas con un vector lentiviral podrían mediar una selección negativa de timocitos en desarrollo. Por tanto, Los inventores inyectaron un vector lentiviral que codificaba para la HA del virus influenza, o eGFP como control, en el timo de ratones SFE-Tg que expresaban un TCR específico para un péptido de la proteína HA y para el cual está disponible un anticuerpo clonotípico que reconoce el TCR transgénico (clon 6.5) [15a]. Seis días tras la inyección, los inventores analizaron los timocitos mediante citometría de flujo tras dilaceraciones de los timos. Se muestra la frecuencia de células 6.5+ dentro de timocitos CD4SP y CD8SP en la figura 9A para un experimento representativo. La inyección intratímica del vector LvPGK-HA dio como resultado una disminución en las frecuencias de células 6.5+ dentro de CD4SP en un factor de 2 y en un factor de 5 en células CD8SP con una desaparición casi completa de células 6.5<sup>hi</sup> en este último subconjunto. Es digno de mención que se redujo la intensidad de la expresión transgénica de TCR en células CD4SP (figura 9A). En general, los inventores observaron una disminución de 3,5 veces en el número total de de timocitos que expresan el TCR específico en ratones a los que se les inyectó el vector LvPGK-HA en comparación con el vector LvPGK-GFP (figura 9B). Estos resultados demostraron en conjunto que dentro de una semana tras la inyección intratímica del vector LvPGK-HA, las células del estroma tímico infectadas mediaron eficazmente la selección negativa de timocitos específicos para HA.

##### c) La inyección intratímica de vectores lentivirales da como resultado un bajo nivel de infección de timocitos inmaduros

Los inventores investigaron a continuación si las células T en desarrollo podrían infectarse tras la inyección IT del vector lentiviral. Cinco días tras la inyección del vector LvPGK-GFP en el timo de un ratón normal, pudieron detectarse muy pocas células eGFP+ mediante citometría de flujo dentro de los timocitos obtenidos a partir de los timos dilacerados (figura 10). La mayoría de estas células eran células CD3<sup>-</sup>, y pertenecían a los subconjuntos DN y DP, mostrando que las células infectadas eran en su mayoría inmaduras. De manera interesante, en el día 30 tras la inyección, los inventores observaron más células eGFP+ maduras que expresaban CD3 y que pertenecían a los subconjuntos de CD4SP y CD8SP para más de la mitad de ellas. Este resultado indica que la infección *per se* no interfiere con el proceso normal de desarrollo de las células T. Además, los inventores observaron un reparto similar de células que expresan CD4/CD8 en células eGFP<sup>-</sup> no infectadas. De manera colectiva, estos resultados muestran que los timocitos inmaduros pueden infectarse mediante infección lentiviral *in situ*. Sin embargo, los inventores no pudieron detectar claramente células T infectadas en el bazo de los ratones a los que se inyectó, probablemente debido a su pequeña representación en el conjunto de linfocitos maduros en ausencia de una ventaja selectiva para los linfocitos transducidos.

2) *Discusión*

Los inventores notifican en la presente memoria que la inyección IT de un vector lentiviral da como resultado la infección predominante de células del estroma tímico y una infección de bajo nivel de las células progenitoras timocíticas. También se detectó una infección significativa de células hepáticas. Esta observación recuerda lo observado por DeMatteo *et al.* con vectores adenovirales [7a]. Junto con el hecho de que las células hepáticas son dianas principales de los vectores adenovirales o lentivirales inyectados por vía IV, esto sugiere que un escape significativo a la circulación no se produce con la inyección IT de vectores virales. El análisis *in situ* de los inventores muestra que las células del epitelio tímico representan la inmensa mayoría de las células infectadas. Sea cual sea la proporción de células corticales, epiteliales medulares o células dendríticas tímicas que se transduzcan, los inventores muestran en la presente memoria que esto da como resultado una presentación de antígeno que media de manera eficaz en la selección negativa de timocitos específicos. Esto no se debe a la inyección de una preparación “bruta” de sobrenadante viral que podría haber afectado de manera no específica a la diferenciación de células T. De hecho, los inventores inyectaron cantidades 10 veces menores de p24 del vector LvPGK-HA que de los vectores LvPGK-GFP, lo que sugiere que la selección negativa de los timocitos específicos para HA era un efecto directo de la expresión de HA por las células del estroma tímico. Esto se apoya adicionalmente por el análisis de las frecuencias de los timocitos 6.5<sup>+</sup> que muestra la delección de las células 6.5<sup>hi</sup> dentro de las células CD8SP, una población restringida de CMH de clase II en estos ratones transgénicos para TCR [15a]. Se observó modulación por disminución del TCR transgénico y delección en las células CD4SP. Esto recuerda los resultados obtenidos recientemente por Trani *et al.* que mostraron que el suministro intratímico de una dosis creciente del péptido de HA en ratones SFE TCR-Tg daba como resultado la regulación por disminución del TCR transgénico [16a]. Por tanto, la regulación por disminución del receptor y/o la delección pueden actuar conjuntamente en la selección negativa de células CD4SP específicas para HA en ratones transgénicos para SFE.

Se detectó una infección muy baja de los timocitos en desarrollo. Esto no es sorprendente ya que (i) se estimó que la multiplicidad de infección (razón del número de unidades infecciosas con respecto al número de células totales en el timo) era inferior a 0,4 y (ii) la transducción lentiviral de células T murinas es mucho menos eficaz que la de células T humanas [17a]. Sin embargo, dado que el volumen real que puede inyectarse en el timo de un ratón es limitado, los inventores utilizaron la mayor MOI que podía conseguirse con los vectores concentrados. Pero debe destacarse que en el día 5 tras la inyección, las células infectadas representaban los timocitos inmaduros que no expresaban células CD3. En momentos posteriores, se detectó la infección en timocitos más maduros. Este resultado puede presentar implicaciones importantes para la terapia génica *in vivo* de inmunodeficiencias combinadas graves (SCID) que afectan al desarrollo de células T (revisado en [18a]). De hecho, la mayoría de estas enfermedades se deben a mutaciones monogénicas y afectan a timocitos inmaduros, tal como en las deficiencias de TB<sup>+</sup>NK<sup>-</sup> ligadas al receptor de citocina común gamma-c [19a], o a la proteína ZAP-70 tirosina cinasa [20a]. Estos resultados abren la posibilidad de corregir estos bloques de desarrollo a través del suministro IT de un vector lentiviral que expresa una molécula funcional. Para esta aplicación particular, sería importante evitar la expresión transgénica en el estroma tímico. La utilización del vector lentiviral específico para células T descrito recientemente representa una posibilidad atractiva con este fin [21a]. Dado el tremendo potencial proliferativo de las células T y la ventaja selectiva que se proporcionará mediante el transgén, incluso un número bajo de células transducidas dará como resultado una reconstitución significativa de células T. Esto se ejemplifica de la mejor manera mediante un único caso de inmunodeficiencia combinada grave ligada a X en el que se produjo una mutación inversa en un único precursor de células T temprano. Se determinó que se generaron al menos 1.000 clones de células T con secuencias de receptor beta de células T únicas a partir de este precursor y que esta diversidad parece ser estable a lo largo del tiempo y proporciona protección frente a infecciones *in vivo* [22a]. Además, estos resultados muestran que el suministro intratímico del gen ZAP-70 por medio de un vector lentiviral específico para células T en ratones deficientes en ZAP-70 da como resultado la restauración del desarrollo de células T (véase anteriormente). El enfoque descrito en la presente memoria representa una alternativa a los protocolos de terapia génica que utilizan la manipulación engorrosa de células madre hematopoyéticas *ex vivo* antes de su reinfusión *in vivo*.

3) *Conclusiones*

Los resultados presentados en la presente memoria presentan implicaciones importantes para la manipulación experimental o terapéutica del sistema inmunitario, y de manera notable para la inducción de tolerancia y la corrección de SCID.

4) *Procedimientos*

*Ratones y cirugía intratímica.* Se utilizaron ratones C57B1/6 de 6 semanas de edad a las de 8 a 10 semanas de edad. Se criaron ratones SFE TCR-Tg [15a] en la instalación para animales de los inventores y se utilizaron a las de 6 a 10 semanas de edad. Se realizó una cirugía intratímica tras el tratamiento anestésico de animales con 40 mg/kg de pentobarbital (Sanofi-Synthelabo, Gentilly, Francia). Se realizó una incisión central en la parte inferior del cuello para obtener acceso a la tráquea. Se realizó una incisión en el esternón en las dos primeras costillas y se apartó con cuidado a un lado para ver el timo. Se realizó una única inyección de 10 a 30  $\mu$ l utilizando jeringuillas para insulina Terumo de 0,3 ml (VWR, Fontenay-sous-bois, Francia).

## ES 2 320 909 T3

*Construcción, producción, concentración y cuantificación de vectores lentivirales.* El plásmido que codifica para el vector lentiviral pRRLsin.PPT.hPGK.GFPpre (LvPGK-GFP) se ha descrito en otra parte [23a]. Para construir el plásmido que codifica para la proteína hemaglutinina (HA) del virus Influenza, se añadieron sitios de restricción BamHI y Sall en los extremos 5' y 3', respectivamente, al ADNc de la proteína HA del virus Influenza (H1N1) en el plásmido pCIneoHA (proporcionado por Genethon, Evry, Francia) mediante PCR utilizando la Taq polimerasa (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia). Se clonaron los productos de PCR totales en el vector TA (Invitrogen), se comprobó la integridad de secuencia y se digirió con BamHI/Sall. Se digirió el plásmido pRRLsin.PPT.hPGK.GFPpre con BamHI/Sall (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA) para eliminar la eGFP. Tras el ligamiento, se obtuvo el plásmido pRRLsin.PPT.hPGK.HApre, denominado a continuación en la presente memoria LvPGK-HA. Para producir vectores lentivirales, se cotransfectaron un total de  $4 \cdot 10^6$  células 293T con el vector de transferencia, los plásmidos de la envuelta y el empaquetamiento en placas de 10 cm utilizando el procedimiento del fosfato de calcio descrito [21a] en DMEM complementado con suero y antibióticos (Lifetechnologies, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se recogieron los sobrenadantes lentivirales a las 18, 42 y 66 h tras la cotransfección en DMEM libre de suero complementado con antibióticos y L-glutamina, y se concentró mediante ultrafiltración utilizando los dispositivos de filtro o bien Ultrafree-15 o bien Centricon Plus-80 según las instrucciones del fabricante (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.). Brevemente, se aplicaron los sobrenadantes a los dispositivos de filtro y se centrifugaron a 2.000 g durante 20 min. a 20°C. Se prepararon alcuotas de los sobrenadantes concentrados y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización. Las soluciones madre virales del vector lentiviral LvPGK-GFP se titularon con células 143B tal como se describió anteriormente [21a]. Las soluciones madre virales de los vectores LvPGK GFP y LvPGK-HA también se cuantificaron utilizando un ELISA para gag p24 (Zeptomatrix, Búfalo, Nueva York, EE.UU.).

*Microscopía y tratamiento de imágenes.* Se extirparon el hígado o el timo completo de ratones que se inyectaron y se colocaron en 1X PBS en una placa de 6 pocillos. Se obtuvieron imágenes del órgano completo utilizando una cámara numérica DP-11 acoplada con el microscopio invertido CK-40 equipado con una lámpara de mercurio (Olympus France S.A, Rungis, Francia). Se procesaron las imágenes utilizando Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, California, EE.UU.).

*Citometría de flujo.* Se dilaceraron los timos entre dos portaobjetos congelados en 1X PBS complementado con un 3% de suero de ternero fetal (Lifetechnologies). Se numeraron las suspensiones celulares y se tiñeron  $10^6$  células con los siguientes anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson Biosciences, le Pont de Claix, Francia): CD4-APC (aloficocianina), CD8-CyCr (Cychrome) y o bien CD3 o una cadena beta del TCR-PE (ficoeritrina) o TCR anti-clonotípico purificado para el péptido de HA SFERFEIFPK presentado por I-E<sup>d</sup> de CMH de clase II (clon 6.5) ([15a]) seguido de estreptavidina-FITC e IgG2b anti-rata biotinilada. Se recopilaron los datos en un FACScalibur (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (TreeStar, Ashland, Oregon, EE.UU.).

Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: DN: doble negativo, DP: doble positivo, SP: simple positivo, IT: intratímico, IV: intravenoso, HA: hemaglutinina, MOI: multiplicidad de infección, SCID: inmunodeficiencias combinadas graves.

### 5) Bibliografía

1a. **Hugo, P, Boyd, R:** Thymus in Nature Encyclopedia of Life Sciences, Londres: Nature Publishing Group; 2002. [doi:10.1038/npg.els.0000526].

2a. **Klein, L, Kyewski, B:** Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* 2000, 12:179-186.

3a. **Naji, A:** Induction of tolerance by intrathymic inoculation of alloantigen. *Curr Opin Immunol* 1996, 8:704-709.

4a. **Posselt, AM, Barker, CF, Tomaszewski, JE, Markmann, JF, Choti, MA, Naji, A:** Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990, 249:1293-1295.

5a. **Khoury, SJ, Gallon, L, Chen, W, Betres, K, Russell, ME, Hancock, WW, Carpenter, CB, Sayegh, MH, Weiner, HL:** Mechanisms of acquired thymic tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: thymic dendritic-enriched cells induce specific peripheral T cell unresponsiveness *in vivo*. *J Exp Med* 1995, 182:357-366.

6a. **Ilan, Y, Attavar, P, Takahashi, M, Davidson, A, Horwitz, MS, Guida, J, Chowdhury, NR, Chowdhury, JR:** Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long-term gene therapy in Gunn rats. *J Clin Invest* 1996, 98:2640-2647.

7a. **DeMatteo, RP, Chu, G, Ahn, M, Chang, E, Barker, CF, Markmann, JF:** Long-lasting adenovirus transgene expression in mice through neonatal intrathymic tolerance induction without the use of immunosuppression. *J Virol* 1997, 71:5330-5335.

8a. **Rooke, R, Waltzinger, C, Benoist, C, Mathis, D:** Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 1997, 7:123-134.

- 9a. **Vigna, E, Naldini, L**: Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2000, 2:308-316.
- 10a. **Kafri, T, Blomer, U, Peterson, DA, Gage, FH, Verma, IM**: Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet.* 1997, 17:314-317:
- 11a. **Esslinger, C, Chapatte, L, Finke, D, Miconnet, I, Guillaume, P, Levy, F, MacDonald, HR**: *In vivo* administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J Clin Invest* 2003; 111:1673-1681.
- 12a. **VandenDriessche, T, Thorrez, L, Naldini, L, Follenzi, A, Moons, L, Berneman, Z, Collen, D, Chuah, MK**: Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells *in vivo*. *Blood* 2002, 100:813-822.
- 13a. **Naldini, L, Blömer, U, Gallay, P, Ory, D, Mulligan, R, Gage, FH, Verma, IM, Trono, D**: *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996, 272:263-267.
- 14a. **Pan, D, Gunther, R, Duan, W, Wendell, S, Kaemmerer, W, Kafri, T, Verma, IM, Whitley, CB**: Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of *in vivo* transduction of bone marrow. *Mol Ther* 2002, 6:19-29.
- 15a. **Kirberg, J, Baron, A, Jakob, S, Rolink, A, Karjalainen, K, von Boehmer, H**: Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J. Exp. Med.* 1994, 180:25-34.
- 16a. **Trani, J, Moore, DJ, Jarrett, BP, Markmann, JW, Lee, MK, Singer, A, Lian, M-M, Tran, B, Caton, AJ, Markmann, JF**: CD25+ Immunoregulatory CD4 T Cells Mediate Acquired Central Transplantation Tolerance. *J Immunol* 2003, 170:279-286.
- 17a. **Unumatz, D, KewalRamani, VN, Marmon, S, Littman, DR**: Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1999, 189:1735-1746.
- 18a. **Buckley, RH**: Molecular Defects in Human Severe Combined Immunodeficiency and Approaches to Immune Reconstitution. *Annu Rev Immunol* 2004, 22:625-655.
- 19a. **Noguchi, M, Yi, H, Rosenblatt, HM, Filipovich, AH, Adelstein, S, Modi, WS, McBride, OW, Leonard, WJ**: Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993, 73:147-157.
- 20a. **Arpaia, E, Shahar, M, Dadi, H, Cohen, A, Roifman, C**: Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking ZAP-70 kinase. *Cell* 1994, 76:947-958.
- 21a. **Marodon, G, Mouly, E, Blair, EJ, Frisen, C, Lemoine, FM, Klatzmann, D**: Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 2003, 101:3416-3423.
- 22a. **Bousso, P, Wahn, V, Douagi, I, Horneff, G, Pannetier, C, Le Deist, F, Zepp, F, Niehues, T, Kourilsky, P, Fischer, A, et al**: Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived *in vivo* from a single human T cell precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:274-278.
- 23a. **Follenzi, A, Ailles, LE, Bakovic, S, Geuna, M, Naldini, L**: Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 2000, 25:217-222.

## 6) Leyendas de las figuras

Figura 8 - *Expresión in vivo de eGFP tras la inyección intratímica del vector LvPGK-GFP*. D5: Localización en el día 5 tras la inyección de células transducidas alrededor del sitio de inyección (flecha) bajo luces visible y UV (imagen superior). Las células con forma de fibroblasto están predominantemente transducidas (sólo luz UV) (panel inferior). D30: Expresión en el día 30 tras la inyección de eGFP en el timo (luz visible + UV) (panel superior) y en el hígado (sólo luz UV) (panel inferior). CTRL: Imágenes de timo (panel superior) e hígado (panel inferior) de ratones control a los que se les inyectó por vía IT PBS examinados para determinar la fluorescencia de fondo bajo luces visible y UV. Los aumentos se indican en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Figura 9 - *Selección negativa de timocitos en desarrollo* (A) Expresión transgénica de TCR dentro de células CD4SP (grises) y CD8SP (blancas) tímicas identificadas mediante el anticuerpo monoclonal anti-clonotípico 6.5 en ratones SFE-Tg seis días tras la inyección IT de 40 a 60 ng de p24 del vector lentiviral LvPGK-GFP (n=2) o de 3,5 a 6 ng de p24 del vector LvPGK-HA (n=3). Se muestra el perfil representativo de dos experimentos independientes. Los

números indican la frecuencia de las células  $6.5^+$  (B) Recuentos absolutos de timocitos específicos de HA seis días tras la inyección tímica de vectores lentivirales LvPGK-GFP o LvPGK-HA. Estas figuras se obtuvieron basándose en los porcentajes de timocitos  $6.5^+$  totales determinados mediante citometría de flujo tal como se muestra en (A). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de la t de Student.

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35

Figura 10 - *Expresión de eGFP en timocitos en desarrollo*. Los timocitos totales se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD3. Paneles superiores: se muestran ratones control a los que se les inyectó solución salina (CTRL) y ratones a los que se les inyectó LvPGK-GFP en dos momentos diferentes tras la inyección (D5 y D30). Paneles inferiores: El perfil de la expresión de CD4/CD8 se muestra dentro de células eGFP<sup>+</sup> seleccionadas.

### III) *Desplazamiento del equilibrio de la diferenciación de células T reguladoras frente a efectoras mediante la expresión intratímica del antígeno relacionado (invención)*

Las abreviaturas utilizadas a continuación en la presente memoria son las siguientes: HA, hemaglutinina; HEL, lisozima de huevo de gallina; Treg, células T reguladoras; mTEC, células del epitelio tífico medular; PGK, fosfoglicerato cinasa.

#### 1) *Resumen*

Células T reguladoras/supresoras con diversos fenotipos y funciones coexisten en el sistema inmunitario. Entre ellas, un subconjunto único de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+$  que se producen de manera natural se genera en el timo. El hecho de si tales células T reguladoras se generan a través del reconocimiento de autoantígenos expresados en el timo o no es controvertido. Para tratar esta cuestión, los inventores analizaron la diferenciación tímica de células T específicas para la proteína hemaglutinina (HA) del virus Influenza en ratones transgénicos para HA o como resultado de la inyección intratímica de un vector lentiviral que expresa HA. Sorprendentemente, la expresión de HA en el timo condujo a un enriquecimiento de 10 veces en el número absoluto de timocitos  $CD4^+CD25^+$  específicos para HA, en comparación con ratones control. Además, dio como resultado un enriquecimiento de las células T reguladoras específicas para antígeno funcionales en la periferia. Por tanto los resultados indican que la diferenciación de células T reguladoras es un proceso activo ordenado por la expresión tímica del antígeno relacionado. Además, muestran que la expresión de antígeno mediada por vector lentiviral representa un medio nuevo y fácil para la generación *in vivo* de células T reguladoras específicas para antígeno, para fines de investigación y terapéuticos.

#### 2) *Introducción*

Varias poblaciones de células T con funciones reguladoras/supresoras coexisten en el sistema inmunitario. Entre ellas, las células T  $CD4^+$  reguladoras que expresan la cadena  $\alpha$  del receptor de interleucina 2 (CD25) (Treg) han atraído un interés particular porque se ha mostrado que previenen, retrasan o curan una variedad de enfermedades autoinmunitarias en ratones (revisado en (1b)). Además, varias enfermedades autoinmunitarias en seres humanos se han relacionado con un defecto cualitativo y/o cuantitativo de Treg. Un ejemplo representativo es el síndrome IPEX, un trastorno mortal provocado por un defecto genético en el factor de transcripción *foxp3* que se considera el gen maestro para la diferenciación de Treg (2b, 3b). Por tanto, las Treg dan grandes esperanzas para el tratamiento de trastornos inmunitarios en general y de enfermedades autoinmunitarias en particular.

La generación de Treg en el timo comienza durante el periodo fetal en seres humanos (4b) y el periodo perinatal en ratones (5b). La función reguladora de Treg se adquiere durante la selección tímica, tal como se muestra mediante la capacidad de los timocitos  $CD4^+CD25^+$  aislados para suprimir la proliferación de linfocitos (6b). Los inventores sugirieron previamente que el reconocimiento del antígeno relacionado en el timo conduce a la aparición de células T  $CD4^+CD25^+$  (7b). Más recientemente, se ha mostrado que la expresión de HA en el timo conducía a un aumento de la frecuencia y/o del número de Treg específicas para HA en ratones transgénicos para el receptor de células T (TCR) (8b-11b). También se han notificado observaciones similares en ratones transgénicos para TCR específicos para ovoalbúmina- (12b-14b) y glucosa-6-fosfato isomerasa (15b). Sin embargo, en ratones transgénicos para TCR específicos para el citocromo c de polilla o los antígenos de lisozima de huevo de gallina (HEL), el número de Treg específicas no aumentó con la expresión del antígeno relacionado en el timo, a pesar del aumento en sus frecuencias, los que sugiere una mejor supervivencia de Treg durante la selección negativa (16b, 17b). Por tanto, el impacto de la expresión de antígeno relacionado tífico sobre la selección de Treg sigue siendo controvertido.

Para volver a evaluar la sección de células Treg tímicas, los inventores utilizaron ratones transgénicos que expresan la proteína hemaglutinina (HA) del virus influenza bajo el control del promotor de insulina (Ins-HA) (18b), imitando la expresión fisiológica de insulina en el timo por las células del epitelio tífico medular (mTEC) (19b). Los inventores estudiaron el impacto de la expresión de HA en el timo sobre la selección de Treg cruzando estos ratones con ratones transgénicos para TCR específicos para el péptido HA<sub>111-119</sub> presentado por moléculas I-E<sup>d</sup> del CMH de clase II (TCR-HA) (20b). En estos ratones, las células T específicas para HA pueden identificarse con el mAb anti-clonotípico 6.5. En ratones transgénicos TCR-HA<sub>x</sub>Ins-HA, la cadena beta de TCR transgénico frecuentemente se empareja con cadenas alfa de TCR endógeno de modo que la expresión de la cadena  $\alpha\beta$  de TCR específica para HA se limita a

sólo el 10-20% de las células T CD4<sup>+</sup> (21b). Esto está en marcado contraste con otros modelos en los que las células T transgénicas para TCR pueden representarse a frecuencias superiores al 90%. Los inventores también expresaron HA en ratones transgénicos TCR-HA utilizando la inyección intratímica de un vector lentiviral que codifica para HA (véase anteriormente). Estos resultados muestran que el antígeno relacionado puede ordenar la diferenciación de Treg.

5

### 3) Resultados y discusión

Tal como se notificó anteriormente, del 20 al 30% de los ratones doblemente transgénicos TCR-HAxIns-HA desarrollaron diabetes a las cinco semanas de edad, mientras que los otros recibieron infiltrados de linfocitos de los islotes  $\beta$  pancreáticos (21b). Para entender por qué estos ratones no desarrollaron una tolerancia inmunitaria completa hacia HA, los inventores investigaron en primer lugar la diferenciación tímica de las células T específicas para HA en ratones TCR-HAxIns-HA no diabéticos. En comparación con los ratones TCR-HA con edades coincidentes, el número medio de timocitos 6.5<sup>+</sup> específicos para HA permaneció invariable o disminuyó menos de dos veces a las 6 ó 14 semanas de edad, respectivamente (figura 11A). Por tanto, la deleción de timocitos específicos para HA en ratones TCR-HAxIns-HA es mucho menos pronunciada que la observada en modelos similares de ratones transgénicos que expresan el antígeno relacionado en diversos promotores específicos de tejido, tal como la expresión de ovoalbúmina dirigida por el promotor de insulina en ratones transgénicos DO11-10 TCR (11b, 13b). La persistencia de timocitos específicos para HA en ratones con control parcial pero significativo de la diabetes, condujo a la investigación del desarrollo de Treg en este entorno. Por tanto, los inventores analizaron la diferenciación de timocitos CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>-</sup> 6.5<sup>+</sup> durante su transición de células T doble positivo inmaduras (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, DP) a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> maduras (CD4SP), pasando por la fase CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> (CD4<sup>int</sup>) (figura 11B). En comparación con los ratones transgénicos TCR-HA, las frecuencias de las células 6.5<sup>+</sup> en el subconjunto CD25<sup>-</sup> disminuyeron en ambas fases CD4SP y CD4<sup>int</sup> en ratones TCR-HAxIns-HA (figura 11D). En marcado contraste, las frecuencias de las células 6.5<sup>+</sup> dentro de los timocitos CD25<sup>+</sup> se amplificaron 3, 4 y casi 10 veces en los subconjuntos DP, CD4<sup>int</sup> y CD4SP de los ratones TCR-HAxIns-HA, respectivamente (figura 11C y 11D). Las frecuencias amplificadas se tradujeron en un aumento del número de células (figura 12). En comparación con los ratones TCR-HA, el aumento del número de células 6.5<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ya se detectó en el subconjunto DP de ratones TCR-HAxIns-HA, y era de 10 veces en ambos timocitos CD4<sup>int</sup> y CD4SP. De manera importante, un aumento de este tipo no se detectó para las células T 6.5<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>, lo que indica que en realidad estaba dirigido por HA (figura 12). Los inventores y otros han mostrado que la mayoría de los timocitos CD4SP CD25<sup>+</sup> expresan ARNm de foxp3 y presentan actividades supresoras similares a las Treg periféricas (4b, 8b, 16b). En los ratones TCR-HAxIns-HA, los timocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> también expresaban ARNm de foxp3 (figure 14). Por tanto, estos resultados indican que la expresión de HA en el timo conducía a la generación de un aumento en el número de Treg específicas para HA.

Los inventores notificaron anteriormente que las células del estroma tímico podían transducirse de manera eficaz tras la inyección intratímica de vectores lentivirales. Por tanto, para tratar adicionalmente el papel de la expresión del antígeno relacionado tímico en la diferenciación de Treg, los inventores inyectaron un vector lentiviral que codifica para HA (figura 13A) en el timo de ratones TCR-HA. Esto dio como resultado la deleción de los timocitos 6.5<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, lo que pudo detectarse una semana pero no uno o dos meses tras la inyección (tabla 2). Por el contrario, las frecuencias de las células específicas para HA dentro de los timocitos CD25<sup>+</sup> CD4SP se amplificaron de 2 a 10 veces a una semana y también a de uno a dos meses tras la inyección (tabla 1). Las frecuencias amplificadas de las células 6.5<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en el subconjunto CD4SP se tradujo en un aumento de 10 veces en su número (figura 13B). Digno de mención, el número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> específicas para HA en los ratones que habían recibido el vector de expresión de HA alcanzó el número absoluto de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> totales en ratones no tratados (figura 13B), lo que indica que el antígeno relacionado presentaba un efecto importante sobre la selección positiva de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Hubo un aumento moderado pero significativo en el número medio de células 6.5<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> en los ratones tratados con vector que expresa HA (figura 12B). De manera colectiva, estos resultados muestran que la expresión intratímica del antígeno relacionado condujo al aumento en las frecuencias y el número de Treg específicas para HA en ratones que nunca se habían expuesto previamente al antígeno.

50

Las células tímicas que median este efecto aún deben caracterizarse. Los inventores obtuvieron una selección positiva similar de Treg específicas para HA tras el trasplante de médula ósea de ratones transgénicos TCR-HA en ratones transgénicos TCR-HA irradiados a los que se les inyectó un vector que expresaba HA, lo que indica que estas células son radiorresistentes. Dado que se cree que las células del epitelio cortical tímico son las responsables de la diferenciación de Treg en el timo (23b), los inventores especulan que también pueden contribuir a la generación de Treg con la expresión de antígeno mediada por vector lentiviral.

55

La frecuencia de 6.5<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> también aumentó en los ganglios linfáticos de ratones a los que se les inyectó el vector que expresa HA, en comparación con los ratones control a los que se les inyectó un vector que expresa eGFP (tabla 1). Dado que las células CD25<sup>+</sup> sólo representan el 5-6% de las células CD4<sup>+</sup> totales, el aumento en las frecuencias de 6.5<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> podría haber resultado de la conversión de células 6.5<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en células CD25<sup>+</sup> activadas. Dado que los vectores virales pueden escaparse tras la inyección intratímica, esta conversión podría haberse producido tras el reconocimiento de células que expresan HA en la periferia. Por tanto, los inventores analizaron la actividad supresora de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificadas de ratones tratados con vector de lentivirus por su capacidad para prevenir o retrasar la diabetes en ratones transgénicos Ins-HA (figura 13C). Para inducir la diabetes, los inventores inyectaron, a ratones transgénicos Ins-HA irradiados con una dosis subletal, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de ratones TCR-HA y entonces inmunizaron a los ratones con células dendríticas pulsadas con HA. Los inventores encontraron que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> periféricas de ratones a los que se les inyectó el vector que expresa HA presentaban una capacidad notablemente

65

aumentada para prevenir la diabetes, en comparación con las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de los ratones control (figura 13C). De manera colectiva, estos resultados indican que la inyección intratímica de un vector lentiviral que codifica para HA en ratones transgénicos TCR específicos para HA da como resultado un enriquecimiento de Treg específicas para HA en el timo y en la periferia.

5 El hecho de si el aumento de frecuencia de Treg con la expresión tímica del antígeno relacionado corresponde a un aumento de la resistencia de Treg a la selección negativa o a una verdadera selección positiva sigue siendo controvertido. Cuando se expresan antígenos bajo el control del promotor de insulina, por tanto presumiblemente en mTEC, un aumento en el número absoluto de Treg específicas para antígeno se ha observado con HA (este informe) y OVA  
10 (14b), mientras que no con HEL (17b). El aumento de frecuencia de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> específicas para antígeno en este último caso se interpretó como una prueba de la mejor resistencia de Treg a la selección negativa. Sin embargo, la selección negativa en presencia del antígeno relacionado es mucho más pronunciada en el modelo de HEL (una reducción de 40 veces frente a de 2 veces de timocitos específicos para HEL y específicos para HA, respectivamente) y puede enmascarar el efecto de selección positiva. De hecho, las Treg también son susceptibles a la selección negativa cuando se confrontan con niveles altos del antígeno relacionado (16b, 23b). Los inventores sugieren que las  
15 mTEC pueden mediar realmente tanto la selección negativa de células T autorreactivas (24b) como el compromiso de Treg, dependiendo de la avidéz de la interacción de los timocitos en desarrollo y las mTEC. Dado que los inventores observaron que el enriquecimiento de Treg específicas para HA con la expresión de HA tímica comienza en la fase DP, esto puede reflejar un compromiso temprano de los timocitos inmaduros con el linaje de Treg. En conjunto, estos  
20 resultados respaldan que la señal suministrada por el reconocimiento de TCR de un complejo autopéptido-molécula de CMH de clase II ordena a los precursores no comprometidos a diferenciarse en el linaje de Treg.

Aunque la conversión de las células CD25<sup>-</sup> vírgenes en células T reguladoras CD25<sup>+</sup> que expresan foxp3 en la periferia es posible con la estimulación antigénica continua (25b) o la proliferación homeostática en ausencia de un timo (26b), aún no está claro si estas Treg inducidas periféricamente serán tan eficaces o no como las Treg naturales en un entorno terapéutico. En lo que respecta a la autoinmunidad, se reconoce cada vez más que las Treg específicas para antígeno son muy eficaces para prevenir o retrasar los efectos perjudiciales de las respuestas autoinmunitarias. La expansión *in vitro* de Treg específicas para antígeno ha mostrado previamente que representa un medio eficaz para  
30 obtener un gran número de Treg funcionales que pueden prevenir y/o curar la diabetes en ratones NOD (27b, 28b) o en ratones Ins-HA. Los resultados muestran que una simple intervención en el timo es suficiente para desplazar el equilibrio de la diferenciación de las células T hacia un aumento de la generación de Treg y por tanto abre nuevas perspectivas para la intervención terapéutica.

#### 35 4) Materiales y procedimientos

*Ratones.* Se retrocruzaron ratones transgénicos de seis a catorce semanas de edad heterocigotos para el antígeno de hemaglutinina (HA) y el promotor de insulina (Ins-HA) (18b) u homocigotos para un TCR específico para el epítipo HA111-119 (SFERFEIFPK) presentado por moléculas I-E<sup>d</sup> (20b) con un antecedente Balb/c durante más de diez  
40 generaciones y se criaron en condiciones libres de patógenos específicos según las directrices de la Unión Europea.

*Inyecciones intratímicas.* Se anestesiaron los ratones con 30 mg/kg de ketamina (Imalgene, Merial) y 24 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer). El procedimiento quirúrgico se describió anteriormente. En resumen, se hizo visible el timo tras abrir la caja torácica y se inyectaron de 10 a 20  $\mu$ l de disolución madre lentiviral utilizando una jeringa de  
45 300  $\mu$ l (Terumo).

*Vectores lentivirales.* La construcción del vector LvPGK-HA se ha descrito en detalle anteriormente y se deriva del vector LvPGK-GFP (29b). En resumen, se produjeron disoluciones madre de vector lentiviral mediante transfección con fosfato de calcio de tres plásmidos que codificaban para los vectores de expresión de eGFP o HA, la envuelta del virus de la estomatitis vesicular y las proteínas de empaquetamiento en células 293T tal como se describe (30b). Se concentraron los sobrenadantes mediante ultrafiltración utilizando columnas Centricon-plus (Amicon) y se midieron los títulos virales a diferentes diluciones en la línea celular 143B para el vector de expresión de eGFP y con un ELISA de p24 (Zeptomatrix, Buffalo, Nueva York) para ambos vectores. Se utilizaron sólo las disoluciones madre virales con títulos superiores a 10<sup>7</sup> partículas infecciosas por ml (>100 ng/ml de p24) para las inyecciones intratímicas.  
55

*Análisis de citometría de flujo.* Se marcaron las células de órganos desgarrados en PBS que contenía suero de ternero fetal al 3% a temperatura ambiente durante de 15 a 30 min. en la oscuridad con agitación continua. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para el análisis fenotípico: anti-CD4 marcado con alofocianina (RM4-5), anti-CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (clon 53.6.7), anti-CD25 marcado con ficoeritrina (todos de Pharmingen, San Diego, California). Se reveló el marcaje con el AcM anti-clonotípico (clon 6,5) específico para TCR-HA mediante un Ac anti-IgG2b de rata con biotina y estreptavidina-CyChrome (Pharmingen) o directamente con un Ac de cabra anti-IgG de rata marcado con PE (Caltag Laboratories, Burlingame, California). Se utilizaron como controles AcM de isotipo irrelevante (Pharmingen). Al menos 30.000 acontecimientos se recogieron en un FACScalibur (Becton Dickinson, San José, California). Se analizaron los datos utilizando el software FlowJo (TreeStar  
65 Inc., Arshland, Oregon).

*Purificación de células.* Tras la disociación mecánica, se incubaron secuencialmente células del bazo y LN periféricos con cantidades de saturación de mAb anti-CD25 marcado con biotina (7D4, Pharmingen) y microperlas de

## ES 2 320 909 T3

estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) durante 30 min. en hielo, seguido de dos series de columnas LS para obtener la separación magnética de células (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del fabricante. Se realizaron todas las etapas en PBS con suero de ternero fetal al 3%. La pureza de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> clasificadas era del 75-85%. Para la purificación de células dendríticas, se digirieron los bazo de ratones Balb/c con liberasa (1,67 U Wünsh/ml, Boehringer Mannheim) y ADNasa (0,1 mg/ml, Boehringer Mannheim) diluidas en RPMI con bajo contenido en LPS (InVitrogen, Cergy Pontoise, Francia) en una incubadora a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante de 30 min. a una hora. Se filtraron los esplenocitos disociados y se lavaron en 1X PBS libre de LPS (InVitrogen). Se incubaron las células con micropérlas anti-CD11c (Miltenyi Biotec) durante 30 min. en hielo, seguido de separación magnética utilizando columnas LS (Miltenyi Biotec). La pureza de células CD11c<sup>+</sup> era del 95%.

*Inducción de diabetes y monitorización.* Se inyectaron 7,5.10<sup>5</sup> células CD25<sup>-</sup> del bazo y LN de ratones transgénicos para TCR-HA por vía intravenosa, con o sin 5.10<sup>5</sup> células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificadas, en ratones transgénicos para Ins-HA irradiados con 3-Gy. Entonces, se inmunizaron los ratones mediante inyección intravenosa de DC esplénicas, maduras tras el cultivo durante la noche, y pulsadas con el péptido HA<sub>111-119</sub>. Se monitorizaron los niveles de glucosa en sangre cada dos días utilizando un glucómetro (LifeScan Inc.). Se consideró que los ratones eran diabéticos si dos lecturas consecutivas eran superiores a 250 mg/dl.

*Análisis estadístico.* Se realizó la prueba de t no pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95% utilizando GraphPad Prism versión 4.0 para Macintosh (GraphPad Software, San Diego, California). Se consideraron estadísticamente diferentes los valores medios si el valor de p era inferior a 0,05.

*Material complementario en línea.* Se clasificaron los timocitos CD4SP de un ratón TCR-HAxIns-HA de 14 semanas se edad como fracción CD25<sup>+</sup> o CD25<sup>-</sup> en un FACsort (Becton Dickinson) tras la tinción de tres colores con CD4-PE-Cianina 5, CD8-FITC y CD25-PE (Pharmingen). Se extrajo el ARNm total de 5.10<sup>4</sup> células CD25<sup>+</sup> y 10<sup>6</sup> células CD25<sup>-</sup> utilizando RNable (Eurobio, Francia) y se transcribió de manera inversa en ADNc utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (InVitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se amplificó el ADNc de la ciclofilina de una muestra de CD25<sup>+</sup> diluida para obtener una banda de intensidad similar a la de en la fracción CD25<sup>+</sup>. Entonces, se amplificaron los ADNc de foxp3 y ciclofilina en la misma reacción de PCR. Tras la migración en gel de agarosa, se midió la intensidad de las bandas utilizando el programa NIH Image de dominio público (desarrollado en los US National Institutes of Health y disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

### 5) Bibliografía

1b. **Sakaguchi, S.** 2004. Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 22:531-562.

2b. **Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Sautsbury, P.F. Chance y H.D. Ochs.** 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.

3b. **Hori, S., T. Nomura y S. Sakaguchi.** 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.

4b. **Darrasse-Jèze, G., G. Marodon, M. Catala, B. Salomon y D. Klatzmann.** 2004. Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in the human fetus. *Blood In press.*

5b. **Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi y S. Sakaguchi.** 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184:387-396.

6b. **Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka y S. Sakaguchi.** 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162:5317-5326.

7b. **Marodon, G. y B. Rocha.** 1994. Activation and "deletion" of self-reactive mature and immature T cells during ontogeny of Mls-1a mice: implications for neonatal tolerance induction. *Int. Immunol.* 6:1899-1904.

8b. **Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Hohenbeck, M.A. Lerman, A. Najj y A.J. Caton.** 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301-306.

9b. **Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein y H. von Boehmer.** 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-763.

10b. **Klein, L., K. Khazaie y H. von Boehmer.** 2003. *In vivo* dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior *in vitro*. *PNAS* 100:8886-8891.

## ES 2 320 909 T3

- 11b. **Lerman, M.A., J. Larkin, III, C. Cozzo, M.S. Jordan y A.J. Caton.** 2004. CD4+ CD25+ Regulatory T Cell Repertoire Formation in Response to Varying Expression of a neo-Self-Antigen. *J. Immunol.* 173:236-244.
- 12b. **Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki y K. Yamamoto.** 2002. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J. Immunol.* 168:4399-4405.
- 13b. **Walker, L.S.K., A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms y A.K. Abbas.** 2003. Antigen-dependent Proliferation of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells *In Vivo*. *J. Exp. Med.* 198:249-258.
- 14b. **Lohr, J., B. Knoechel, E.C. Kahn y A.K. Abbas.** 2004. Role of B7 in T Cell Tolerance. *J. Immunol.* 173:5028-5035.
- 15b. **Shih, F.F., L. Mandik-Nayak, B.T. Wipke y P.M. Allen.** 2004. Massive Thymic Deletion Results in Systemic Autoimmunity through Elimination of CD4+ CD25+ T Regulatory Cells. *J. Exp. Med.* 199:323-335.
- 16b. **van Santen, H.-M., C. Benoist y D. Mathis.** 2004. Number of T Reg Cells That Differentiate Does Not Increase upon Encounter of Agonist Ligand on Thymic Epithelial Cells. *J. Exp. Med.* 200:1221-1230.
- 17b. **Liston, A., D.H.D. Gray, S. Lesage, A.L. Fletcher, J. Wilson, K.E. Webster, H.S. Scott, R.L. Boyd, L. Peltonen y C.C. Goodnow.** 2004. Gene Dosage-limiting Role of Aire in Thymic Expression, Clonal Deletion, and Organspecific Autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200:1015-1026.
- 18b. **Lo, D., J. Freedman, S. Hesse, R.D. Palmiter, R.L. Brinster y L.A. Sherman.** 1992. Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 22:1013-1022.
- 19b. **Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski y L. Klein.** 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2:1032-1039.
- 20b. **Kirberg, J., A. Baron, S. Jakob, A. Rolink, K. Karjalainen y H. von Boehmer.** 1994. Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J. Exp. Med.* 180:25-34.
- 21b. **Sarukhan, A., A. Lanoue, A. Franzke, N. Brousse, J. Buer y H. von Boehmer.** 1998. Changes in function of antigen-specific lymphocytes correlating with progression towards diabetes in a transgenic model. *Embo J* 17: 71-80.
- 23b. **Bensinger, S.J., A. Bandeira, M.S. Jordan, A.J. Caton y T.M. Laufer.** 2001. Major Histocompatibility Complex Class II-positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of CD4+25+ Immunoregulatory T Cells. *J. Exp. Med.* 194:427-438.
- 24b. **Klein, L., T. Klein, U. Ruther y B. Kyewski.** 1998. CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J. Exp. Med.* 188:5-16.
- 25b. **Apostolou, I. y H. von Boehmer.** 2004. *In Vivo* Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J. Exp. Med.* 199:1401-1408.
- 26b. **Liang, S., P. Alard, Y. Zhao, S. Parnell, S.L. Clark y M.M. Kosiewicz.** 2005. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells *in vivo* requires B7 costimulation, but not the thymus. *J. Exp. Med.* 201:127-137.
- 27b. **Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi y J.A. Bluestone.** 2004. *In Vitro*-expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *J. Exp. Med.* 199:1455-1465.
- 28b. **Tarbell, K.V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy y R.M. Steinman.** 2004. CD25+ CD4+ T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J. Exp. Med.* 199: 1467-1477.
- 29b. **Follenzi, A., L.E. Ailles, S. Bakovic, M. Geuna y L. Naldini.** 2000. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25:217-222.
- 30b. **Marodon, G., E. Mouly, E.J. Blair, C. Frisen, F.M. Lemoine y D. Klatzmann.** 2003. Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood* 101:3416-3423.

6) Leyendas de las figuras

Figura 11. *Diferenciación timocitos específicos para HA en ratones transgénicos para TCR-HAxIns-HA y TCR-HA*. (A) Número absoluto de células específicas para HA ( $6.5^+$ ) en el timo de ratones transgénicos para TCR-HAxIns-HA ( $\tau$ ) y TCR-HA ( $\nu$ ) de catorce semanas de edad. Cada punto representa un único ratón. Los dos valores medios son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (B) Selección de subconjuntos de timocitos basados en la expresión de CD4 y CD8 en ratones transgénicos para TCR-HA. Se indican las frecuencias de la población respectiva en porcentajes de timocitos totales. (C) Expresión superpuesta del TCR ( $6.5^+$ ) transgénico en células CD25<sup>+</sup> de los fenotipos indicados en el timo de ratones transgénicos para TCR-HAxIns-HA (líneas continuas) y TCR-HA (líneas en gris). (D) Frecuencias (porcentajes  $\pm$  DE) de células  $6.5^+$  en células CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>-</sup> dentro de los subconjuntos en 1B (células DP=CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; CD4<sup>int</sup>=CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup>; CD4SP=CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>).

Figura 12. *Número absoluto de células CD25+ en subconjuntos de timocitos de ratones transgénicos para TCR-HAxIns-HA y TCR-HA*. Se calculó el número absoluto de células multiplicando el recuento de células viables totales, tal como se determina mediante exclusión con azul trípango, por las frecuencias de células en cada población sucesiva de interés. Cada punto representa un único ratón. Paneles superiores: número absoluto de células  $6.5^+$ CD25<sup>+</sup> en ratones transgénicos para TCR-HAxIns-HA ( $\sigma$ ) y TCR-HA ( $\lambda$ ) para el subconjunto indicado. Para el número absoluto de  $6.5^+$ CD25<sup>+</sup> en el subconjunto de DP, los valores medios eran estadísticamente diferentes ( $p < 0,01$ ). Los valores p eran todos inferiores a 0,002 para los otros subconjuntos. Paneles inferiores: número absoluto de células  $6.5^+$ CD25<sup>+</sup> en ratones transgénicos para TCR-HAxIns-HA ( $\Delta$ ) y TCR-HA ( $\mu$ ) para el subconjunto indicado. Ninguno de los valores medios era estadísticamente diferente en los tres subconjuntos analizados.

Figura 13. *Generación de novo de células T reguladoras tras la inyección intratímica de vector lentiviral que codifica para HA en ratones transgénicos para TCR-HA*. (A) Representación esquemática del vector lentiviral que codifica para HA. RSV-U3: potenciador/promotor de U3 del virus del sarcoma de Rous; SD: donador de corte y empalme; SA: aceptor de corte y empalme; psi: secuencia de señal de empaquetamiento; ga-RRE: gen gag truncado con el elemento sensible a rev; cppT: tramo de polipurina central; PGK: promotor de fosfo-glicerato cinasa; WPRE: elemento regulador del virus de la hepatitis de la marmota; LTR-SIN: repetición terminal larga de auto-inactivación. (B) Número absoluto de timocitos CD4SP  $6.5^+$ CD25<sup>+</sup> (símbolos en negro) y  $6.5^+$ CD25<sup>-</sup> (símbolos en blanco) en ratones transgénicos para TCR-HA a los que se les inyectaron vectores lentivirales (TCR-HA LvHA) que codifican para HA o que expresan GFP (TCR-HA). (C) Porcentajes de ratones Ins-HA diabéticos tras la transferencia conjunta de células T periféricas CD25<sup>+</sup> de ratones transgénicos para TCR-HA a los que se les inyectaron en el timo vectores lentivirales que expresan HA (línea discontinua) o que expresan GFP (línea continua) 10 días antes. El 100% de los ratones se volvieron diabéticos en el día 10-11 sin transferencia conjunta de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (resultados no publicados). Los datos son los resultados combinados de seis ratones por grupo tratados en dos experimentos separados.

Figura 14. *Evaluación semi-cuantitativa de ARNm de foxp3 en timocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> clasificados de un ratón TCR-HAxIns-HA*. (A) Pureza de timocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (panel superior) y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (panel inferior) clasificados tras la clasificación de células. (B) Se midieron las densidades ópticas de las bandas de PCR utilizando el software Image (NIH) en el subconjunto de timocitos indicado. Se representa la razón de ARNm de ciclofilina de mantenimiento con respecto a ARNm de foxp3 en estas unidades arbitrarias.

TABLA 1

Frecuencias de células T CD4SP específicas para HA del timo y ganglios linfáticos en ratones transgénicos para TCR-HA a los que se les inyectaron vectores lentivirales en el timo.

	TIMO		GANGLIOS LINFÁTICOS	
	CD25 <sup>+</sup>	CD25 <sup>-</sup>	CD25 <sup>+</sup>	CD25 <sup>-</sup>
<b>TCR-HA LvGFP (n=9)</b>	6,5 $\pm$ 2,2	30,7 $\pm$ 3,9	9,1 $\pm$ 2,5	14,3 $\pm$ 2,7
<b>TCR-HA LvHA (n=3)</b>	31,9 $\pm$ 6,0	11,0 $\pm$ 3,0	ND	ND
<b>Efecto a corto plazo</b>				
<b>TCR-HA+LvHA (n=5)</b>	34,7 $\pm$ 16,0	27,0 $\pm$ 3,9	15,1 $\pm$ 2,5	12,2 $\pm$ 2,5
<b>Efecto de largo plazo</b>				

Se muestran las frecuencias (porcentajes)  $\pm$  SD de células  $6.5^+$  en células CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>-</sup> dentro de las células CD4SP T en el timo y ganglios linfáticos de ratones transgénicos para TCR a los que se les inyectó el vector lentiviral (TCR-HA LvHA) que expresaba HA o eGFP- (TCR-HA LvGFP). A ratones de siete a diez semanas de edad se les inyectaron en el timo de 15 a 25 ng de vectores lentivirales y se sacrificaron o bien una semana (efecto a corto plazo) o bien de uno a dos meses (efecto a largo plazo) tras la inyección para el análisis de citometría de flujo. Sólo los ratones TCR-HA LvHA con un mínimo de un aumento de dos veces de la frecuencia de células  $6.5^+$ CD25<sup>+</sup> en células CD4SP en el timo se incluyeron en el análisis (8 de los 10 inyectados). ND; no realizado.

# ES 2 320 909 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de lentivirus para la fabricación de un medicamento que va a administrarse por vía intratímica para la transducción de células del estroma tímico para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios y no propios, y para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

10 2. Utilización según la reivindicación 1 de vectores virales que contienen una secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios y no propios, o para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, estando dicha secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada bajo el control de elementos que dirigen su expresión en células eucariotas.

15 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus, colitis, enfermedades musculares inflamatorias, enfermedades oculares inflamatorias o diabetes tipo 1.

20 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la secuencia de nucleótidos recombinante se selecciona de entre secuencias que codifican para autoantígenos de la mielina, secuencias que codifican para receptores de la acetilcolina y secuencias que codifican para la insulina.

25 5. Utilización según la reivindicación 1, para la prevención o el tratamiento de rechazo de injertos, tal como un órgano sólido, rechazo de trasplantes alogénicos de células o tejidos, rechazo de trasplantes de células madre hematopoyéticas o rechazo de productos terapéuticos transgénicos o corregidos genéticamente.

30 6. Utilización según la reivindicación 5, en la que la secuencia de nucleótidos recombinante se selecciona de entre una secuencia que codifica para un aloantígeno, tal como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad humano seleccionadas de entre el grupo constituido por antígeno leucocitario A2, factor VIII humano, factor IX humano, distrofina y eritropoyetina.

7. Utilización de vectores lentivirales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la dosificación de dichos vectores está comprendida entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas infecciosas por mililitro.

35 8. Células del estroma tímico transformadas, **caracterizadas** porque contienen vectores lentivirales que contienen una secuencia de nucleótidos recombinante predeterminada para la inducción de tolerancia inmunitaria del organismo frente a tejidos, células o productos génicos propios y no propios, tales como vectores lentivirales seleccionados entre los siguientes:

- 40 - vector lentiviral específico de células T que contiene una secuencia que codifica para ZAP-70 de mamífero tal como pRRL.sin.cppt.CD4pME.hZAP-70.IRES.eGFP.pre (SEC ID n°: 2)
- vector lentiviral ubicuo que contiene una secuencia que codifica para HA viral tal como pRRL.sin.cppt.PGK.HA.pre (SEC ID n°: 4)
- 45 - vector lentiviral ubicuo que contiene una secuencia que codifica para la insulina de mamífero tal como pRRL.sin.cppt.PGK.Ins2.GTX.eGFP.pre (SEC ID n°: 1)

estando integrado dicho vector lentiviral de manera estable en su genoma.

50 9. Composiciones farmacéuticas que comprenden células transformadas según la reivindicación 8 en asociación con un vehículo farmacéutico adecuado.

55 10. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 9, adecuadas para la administración intratímica mediante inyección.

60 11. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 9, en las que la dosificación de dichos vectores lentivirales está comprendida entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas infecciosas por mililitro.

60

65

Figura 1



Figura 2

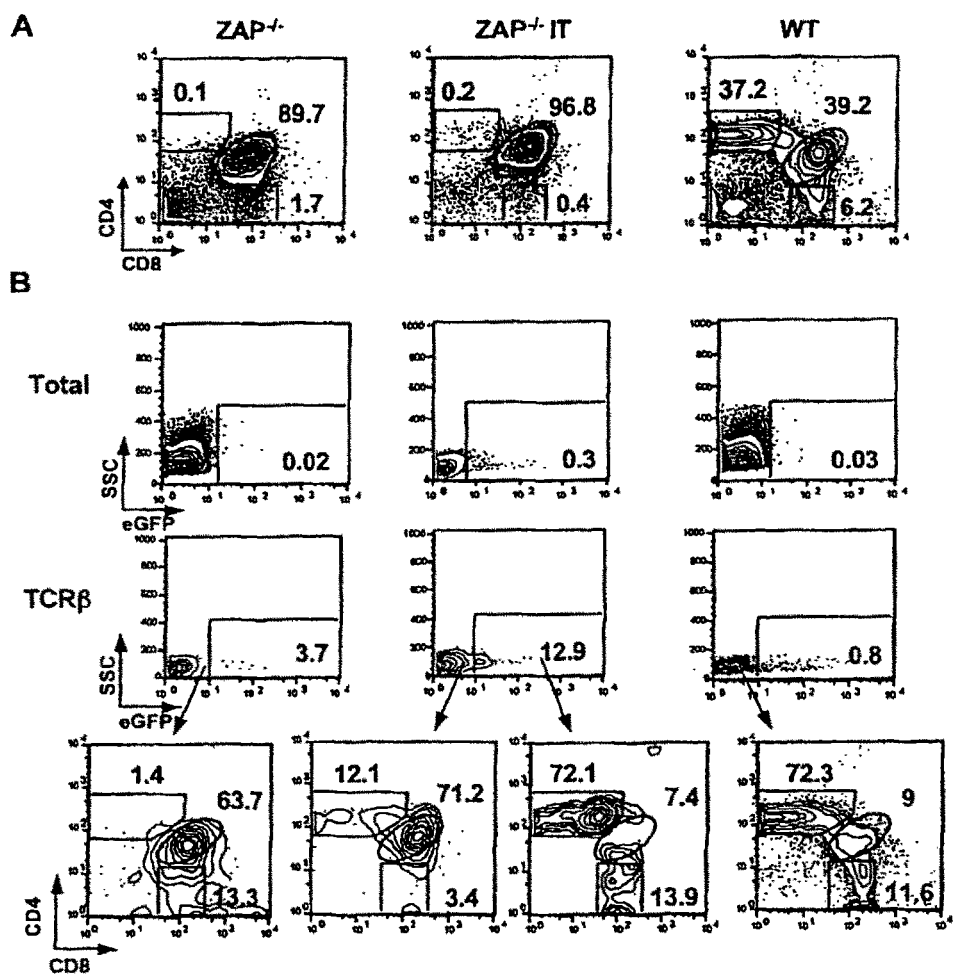


Figura 3

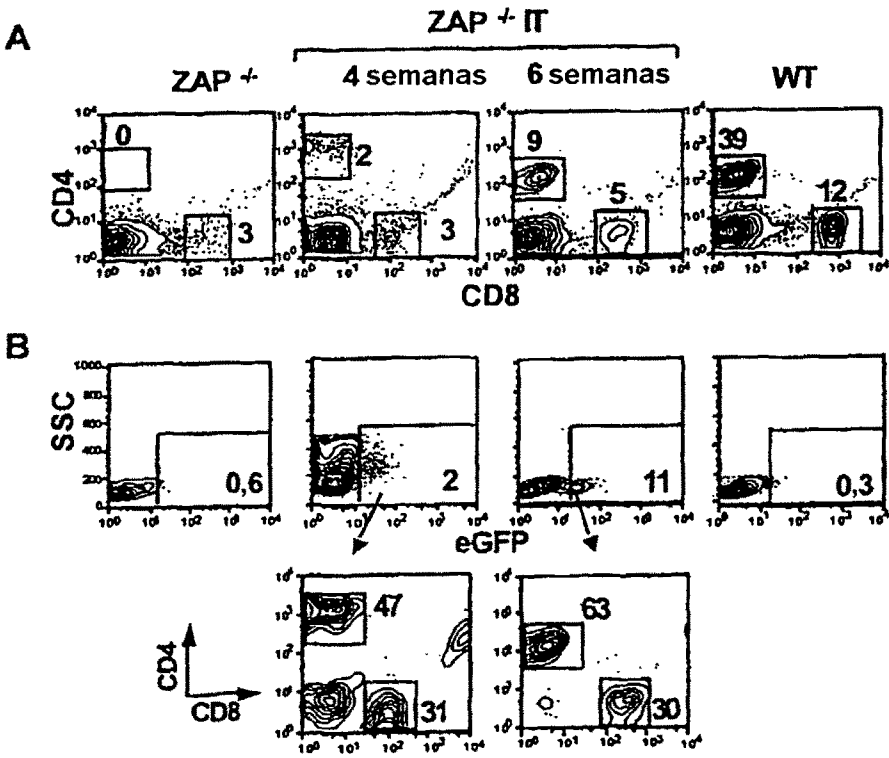


Figura 4

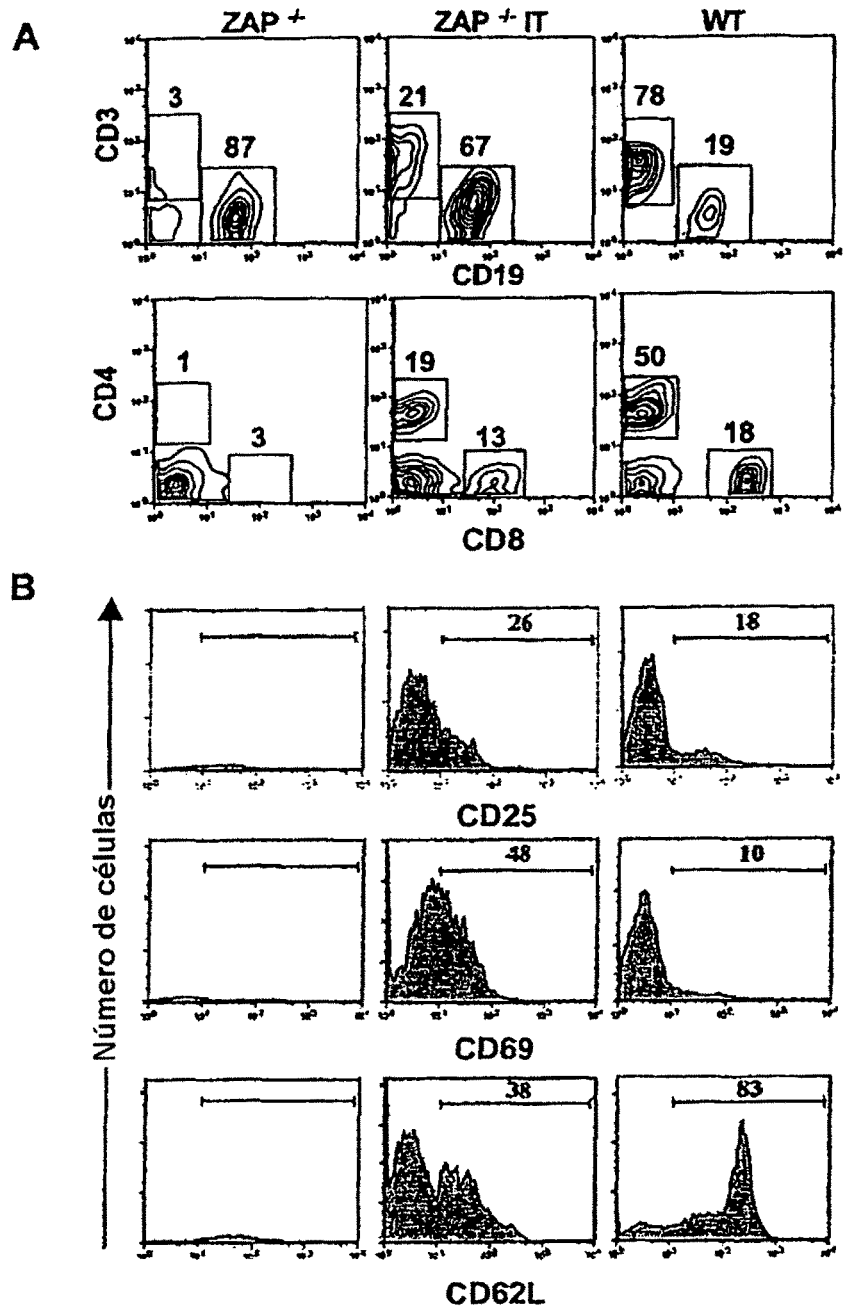


Figura 5

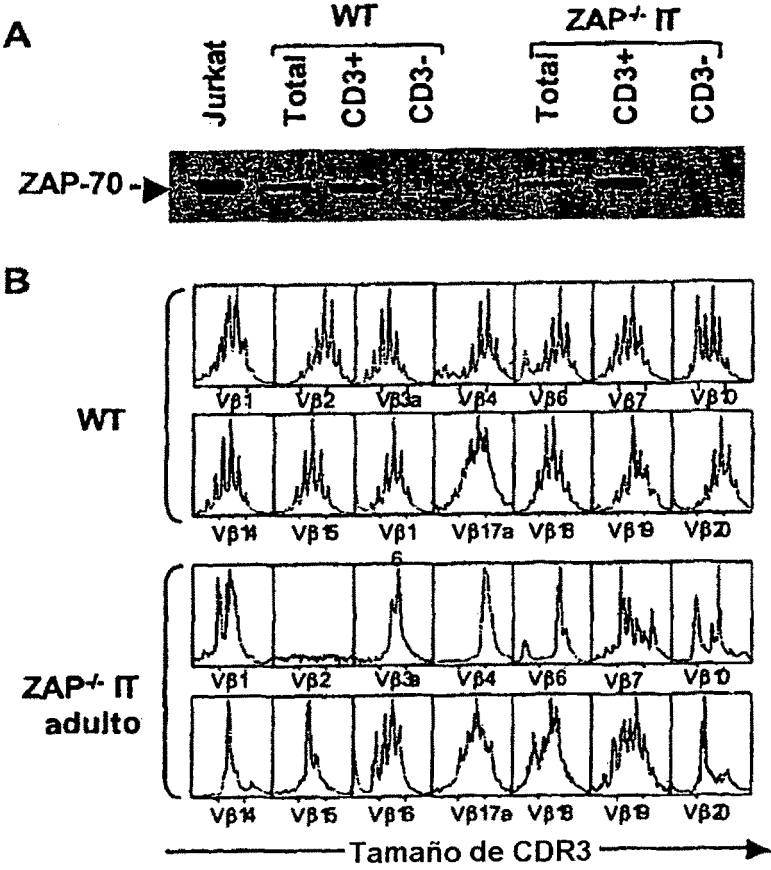


Figura 6

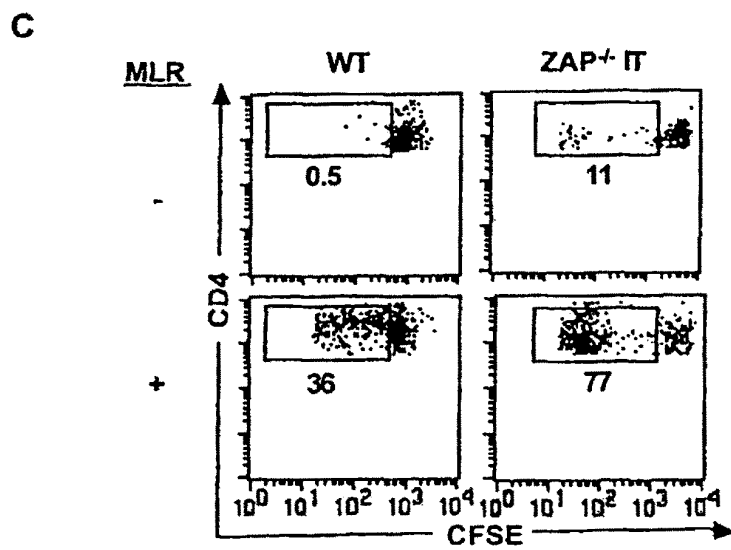
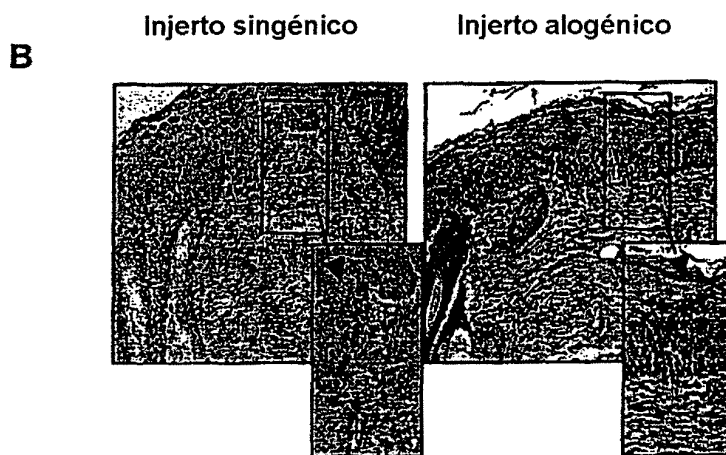
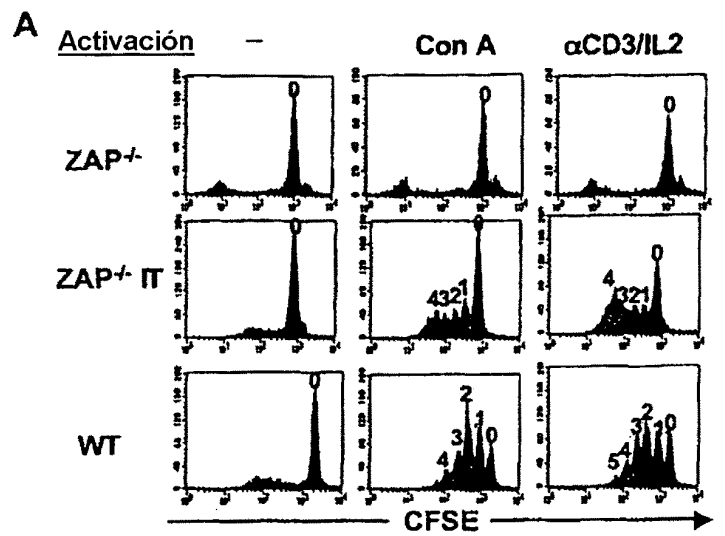
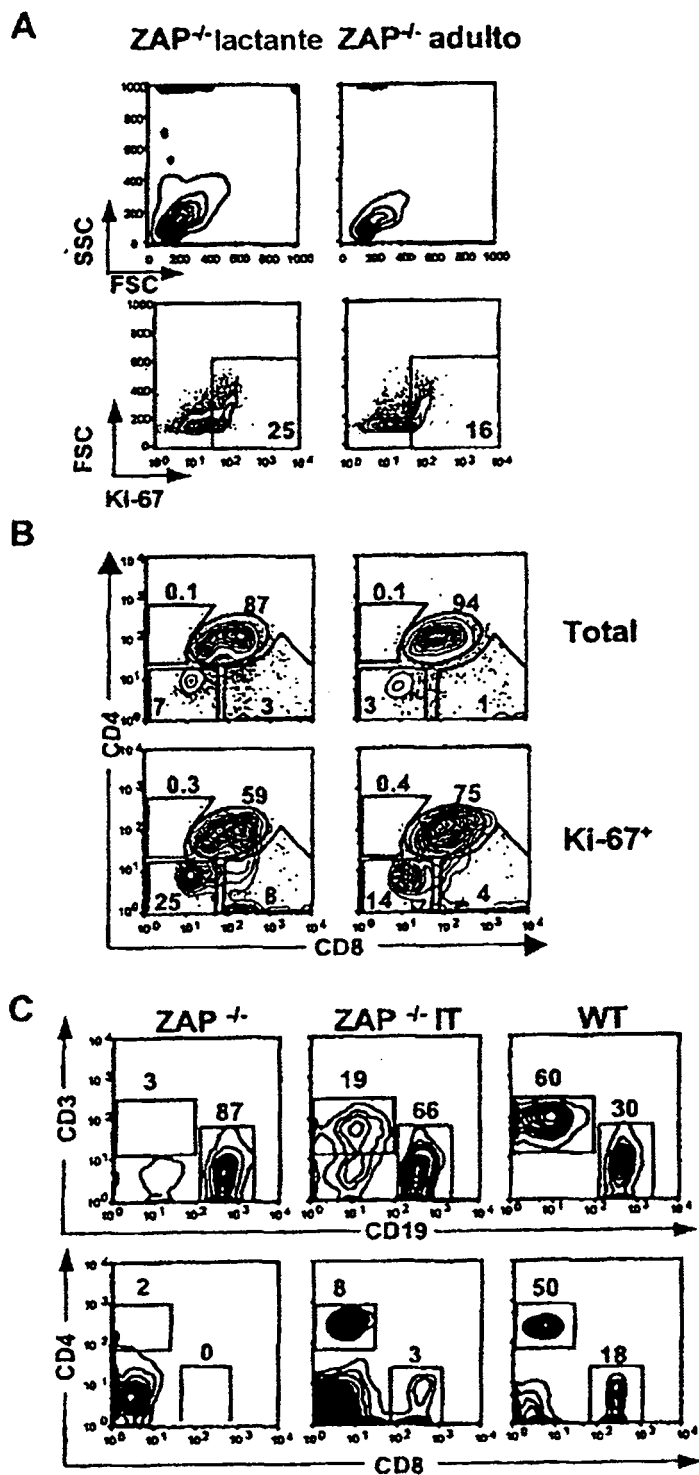


Figura 7



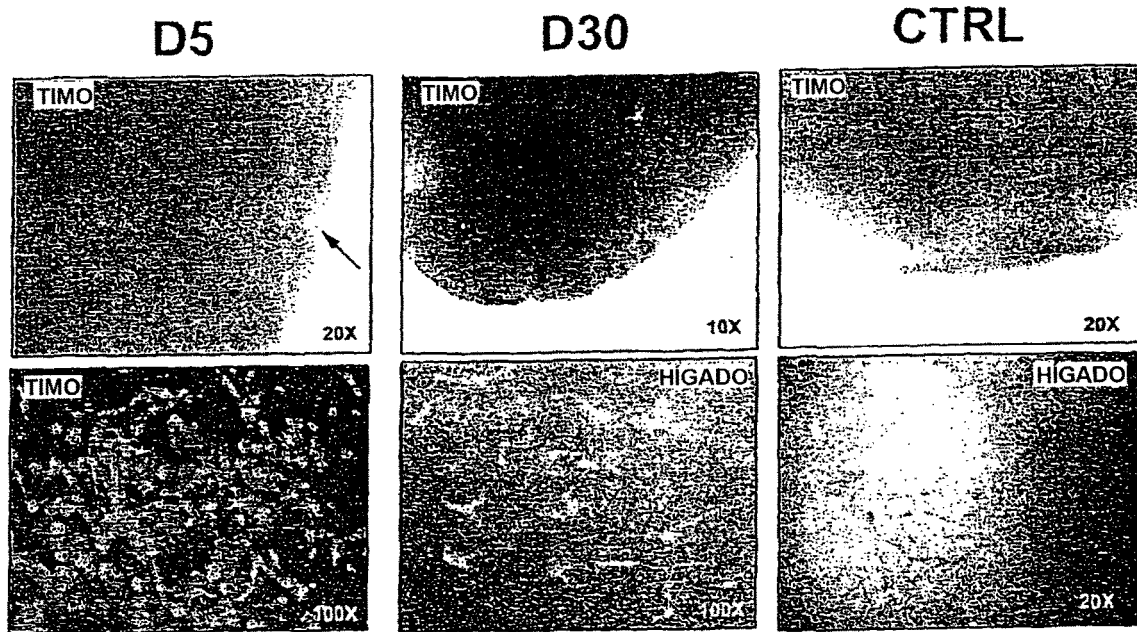


Figura 8

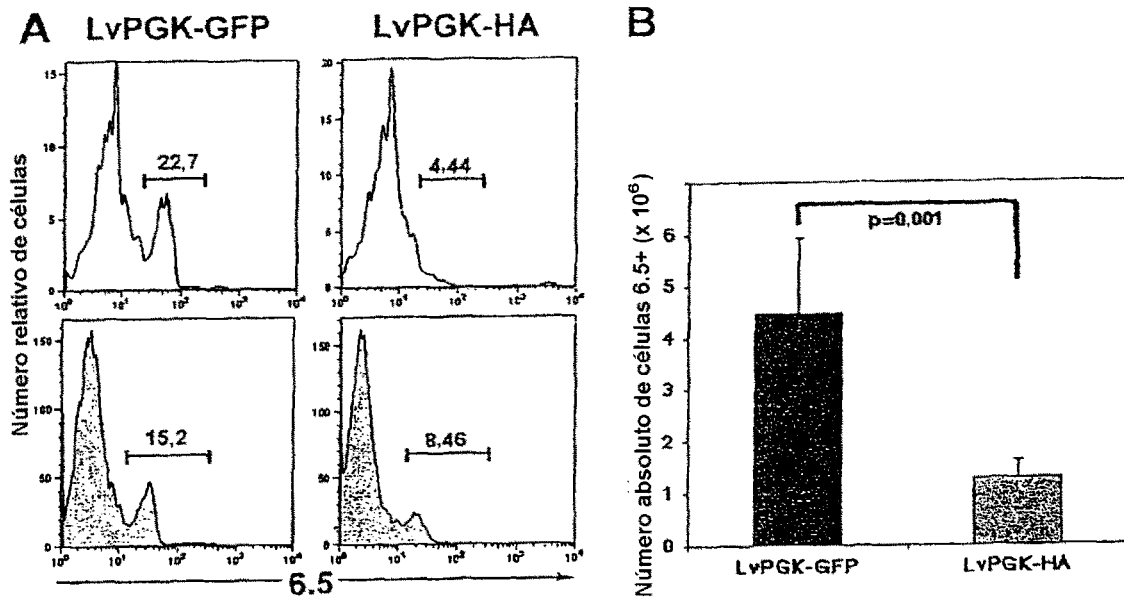


Figura 9

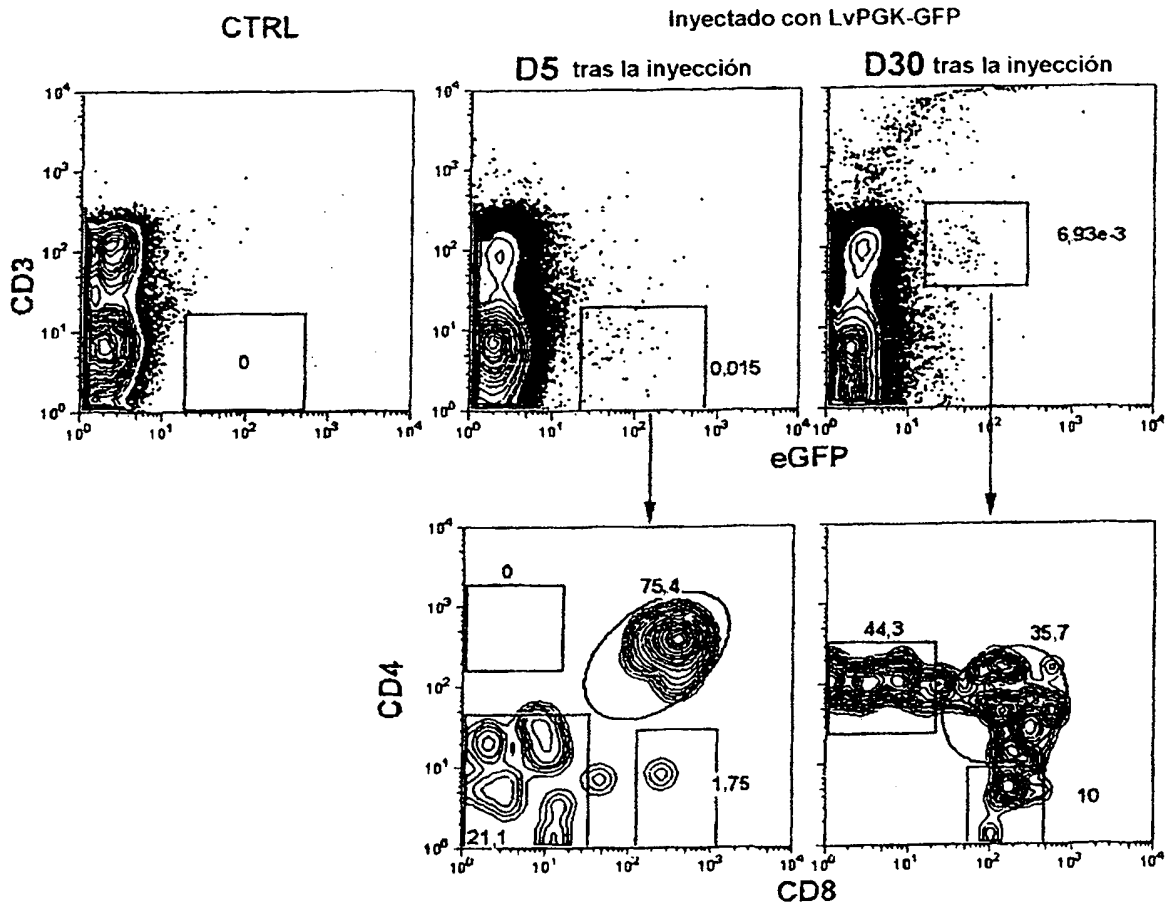


Figura 10

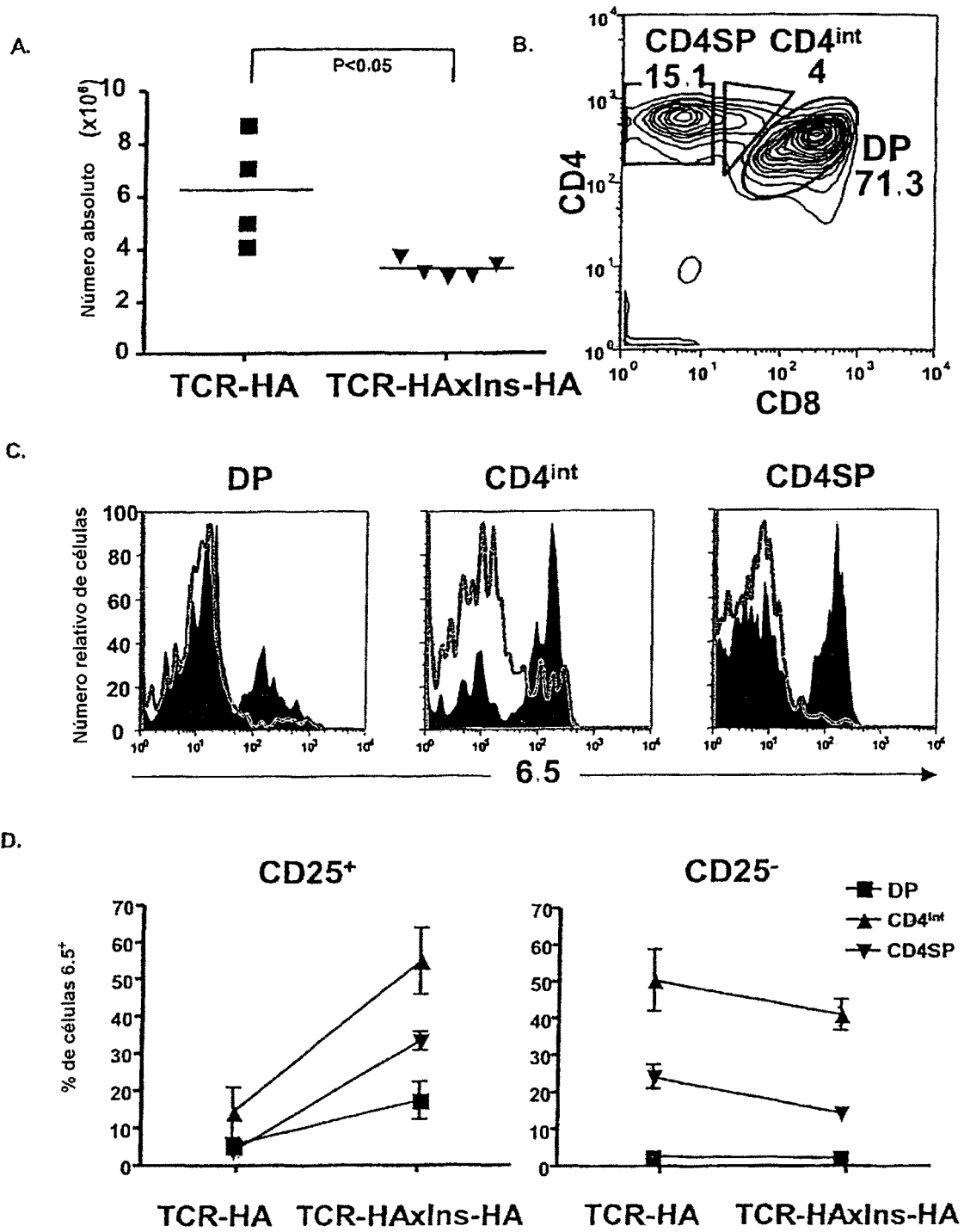


Figura 11



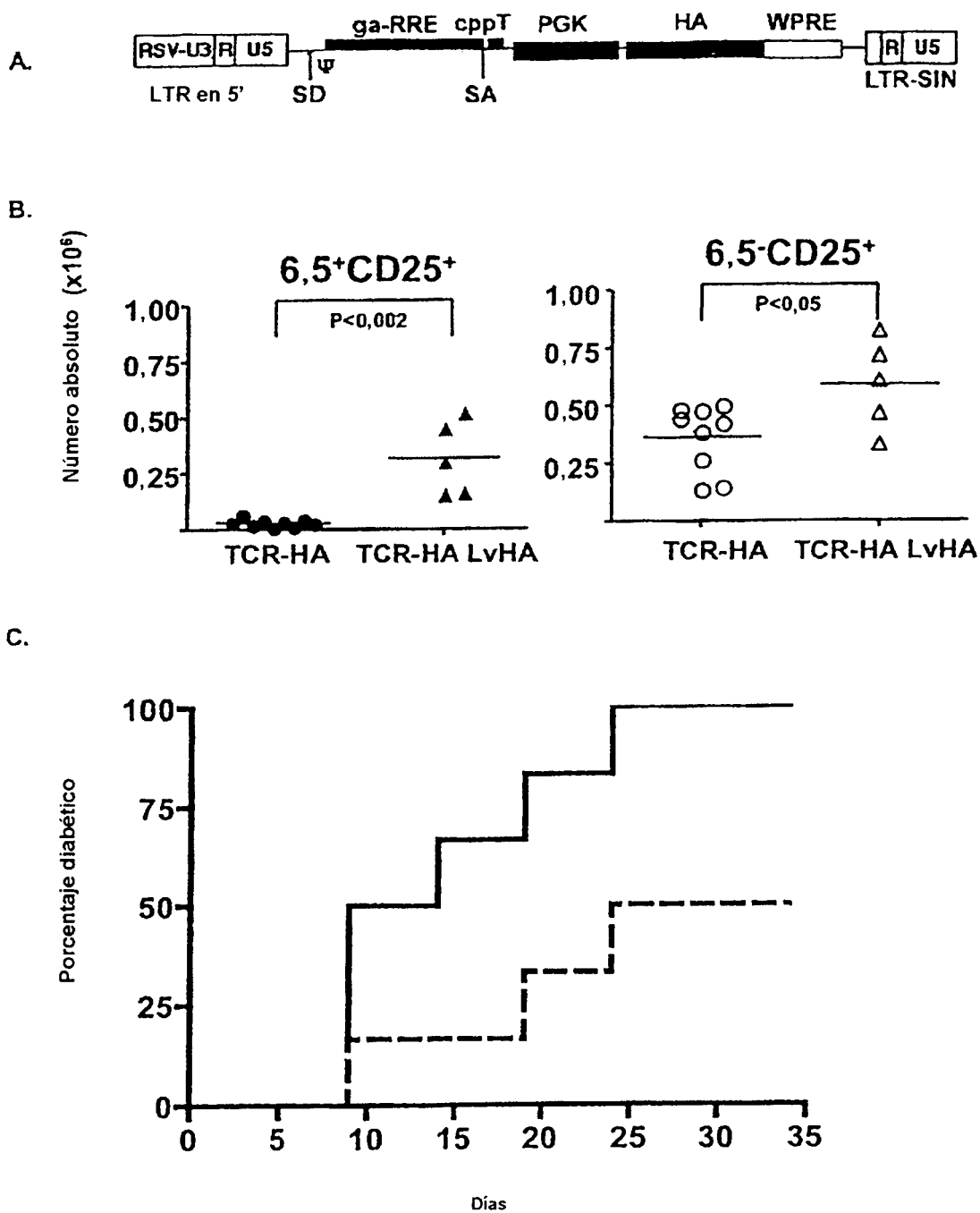


Figura 13

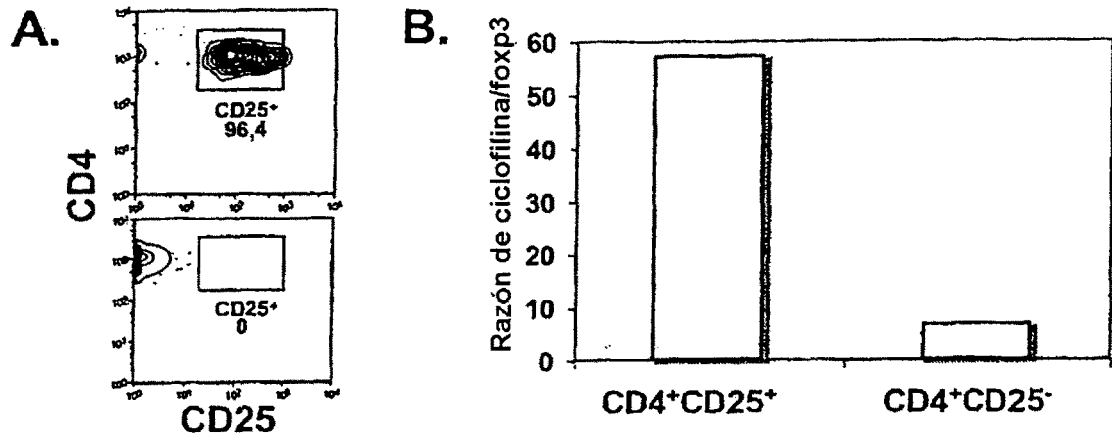


Figura 14