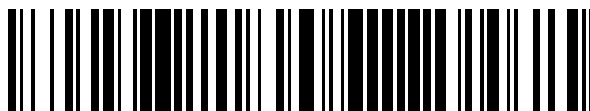


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 873 877**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2013 PCT/US2013/046378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2013 E 13807008 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 2861719**

54 Título: **Composiciones y métodos para disminuir una respuesta inmune**

30 Prioridad:

18.06.2012 US 201261661172 P

26.04.2013 US 201361816497 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2021

73 Titular/es:

OSPEDALE SAN RAFFAELE S.R.L. (33.3%)

Via Olgettina 60

20132 Milano, IT;

YALE UNIVERSITY (33.3%) y

FONDAZIONE TELETHON (33.3%)

72 Inventor/es:

FLAVELL, RICHARD, A.;

GAGLIANI, NICOLA;

GREGORI, SILVIA;

HUBER, SAMUEL;

MAGNANI, CHIARA, FRANCESCA y

RONCAROLO, MARIA, GRAZIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 873 877 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

Composiciones y métodos para disminuir una respuesta inmune

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se descubrieron células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) en sangre periférica de pacientes con inmunodeficiencia combinada grave con quimerismo mixto a largo plazo después de un trasplante de células madre hematopoyéticas de hígado fetal (HSCT) no coincidente con HLA (Roncarolo et al., 1988, J Exp Med 167, 1523-1534; Bacchetta et al., 1994, J Exp Med 179, 493-502). Las células Tr1 tienen una fuerte capacidad inmunosupresora en varias enfermedades inmunomediadas (Roncarolo and Battaglia, 2007, Nat Rev Immunol 7, 585-598; Roncarolo et al., 2011, Immunol Rev 241, 145-163; Pot et al., 2011, Semin Immunol 23, 202-208). La secreción de altos niveles de IL-10 y la destrucción de las células que presentan antígenos mieloides (APCs) a través de Granzima B son los principales mecanismos de supresión mediada por Tr1 (Groux et al., 1997, Nature 389, 737-742; Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662). Hasta la fecha no se han identificado biomarcadores específicos para las células Tr1, lo que limita su estudio y aplicación clínica. Las células Tr1 se distinguen de las células T colaboradoras (T_H)₁, T_H2, y T_H17 por su perfil de citoquinas único y la función reguladora. Las células Tr1 secretan niveles más altos de IL-10 que IL-4 e IL-17, las citoquinas distintivas de las células T_H2 y T_H17, respectivamente. Las células Tr1 también secretan niveles bajos de IL-2 y, dependiendo del medio local de citoquinas, pueden producir niveles variables de IFN- γ , juntos, la clave de citoquinas T_H1 (Roncarolo et al., 2011, Immunol Rev 241, 145-163). FOXP3 no es un biomarcador para las células Tr1 ya que su expresión es baja y transitoria tras la activación. Las células Tr1 que producen IL-10 expresan ICOS (Haringer et al., 2009, J Exp Med 206, 1009-1017) y PD-1 (Akdis et al., 2004, J Exp Med 199, 1567-1575), pero estos marcadores no son específicos (Maynard et al., 2007, Nat Immunol 8, 931-941). CD49b, la subunidad de la integrina α 2 del antígeno de activación muy tardía (VLA) -2, se ha propuesto como marcador para las células T que producen IL-10 (Charbonnier et al., 2006, J Immunol 177, 3806-3813); pero también es expresado por las células T_H17 humanas (Boisvert et al., 2010, Eur J Immunol 40, 2710-2719). Además, las células T CD49b⁺ murinas secretan IL-10 (Charbonnier et al., 2006, J Immunol 177, 3806-3813) pero también citoquinas proinflamatorias (Kassiotis et al., 2006, J Immunol 177, 968-975). El gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), un homólogo de CD4 que se une con alta afinidad a las moléculas del MHC de clase II, se expresa mediante células T CD4⁺ murinas que producen IL-10 (Okamura et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106, 13974-13979), pero también por las células T efectoras activadas (Workman and Vignali, 2005, J Immunol 174, 688-695; Bettini et al., 2011, J Immunol 187, 3493-3498; Bruniquel et al., 1998, Immunogenetics 48, 116-124; Lee et al., 2012, Nat Immunol 13, 991-999) y por células T reguladoras de FOXP3⁺ (Tregs) (Camisaschi et al., 2010, J Immunol 184, 6545-6551). Recientemente se demostró que las células Tr1 humanas expresan CD226 (DNAM-1), que está implicado en la destrucción específica de APCs mieloides (Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662). En general, no se ha confirmado que ninguno de los marcadores mencionados anteriormente sea selectivo para las células Tr1.

Los enfoques clínicos basados en células Tr1 todavía están muy limitados por la incapacidad de transferir una población pura de estas células. Además, una alta frecuencia de células Tr1 se ha correlacionado con un resultado positivo después del HSCT (Bacchetta et al., 1994, J Exp Med 179, 493-502; Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426), pero la ausencia de marcadores adecuados ha hecho imposible el cribado clínico de este tipo de células Tr1. Por lo tanto, la disponibilidad de biomarcadores específicos de las células Tr1 facilitaría la transición de las terapias dirigidas a las células Tr1 del laboratorio al paciente.

El documento de Patente WO2005/046729 describe poblaciones de células T (Tr1) reguladoras de tipo 1 y los usos de las mismas. Se muestra que las células expresan los marcadores de superficie celular CD4 y CD49b.

Okamura et al., EP-A1 2 650 361 y Gregori et al. describen poblaciones de células reguladoras T (Tr1) de tipo 1 y usos de las mismas. Se muestra que las células expresan los marcadores de superficie celular CD4 y LAG-3.

Strauss et al., describen que las células Tr1 son CD4⁺, CD25^{bajo} y Foxp3^{bajo}.

El documento de Patente WO2010/095043 describe el uso médico de las células Tr1 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos para identificar y purificar células Tr1. La presente invención satisface esta necesidad insatisfecha.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención descrita en la presente memoria se basa en parte en el descubrimiento de que las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) expresan marcadores de superficie celular particulares que permiten su selección, enriquecimiento, aislamiento, purificación y administración.

En una realización, la invención es un método para aislar una población enriquecida de células Tr1 de una muestra biológica de un sujeto que incluye las etapas de obtener una muestra biológica de un sujeto que contiene células T y aislar células de la muestra biológica del sujeto que expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3 y que son CD45RA negativos. El método también puede incluir la etapa adicional de eliminar las células que

expresan altos niveles de Foxp3 de la población enriquecida de células Tr1. En algunas realizaciones, el método incluye la etapa adicional de aislar células de la muestra biológica del sujeto que expresan el marcador de superficie celular CD226. En algunas realizaciones, las células expresan el marcador de superficie celular CD226 a un nivel mayor que el nivel de CD226 expresado por una población de células comparadoras. En una realización, la población de células comparadoras es al menos una seleccionada del grupo que consiste en células T CD49b-LAG-3- y células TH0. En algunas realizaciones, más del 90% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3. En algunas realizaciones, más del 95% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3. En algunas realizaciones, más del 98% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3. En algunas realizaciones, más del 99% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3. En una realización, la etapa de aislar células de la muestra biológica del sujeto emplea el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie celular. En varias realizaciones, el marcador de superficie celular es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en CD4, CD49b y LAG-3. En algunas realizaciones, la etapa de células de la muestra biológica del sujeto emplea el uso de la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En varias realizaciones, la muestra biológica es al menos una seleccionada del grupo que consiste en sangre, médula ósea, sangre del cordón, linfa, timo y bazo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se comprenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que son actualmente preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La Figura 1, que comprende de la Figura 1A a la Figura 1D, representa los resultados de experimentos que demuestran la identificación de CD49b, LAG-3 y CD226 mediante el perfil de expresión génica de los clones de células Tr1 humanas. Los clones de las células Tr1 y TH0 se aislaron de sangre periférica de 2 donantes sanos (HDs). El mRNA de clones de células T no estimulados (t0, n = 4 clones de células Tr1 y n = 10 clones de células TH0) o estimulados con mAbs anti-CD3 inmovilizado y anti-CD28 soluble (6h y 16h, n = 4 clones de células Tr1 y n = 5 clones de células TH0) como aislado. La expresión diferencial de 28869 genes se investigó mediante chips Affymetric de transcripción completa. Figura 1A: Después de la normalización de datos mediante el protocolo estándar Robust Multichip Analysis (RMA) y el análisis estadístico (prueba t de welch sin the False Discovery Rate, FDR, corrección), las poblaciones de células Tr1 y TH0 se compararon en los tres puntos de tiempo. Se muestran los valores de expresión normalizados para perfiles que comparan directamente clones de células Tr1 frente a TH0 a t0, 6h y 16h. Figura 1B-1C: mapas de calor bidimensionales de genes expresados diferencialmente (DEGs) que codifican proteínas de membrana en Tr1 en comparación con clones de células TH0. Se muestra el mapa de calor de DEGs en Tr1, en comparación con clones de células TH0, en los tres puntos de tiempo (t0, t6h y t16h) (Figura 1B) y a las 6h y 16h (Figura 1C). Los genes rojos se expresan a niveles más altos en comparación con las intensidades de señal medias en todos los experimentos, mientras que los genes regulados posteriormente están en verde y en negro son intensidades de señal cercanas al nivel de expresión medio. Las filas se escalan para tener una media de cero y una desviación estándar de uno. Se indican el nombre del gen y el símbolo del gen. (Figura 1D) Expresión de CD49b, LAG-3 y CD226 medida por citometría de flujo en clones de células Tr1 y TH0. Se presentan los porcentajes de CD49b+, y de LAG-3+, y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD226 en clones de células Tr1 y TH0. $P = ** p \leq 0,005$, **** $p < 0,0001$.

La Figura 2, que comprende de la Figura 2A a la Figura 2C, representa los resultados de experimentos que demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 identifica células Tr1 humanas *in vivo* en donantes sanos. Figura 2A: Expresión de CD49b y LAG-3 (controlada en células T CD4+CD45RA-) en sangre de HDs. Se presentan gráficos de puntos de 1 donante representativo de 23 donantes (paneles izquierdo y medio); se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Se muestran los porcentajes de células T CD49b+LAG-3-, CD49b+LAG-3+ y CD49b+LAG-3+ de cada donante analizado (panel derecho). Figura 2B: Niveles de concentración de IL-10, IL-4, IFN- γ e IL-17 en sobrenadantes de cultivo de las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas estimuladas con anticuerpos a CD3 y CD28. Media $\pm$ SEM; n = 9 (IL-10, IL-4 e IFN- γ) y n = 4 (IL-17). Se muestran las proporciones de IL-10 frente a IL-4, IFN- γ e IL-17 en 1 donante representativo de 9 analizados para IL-10/IL-4 e IL-10/IFN- γ , y 4 analizados para IL-10/IL-17. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 2C: supresión mediada por las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas. Se muestra un experimento representativo de 6 (panel izquierdo) y los porcentajes de supresión en 6 experimentos independientes (panel derecho). $P = * p \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$.

La Figura 3, que comprende de la Figura 3A a la Figura 3D, representa los resultados de experimentos que demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 identifica las células Tr1 en ratones tratados con anti-CD3. Se aislaron células T del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3. Figura 3A: Expresión de CD49b y LAG-3 medida en células T CD4+TCR β +Foxp3^{RFP}-IL-10^{eGFPbrillante} o IL-10^{eGFP-} (panel izquierdo). Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Se muestran las frecuencias (media $\pm$ SEM) de células que co-expresan CD49b y LAG-3 entre células Tr1 (definidas como CD4+TCR β +Foxp3^{RFP}-IL-10^{eGFPbrillante}) y células T CD4+IL-10- (definidas como CD4+TCR β +IL-10^{eGFP-}) obtenidas en 5 experimentos independientes (panel derecho). $P = ** p \leq 0,005$. Figura 3B: frecuencia de IL-10^{eGFP} y MFI en las poblaciones de células T indicadas (controladas por CD4+TCR β +Foxp3^{RFP}) aisladas del intestino delgado

de ratones tratados con anti-CD3. Se muestran gráficos de puntos representativos de 1 experimento de 5 (panel izquierdo). En cada experimento se combinaron de 2 a 5 ratones. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Se muestra el MFI para las células T IL-10^{eGFP+} en las poblaciones de células T indicadas (panel derecho). Figura 3C: Se muestra la media $\pm$ SEM de las frecuencias de células IL-10^{eGFP+} entre las poblaciones de células T indicadas obtenidas en 5 experimentos independientes. ** $P \leq 0,005$. Figura 3D: se muestran los niveles de concentración de IL-10, IL-4, IFN- γ e IL-17A en sobrenadantes de cultivo de las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas (controladas por CD4⁺TCR β +Foxp3^{RFP}) del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3. Se muestra (Media $\pm$ SEM) y las proporciones de IL-10 frente a IL-4, IFN- γ e IL-17A en 1 experimento representativo de 3. En cada experimento, las células aisladas de 5 ratones se combinaron antes de la clasificación por FACS. Cada experimento contiene al menos 3 réplicas de la misma muestra para cada población. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes.

La Figura 4, que comprende de la Figura 4A a la Figura 4E, muestra los resultados de los experimentos que demuestran la actividad reguladora *in vitro* e *in vivo* de células T CD4⁺ CD49b⁺ LAG-3⁺ murinas. Figura 4A: Supresión mediada por las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas aisladas del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3. Se muestra un experimento representativo de 3 (panel izquierdo) y la media $\pm$ SEM de los porcentajes de supresión en 3 experimentos independientes (panel derecho). $P = ** p \leq 0,005$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 4B: las células eT_H17 (CD4⁺ TCR β +Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}+) se aislaron del colon y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones RAG1^{-/-} inyectados con células T CD4⁺CD45RB^{Alto} aisladas de ratones de reporteros doble Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}. Las poblaciones de células T indicadas se aislaron del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3 y se inyectaron i.p. en combinación con eT_H17 (relación 1: 1) en ratones RAG1^{-/-}. Figura 4C: Imágenes endoscópicas (paneles superiores) e histológicas (paneles inferiores) representativas. Se midió la puntuación de colitis por endoscopia (Figura 4D), por pérdida de masa (Figura 4E). Cada punto representa 1 ratón. Las líneas indican la media $\pm$ SEM. ** $P \leq 0,005$ y *** $P \leq 0,0005$.

La Figura 5, que comprende de la Figura 5A a la Figura 5F, representa los resultados de experimentos que demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 es específica para las células Tr1 murinas. Figura 5A: Expresión de CD49b y LAG-3 medida en células CD4⁺ TCR β IL-4^{eGFP}+(T_H2), CD4⁺TCR β +Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}+(T_H17) y CD4⁺TCR β +Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}-(Tregs Foxp3⁺) aisladas de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones IL-4^{eGFP} y Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP} 10 días después de la infección por *N. brasiliensis*. Se muestran los gráficos de puntos de 1 experimento representativo de 3. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Figura 5B: Expresión de CD49b y LAG-3 en células T CD4⁺TCR β +Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} brillante aisladas de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} infectados con *N. brasiliensis*. Se muestran los gráficos de puntos de 1 experimento representativo de cada 4. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Figura 5C: Media $\pm$ SEM de frecuencias de células que co-expresan CD49b y LAG-3 entre las células T indicadas aisladas de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones infectados (n = 5 para cada grupo). *** $P \leq 0,0005$. Figura 5D: Frecuencias de células T CD4⁺IL-10^{eGFP} y MFI de IL-10^{eGFP} en las poblaciones de células T indicadas (controladas por CD4⁺TCR β +Foxp3^{RFP}) de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} 10 días después de la infección por *N. brasiliensis*. Se muestran los gráficos de puntos de 1 experimento representativo de cada 4. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Figura 5E: Media $\pm$ SEM de las frecuencias de células IL-10^{eGFP} entre las poblaciones de células T indicadas aisladas de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} infectados (n = 5 para cada grupo). * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,0005$. Figura 5F: Supresión mediada por las poblaciones de células T clasificadas por FACS indicadas de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} infectados. Se muestra un experimento representativo de 3 (panel izquierdo) y la media $\pm$ SEM de los porcentajes de supresión obtenidos en 3 experimentos independientes (panel derecho). * $P \leq 0,05$ y ** $P \leq 0,005$.

La Figura 6, que comprende de la Figura 6A a la Figura 6F, representa los resultados de experimentos que demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 permite la selección de células Tr1 humanas *in vitro* y la enumeración de células Tr1 *in vivo* en sujetos tolerantes. Figura 6A: Porcentajes de células CD49b⁺LAG-3⁻, CD49b⁺LAG-3⁺ y CD49b⁺LAG-3⁺ en Tr1 (pTr1) y líneas celulares T_H0 polarizadas con APC artificial. ** $P \leq 0,005$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 6B: Porcentajes de células CD49b⁺LAG-3⁻, CD49b⁺LAG-3⁺ y CD49b⁺LAG-3⁺ en líneas celulares pTr1 (DC-10) y T (mDC) polarizadas con DC. ** $P \leq 0,005$ y *** $P \leq 0,0005$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 6C: Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de líneas celulares pTr1 y de células T CD49b⁺LAG-3⁺ clasificadas con FACS a partir de células pTr1 (CD49b⁺LAG-3⁺ pTr1). Media $\pm$ SEM (n = 4). * $P \leq 0,05$. Figura 6D: supresión mediada por células pTr1 y células T CD49b⁺LAG-3⁺ clasificadas a partir de células pTr1 (CD49b⁺LAG-3⁺pTr1). Se muestra un experimento representativo de 5 (panel izquierdo) y los porcentajes de supresión en 5 experimentos independientes (panel derecho). ** $P \leq 0,005$. Figura 6E: Expresión de CD49b y LAG-3 (controlada en células T CD4⁺CD45RA⁻) en sujetos con quimerismo completo (CC) y quimerismo mixto persistente (PMC) después de un HSCT alogénico. Se muestran gráficos de puntos representativos de 1 de 7 CC y 1 de 11 PMC, se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Figura 6F: Porcentajes de células T CD49b⁺LAG-3⁻, CD49b⁺LAG-3⁺ y CD49b⁺LAG-3⁺ en cada donante sano (HD) y sujetos trasplantados analizados. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes.

La Figura 7, que comprende de la Figura 7A a la Figura 7D, representa los resultados de experimentos que demuestran la validación y selección de genes que codifican CD49b, CD226 y LAG-3. Los clones de las células Tr1 y T_H0, se aislaron de sangre periférica de 2 donantes sanos (HDs). Se aisló mRNA de células no estimuladas (t0, n = 4 clones

de células Tr1 y $n = 10$ clones de células T_H0) o estimuladas con mAbs anti-CD3 inmovilizado y anti-CD28 solubles (6h y 16h, $n = 4$ clones de células Tr1 y $n = 5$ clones de células T_H0). Figura 7A: Se muestra la expresión de *IL-10*, *GZB* y *PD1* determinada por la micromatriz de DNA. * P 0.05 y ** P 0.005. Figura 7B: Se muestra la expresión de *CD49b*, *CD226*, y *LAG-3* determinada por la micromatriz de DNA. ** P 0.005. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 7C: Expresión de *CD49b*, *CD226*, y *LAG3* en clones de células T_H0 y Tr1. Después de la normalización a *HPRT* y *B2M*, las cantidades relativas de mRNA de los clones de células T se ajustaron a los niveles de expresión correspondientes de un calibrador (conjunto de líneas de células T $CD4^+$ de 4 HDs). Los números representan unidades arbitrarias. ** P 0.005 y *** P 0.0005. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 7D: células productoras de IL-10 purificadas a partir de las líneas de células pTr1 y T_H0 se estimularon durante 6 h con mAbs anti-CD3 inmovilizados y anti-CD28 solubles. La expresión de los genes indicados se investigó mediante RT-PCR. Después de la normalización a *HPRT*, las cantidades relativas de mRNA de las células T se ajustaron a los niveles de expresión correspondientes de un calibrador (conjunto de líneas de células T $CD4^+$ de 4 HDs). Los números representan unidades arbitrarias. * P 0.05.

La Figura 8, que comprende de la Figura 8A a la Figura 8C, muestra los resultados de experimentos que demuestran que las células T $CD49b^+LAG-3^+$ son $CD25^{low}$ y no expresan FOXP3. Figura 8A: Expresión de CD226 en las poblaciones de células T indicadas en sangre periférica de donantes sanos (HDs). Se reporta la intensidad fluorescente media (MFI) de CD226 expresada en las poblaciones de células T indicadas (controladas por células T $CD4^+CD45RA^-$) (panel izquierdo) y la media $\pm$ SEM de la MFI de CD226 en las poblaciones de células T indicadas en relación con la MFI de CD226 de las células T $CD49b^+LAG-3^-$ obtenidas en 7 donantes (panel derecho). ** P 0.005. Figura 8B: Expresión de CD25 en células T $CD4^+CD45RA^+FOXP3^+$ y células T $CD4^+CD45RA^+CD49b^+LAG-3^+$ y de FOXP3 en células T $CD4^+CD45RA^+CD25^{brillante}$ y células T $CD4^+CD45RA^+CD49b^+LAG-3^+$. Se muestra un donante representativo de cada 4; Los números en los histogramas indican la MFI (controlado en células T $CD4^+CD45RA^+FOXP3^+$ o $CD4^+CD25^{brillante}$ en azul y en células T $CD4^+CD45RA^+CD49b^+LAG-3^+$ en rojo). Expresión de *FOXP3* (normalizado a *HPRT*) se midió por RT-PCR en las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas de sangre periférica de HDs. Se muestra un donante representativo de 3 a 5 y la media $\pm$ SEM de 3-5 donantes independientes. ** P 0.005. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 8C: Se muestra la relación IL-10/IL-4 en las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas activadas con mAbs anti-CD3 inmovilizado y anti-CD28 solubles durante 72 h. Se evaluaron tres de cada 9 donantes.

La Figura 9, que comprende de la Figura 9A a la Figura 9D, representa los resultados de experimentos que demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 identifica células Tr1 murinas en ratones tratados con anti-CD3. Figura 9A: Se muestra la expresión de CD226. MFI de CD226 expresado por las poblaciones de células T indicadas (controladas por las células T $CD4^+TCR\beta^+Foxp3^{RFP^-}$) analizado 4 h después de la segunda inyección de mAb anti-CD3 (panel superior) y MFI de CD226 expresado en las poblaciones de células T indicadas (controladas en las células T $CD4^+TCR\beta^+Foxp3^{RFP^-}$) en relación con la expresión de células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^-$ (panel inferior). * P 0.05. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 9B: Frecuencia de las poblaciones de células T indicadas (controladas por las células T $CD4^+TCR\beta^+Foxp3^{RFP^-}$) a las 4 h (52), 48 h (100) y 96 h (144) después de la segunda inyección de mAb anti-CD3. Figura 9C: Expresión de la *Il10*, *Il4*, *Ilfng*, *Il17a*, *Il2*, *Tnfa* (normalizado a *Hprt*) medido por RT-PCR en las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3. Como controles, se utilizaron células T_H1 ($CD4^+TCR\beta^+IFN-\gamma^{Katushka^+}$), T_H17 ($CD4^+TCR\beta^+IL-17A^{eGFP^+}$) y Treg $Foxp3^+$ ($CD4^+TCR\beta^+Foxp3^{RFP^+}$) aisladas del intestino delgado de ratones de de reporteros $Foxp3^{RFP}IFN-\gamma^{Katushka}$ y $Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}$ inyectados con mAb anti-CD3. La media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. * P 0.05, ** P 0.005, y *** P 0.0005 frente a células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 9D: Las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3 re-estimuladas *in vitro* con mAbs anti-CD3 y anti-CD28 durante 72 h se ensayaron para determinar la producción de citocinas. Se presenta la media $\pm$ SEM de IL-2 y TNF- α y las proporciones de IL-10 frente a IL-2 y TNF- α . Un experimento representativo de 3. En cada experimento, las células aisladas de 5 ratones se agruparon antes de la clasificación con FACS. * p 0,05. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes.

La Figura 10 muestra los resultados de experimentos que demuestran que las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ expresan AhR. La expresión de los factores de transcripción indicados (normalizados a *Hprt*) medido por RT-PCR en las poblaciones de células T clasificadas con FACS indicadas del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3. Como controles, se utilizaron T_H1 ($CD4^+TCR\beta^+IFN-\gamma^{Katushka^+}$), T_H17 ($CD4^+TCR\beta^+IL-17A^{eGFP^+}$) y Tregs $Foxp3^+$ ($CD4^+TCF\beta^+Foxp3^{RFP^+}$) aisladas del intestino delgado de ratones de reporteros $Foxp3^{RFP}IFN-\gamma^{Katushka}$ y $Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}$ inyectados con mAbs anti-CD3. Se muestra la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. * P 0.05, ** P 0.005, y *** P 0.0005 frente a células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes.

La Figura 11 muestra los resultados de experimentos que demuestran que las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ suprimen las respuestas de las células T *in vitro* de una manera dependiente de la dosis. Los ratones de reporteros dobles $Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP}$ se inyectaron i.p. con mAb anti-CD3 a las 0 y 48 h. Las células T $CD4^+TCR\beta^+Foxp3^{RFP}CD49b^+LAG-3^+$ se clasificaron por FACS del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3 4 h después de la segunda inyección y se analizaron para determinar su capacidad para suprimir la proliferación de células T $CD4^+$ respondedoras *in vitro* en las proporciones de células indicadas. Se indican los porcentajes de supresión. Se muestra un experimento representativo de 2.

La Figura 12, que comprende de la Figura 12A a la Figura 12C, muestra los resultados de experimentos que demuestran que la actividad reguladora *in vivo* de células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ murinas dependen de IL-10. Figura 12A: eT_H17 (CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}-17A^{eGFP}+) y las células IL-10R-eT_H17 dominante negativo (DNR eT_H17) se aislaron del colon y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones RAG1^{-/-} inyectados con células T CD4⁺CD45RB^{alto} aisladas de ratones de reporteros dobles Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP} o el dominante negativo IL-10R-Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}. Las células T CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{REP}-CD49b⁺LAG-3⁺ clasificadas por FACS del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3 se transfirieron i.p. en combinación con células eT_H17, o con DNR eT_H17 (relación 1: 1) en ratones RAG1^{-/-}. Se midieron las puntuaciones de colitis endoscópica (Figura 12B) y el cambio en el peso corporal (Figura 12C). Cada punto representa un ratón. Las líneas indican la media ± SEM. *P 0.05, **P 0.005.

La Figura 13, que comprende de la Figura 13A a la Figura 13D, representa los resultados de experimentos que demuestran la actividad reguladora *in vitro* de células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ murinas aisladas del bazo de ratones tratados con anti-CD3. Figura 13A: Se muestra la expresión de LAG-3 y CD49b medida en CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}- en células aisladas del bazo de ratones tratados con anti-CD3 (panel superior) y las frecuencias de las células T CD4⁺IL-10^{eGFP} (controladas por CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}-) en las poblaciones de células T indicadas (panel inferior). Se muestran gráficos de puntos representativos de 1 experimento de 5. En cada experimento se combinaron las células aisladas de 2 a 5 ratones. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Se muestra la MFI para células T IL-10^{eGFP} en las poblaciones de células T indicadas (panel derecho). Figura 13B: Se muestra la media ± SEM de la frecuencia de células IL-10^{eGFP} entre las poblaciones de células T indicadas obtenidas en 3 experimentos independientes. En cada experimento se combinaron de 2 a 5 ratones ***P 0.0005. Figura 13C: Las poblaciones de células T clasificadas por FACS indicadas (controladas por CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}-) del bazo de ratones tratados con anti-CD3 fueron re-estimuladas *in vitro* con mAbs anti-CD3 y anti-CD28 para la producción de citocinas. Se muestra la media ± SEM de IL-10, IFN-γ, IL-17A, IL-2, IL-4. Se muestra un experimento representativo de 3. En cada experimento, las células aisladas de 2 a 5 ratones se combinaron antes de la clasificación por FACS. Cada experimento contiene al menos 2 réplicas de muestra para cada población. *P 0.05 y **P 0.005. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 13D: Las poblaciones de células T clasificadas por FACS indicadas (controladas por CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}-) del bazo de ratones tratados con anti-CD3 se probaron en un ensayo supresor en presencia o ausencia de mAbs anti-IL-10R. Se reportan los porcentajes de supresión mediada por las poblaciones de células T indicadas. *P 0.05, **P 0.005.

La Figura 14, que comprende de la Figura 14A a la Figura 14E, representa los resultados de los experimentos que demuestran que las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ murinas se pueden aislar de ratones infectados por *N. brasiliensis*. Figura 14A: Se muestran los números de células totales que se infiltran en los pulmones en diferentes momentos durante la infección (Media ± SEM). Ratones por puntos de tiempo: día 0, n = 7; día 5, n = 4; día 7, n = 5; día 10, n = 7; día 16, n = 5. Figura 14B: Se muestran las frecuencias de células Ly6G entre las células CD45⁺ que se infiltran en el pulmón en diferentes momentos durante la infección (Media ± SEM). Ratones por puntos de tiempo: día 0, n = 3; día 5, n = 3; día 7, n = 3; día 10, n = 3; día 16, n = 3. Figura 14C: Expresión de CD49b y LAG-3 medida en células (T_H2) CD4⁺TCRβ⁺IL-4^{eGFP}+, (T_H17) CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP}+, (Tregs Foxp3⁺ Tregs) CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}IL-17^{eGFP}γ (Tr1) CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} + aisladas de los pulmones de ratones de reporteros IL-4^{eGFP}, Foxp3^{RFP}IL-17^{eGFP}, Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} infectados con *N. brasiliensis*. Para las células T_H2 y T_H17, se muestran gráficos de puntos representativos de 1 experimento de cada 3. Para células Tregs Foxp3⁺ se muestran los gráficos de puntos representativos de 1 experimento de cada 4. Para las células Tr1, se muestran gráficos de puntos representativos de 1 experimento de 4. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Figura 14D: Expresión de CD49b y LAG-3 en células (eT_H17) CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP} y en células (eT_H1) CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}IFN-γ^{Katushka} aisladas de colon inflamado de ratones RAG1^{-/-} transferidos con células T CD4⁺CD45RB^{alto} aisladas de células Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP} o ratones de reporteros dobles Foxp3^{RFP}IFN-γ^{Katushka}. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Se muestran gráficos de puntos representativos de 1 experimento de cada 3. Figura 14E: Se muestra la media ± SEM de las frecuencias de las poblaciones de células T indicadas obtenidas en 3-4 experimentos independientes. En cada experimento se combinaron de 2 a 5 ratones. ***P 0.0005. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes.

La Figura 15, que comprende de la Figura 15A a la Figura 15C, representa los resultados de experimentos que demuestran que las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ murinas aisladas de ratones infectados con *N. brasiliensis* expresaron altos niveles de IL-10 y AhR. Figura 15A: Expresión de *Il10*, *Il4*, *Il13*, *Gata3*, *Ahr* (en relación con *Hprt*) medido por RT-PCR en las poblaciones de células T indicadas aisladas de ratones de reporteros IL-4^{eGFP} y Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFP} infectados con *N. brasiliensis*. Como control se utilizaron (T_H2) CD4⁺TCRβ⁺IL-4^{eGFP} y (Tregs) CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}+) aislados del pulmón. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes. *P 0.05, **P 0.005 y ***P 0.0005 frente a células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Frecuencias de las poblaciones de células T indicadas (controladas por células T CD4⁺TCRβ⁺Foxp3^{RFP}-) acumuladas en los pulmones (Figura 15B) y en los ganglios linfáticos mediastínicos (Figura 15C) en diferentes puntos de tiempo después de la infección con *N. brasiliensis* de ratones de tipo nativo. Se muestra la media ± SEM. En cada punto de tiempo se probaron de 2 a 5 ratones.

La Figura 16, que comprende de la Figura 16A a la Figura 16C, muestra los resultados de experimentos que demuestran que las células Tr1 diferenciadas *in vitro* co-expresan CD49b y LAG-3. Figura 16A: Expresión de los genes indicados (normalizados a *Hprt*) en células T_H0, iTregs, T_H2, T_H17, T_H1, y Tr1 diferenciadas *in vitro* medidas por RT-PCR. Las células T_H0 se utilizaron como control interno y la expresión de cada gen en cada célula T se normaliza a

las células T_{H0}. Se muestran la media $\pm$ SEM de triplicados. ****P* 0.0005. Cuando no se indica, las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Figura 16B: Se muestra la expresión de CD49b y LAG-3 en las células T indicadas diferenciadas *in vitro* después de 4 días de cultivo. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Se muestran gráficos de puntos representativos de 1 experimento de cada 3. Figura 16C: Se muestra la media $\pm$ SEM de las frecuencias de células que co-expresan CD49b y LAG-3 entre las poblaciones de células T indicadas (*n* = 3 para cada grupo). *** *P* 0.0005.

La Figura 17, que comprende la Figura 17A y la Figura 17B, representa los resultados de experimentos que demuestran que CD49b y LAG-3 se expresan a lo largo del tiempo en las células Tr1 generadas *in vitro*. Las células T CD4⁺ se aislaron del bazo de ratones de tipo nativo y se diferenciaron *in vitro* en células Tr1 con IL-27 y TGF- β . Figura 17A: Después de 5 días las células Tr1 CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺IL-10⁺ se clasificaron mediante FACS y se activaron en presencia de mAbs anti-CD3 y anti-CD28 (panel superior) o anti-CD3, anti-CD28, TGF- β , IL-6 e IL-23 (panel inferior). La expresión de IL-10^{eGFP} y CD49b/LAG-3 se analizó en los puntos de tiempo indicados mediante FACS. Figura 17B: Se cultivaron células Tr1 clasificadas durante 4 días en presencia de anti-CD3, anti-CD28, TGF- β , IL-6 e IL-23. La expresión de IL-10 entre CD49b⁺LAG-3⁺ y CD49b⁻LAG-3⁺ esta reportada.

La Figura 18, que comprende de la Figura 18A a la Figura 18C, muestra los resultados de experimentos que demuestran que tras la transferencia *in vivo*, CD49b y LAG-3 se expresan en las células Tr1 generadas *in vitro*. Las células T CD4⁺ se aislaron del bazo de ratones de tipo nativo y se diferenciaron *in vitro* en células Tr1 con IL-27 y TGF- β . Después de 5 días las células Tr1 CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺IL-10⁺ se clasificaron mediante FACS y se transfirieron a ratones RAG-1^{-/-}. Figura 18A: Cada ratón se inyectó i.p. con 10⁵ células Tr1 y se trató como se muestra en la caricatura. Figura 18B-C: La frecuencia de las poblaciones indicadas se analizó en los puntos de tiempo indicados mediante FACS.

La Figura 19, que comprende la Figura 19A y la Figura 19B, representa los resultados de experimentos que demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 permite la selección de células Tr1 humanas *in vitro*. Figura 19A: Expresión de CD49b y LAG-3 en las líneas celulares pTr1 y T_{H0}. Se presentan gráficos de puntos de 1 donante representativo de 7 donantes probados. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Figura 19B: las células T CD49b⁺LAG-3⁺ se clasificaron mediante FACS a partir de las células pTr1 (DC-10) y se ensayaron para determinar su capacidad para suprimir las células T activadas con mDC (células respondedoras, histograma relleno). Las células pTr1 (DC-10) y las células T CD49b⁺LAG-3⁺ clasificadas a partir de células pTr1 (DC-10) (CD49b + LAG-3⁺ pTr1 (DC-10)) se utilizaron para suprimir la proliferación de células T CD4⁺ autólogas activadas con mDC. Como control, se utilizaron células T (mDC). Se indican los porcentajes de supresión. Se muestra un experimento representativo de 3.

La Figura 20, que comprende la Figura 20A y la Figura 20B, representa los resultados de experimentos que demuestran la sensibilidad y especificidad de la co-expresión de CD49b y LAG-3 en células T CD4⁺CD45RA⁻ humanas. Curvas de característica operativa del receptor empírico (ROC) generadas al comparar sujetos con quimerismo mixto persistente después de un HSCT alogénico (PMC, *n* = 11) con donantes sanos (HDs, *n* = 23) (Figura 20A), o con sujetos con quimerismo completo (CC, *n* = 7) (Figura 20B). El área bajo la curva (AUC) fue 0,900 y 0,916, respectivamente. Un umbral de 3,64% para las células T CD49b⁺LAG-3⁺ dio una sensibilidad del 81,8% y una especificidad del 91,3% cuando se compararon las PMC con las HDs. Un umbral de 2,765% para las células T CD49b⁺LAG-3⁺ dio un 91% de sensibilidad y un 87,5% de especificidad cuando se compararon PMC con CC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa en el descubrimiento de que las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) expresan marcadores de superficie celular particulares que permiten su selección, enriquecimiento, aislamiento, purificación y administración. La capacidad de usar los marcadores particulares descritos en la presente memoria para seleccionar, enriquecer, aislar, purificar y administrar células Tr1 permite métodos mejorados de terapias con Tr1 para tratar una amplia variedad de enfermedades y trastornos.

Se describen métodos para administrar células Tr1 a un sujeto que lo necesite, para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica una respuesta inmunitaria no deseada. Ejemplos de enfermedades y trastornos que se pueden tratar o prevenir con las composiciones y métodos de células Tr1 incluyen, pero no se limitan a, enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades o trastornos autoinmunes y trastornos asociados con el trasplante, tales como el rechazo del trasplante y la enfermedad de injerto contra huésped.

Se describen métodos que comprenden aislar células T que expresan uno o más marcadores selectivos de Tr1. El método de la invención comprende seleccionar células T que expresan los marcadores CD4, CD49b y LAG-3, y que son CD45RA negativos. Preferiblemente, el método de la invención comprende la etapa de aislar células que expresan adicionalmente CD226 (DNAM-1). También se describen métodos que comprenden seleccionar células T que co-expresan CD49b y LAG-3 o seleccionar células T que co-expresan CD49b, LAG-3 y CD226: Las células Tr1 no expresan constitutivamente altos niveles de Foxp3, en comparación con el nivel de Foxp3 en una célula comparadora seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD25^{brillante} y una célula Treg Foxp3⁺. Las células Tr1 también pueden mostrar actividad reguladora dependiente de IL-10.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria puede usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Como se usa en la presente memoria, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (*es decir*, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente" como se usa en la presente memoria cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

Como se usa en la presente memoria, "aliviar" una enfermedad significa reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad.

"Alogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

"Aloantígeno" es un antígeno que difiere de un antígeno expresado por el receptor.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina, que es capaz de unirse específicamente a un epítipo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunoactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1988; Houston et al., 1988; Bird et al., 1988).

El término "antígeno" o "Ag" como se usa en la presente memoria se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de DNA genómico o recombinante. Un experto en la materia comprenderá que cualquier DNA, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmune, codifica por tanto un "antígeno" como se usa ese término en la presente memoria. Además, un experto en la técnica comprenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para provocar la respuesta inmune deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita estar codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede generarse sintetizado o puede derivarse de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no se limita a, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

"Una célula presentadora de antígeno" (APC) es una célula que es capaz de activar células T, e incluye, pero no se limita a, monocitos/macrófagos, células B y células dendríticas (DCs).

El término "célula dendrítica" o "DC" se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos de células morfológicamente similares que se encuentran en tejidos linfoides o no linfoides. Estas células se caracterizan por su morfología distintiva, altos niveles de expresión superficial de MHC de clase II. Las DCs se pueden aislar de varias fuentes de tejidos. Las DCs tienen una gran capacidad para sensibilizar a las células T restringidas por MHC y son muy eficaces para presentar antígenos a las células T in situ. Los antígenos pueden ser autoantígenos que se expresan durante el desarrollo y la tolerancia de las células T, y antígenos extraños que están presentes durante los procesos inmunes normales.

Como se usa en la presente memoria, el término "autólogo" significa que se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que posteriormente se volverá a introducir en el mamífero.

Como se usa en la presente memoria, por "terapia de combinación" se entiende que un primer agente se administra junto con otro agente. "Junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo. Dichas combinaciones se consideran parte de un régimen severo o régimen de tratamiento único.

Como se usa en la presente memoria, el término "administración concurrente" significa que la administración de la primera terapia y la de una segunda terapia en una terapia de combinación se superponen entre sí.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis y en el que, si la enfermedad no mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose. Por el contrario, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

El término "DNA", como se usa en la presente memoria, se define como ácido desoxirribonucleico.

"Antígeno del donante" se refiere a un antígeno expresado por el tejido del donante que se trasplanta al receptor.

10 "Antígeno del receptor" se refiere a un antígeno expresado por el receptor.

Como se usa en la presente memoria, una "célula efectora" se refiere a una célula que media una respuesta inmune contra un antígeno. Un ejemplo de una célula efectora incluye, pero no se limita a, una célula T y una célula B.

Como se usa en la presente memoria, el término "respuesta inmune" incluye respuestas inmunes mediadas por células T y/o mediadas por células B. Las respuestas inmunes ejemplares incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular, y respuestas de células B, por ejemplo, producción de anticuerpos. Además, el término respuesta inmune incluye respuestas inmunes que se ven afectadas indirectamente por la activación de células T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células que responden a citocinas, por ejemplo, macrófagos. Las células inmunes implicadas en la respuesta inmune incluyen linfocitos, tales como células B y células T (células CD4+, CD8+, Th1 y Th2); células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células presentadoras de antígenos profesionales tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans y células presentadoras de antígenos no profesionales tales como queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos); células asesinas naturales; células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

25 "Reacción de linfocitos mixtos", "cultivo de linfocitos mixtos", "MLR" y "MLC" se usan indistintamente para referirse a una mezcla que comprende un mínimo de dos poblaciones de células diferentes que son alotípicamente diferentes. Al menos una de las células alotípicamente diferentes es un linfocito. Las células se cultivan juntas durante un tiempo y en condiciones adecuadas para dar como resultado la estimulación de los linfocitos, incluyendo, por ejemplo, las células Tr1. Un objetivo frecuente de un MLC es proporcionar estimulación alogénica, tal como puede iniciar la proliferación de las células Tr1; pero a menos que se indique, no se requiere la proliferación durante el cultivo. En el contexto adecuado, estos términos pueden referirse alternativamente a una mezcla de células derivadas de dicho cultivo.

Como se usa en la presente memoria, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

35 Por el término "cantidad eficaz", como se usa en la presente memoria, se entiende una cantidad que, cuando se administra a un mamífero, provoca un nivel detectable de supresión o tolerancia inmune en comparación con la respuesta inmune detectada en ausencia de la composición de la invención. La respuesta inmune se puede evaluar fácilmente mediante una gran cantidad de métodos reconocidos en la técnica. El experto en la materia comprenderá que la cantidad de la composición administrada en la presente memoria varía y se puede determinar fácilmente en base a una serie de factores, tales como la enfermedad o afección que se está tratando, la edad y la salud y la condición física del mamífero que se está tratando, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular que se administra y similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido desde o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

45 El término "epítipo", como se usa en la presente memoria, es una porción de un antígeno que puede provocar una respuesta inmune, incluyendo las respuestas de las células B y/o T. Un antígeno puede tener uno o más epítipos. La mayoría de los antígenos tienen muchos epítipos; es decir, son multivalentes. En algunos ejemplos, un epítipo tiene aproximadamente un tamaño de aproximadamente 10 aminoácidos y/o azúcares. Preferiblemente, el epítipo tiene aproximadamente 4-18 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 5-16 aminoácidos, e incluso más preferiblemente 6-14 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 7-12, y lo más preferiblemente aproximadamente 8-10 aminoácidos. Un experto en la técnica entiende que, en algunas circunstancias, la estructura tridimensional, en lugar de la secuencia lineal específica de la molécula, es el criterio principal de especificidad antigénica y, por lo tanto, distingue un epítipo de otro.

El término "expresión" como se usa en la presente memoria se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos.

- El término "vector de expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico que se puede transcribir. En algunos casos, las moléculas de RNA se traducen después en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido, siRNA, ribozimas y similares. Los
- 5 vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones.
- 10 El término "célula T colaboradora", como se usa en la presente memoria, se define como una célula T efectora cuya función principal es promover la activación y funciones de otros linfocitos B y T y/o macrófagos. Muchas células T colaboradoras son células T CD4.
- El término "heterólogo", como se usa en la presente memoria, se define como secuencias de DNA o RNA o proteínas que se derivan de las diferentes especies.
- 15 Como se usa en la presente memoria, "homología" se usa como sinónimo de "identidad".
- El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se usa en la presente memoria, se define como una clase de proteínas que funcionan como anticuerpos. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo principal que está presente en las secreciones corporales, tal como la saliva, las lágrimas, la
- 20 leche materna, las secreciones gastrointestinales y las secreciones mucosas de los tractos respiratorio y genitourinario. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmune principal en la mayoría de los mamíferos. Es la inmunoglobulina más eficaz en la aglutinación, la fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero que puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de
- 25 mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.
- El término "inmunoestimulador" se usa en la presente memoria para referirse al aumento de al menos un parámetro de una respuesta inmune.
- El término "inmunosupresor" se usa en la presente memoria para referirse a la reducción de al menos un parámetro de una respuesta inmune.
- 30 "Diferenciación de Tr1", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier suceso que dé como resultado un aumento detectable en el fenotipo y/o genotipo característico de las células Tr1. Por ejemplo, un fenotipo y/o genotipo característico de las células Tr1 es la co-expresión de CD49b y LAG-3. Otro fenotipo y/o genotipo característico de las células Tr1 es la inmunosupresión.
- A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos"
- 35 incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos frase que codifica una proteína o un RNA también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión un intrón o intrones.
- El término "polinucleótido" como se usa en la presente memoria se define como una cadena de nucleótidos. Además,
- 40 los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos como se usan en la presente memoria son intercambiables. Un experto en la técnica tiene conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden hidrolizarse en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usa en la presente memoria, los polinucleótidos incluyen,
- 45 pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando tecnología de clonación ordinaria y PCR, y similares, y por medios sintéticos.
- El término "polipéptido", como se usa en la presente memoria, se define como una cadena de residuos de aminoácidos, que normalmente tienen una secuencia definida. Como se usa en la presente memoria, el término polipéptido incluye
- 50 mutuamente los términos "péptido" y proteína".
- El término "autoantígeno", como se usa en la presente memoria, se define como un antígeno que es expresado por una célula o tejido huésped. Los autoantígenos pueden ser antígenos tumorales, pero en determinadas realizaciones, se expresan tanto en células normales como en células tumorales. Un experto en la materia comprenderá fácilmente que un autoantígeno puede estar sobreexpresado en una célula.

Como se usa en la presente memoria, "se une específicamente" se refiere al hecho de que un primer compuesto se une preferentemente a un segundo compuesto y no se une en una cantidad significativa a otros compuestos presentes en la muestra.

Como se usa en la presente memoria, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con las que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que se han separado de las células con las que están asociadas de forma natural en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan in vitro. En otras realizaciones, las células no se cultivan in vitro.

Como se usa el término en la presente memoria, "sustancialmente separado de" o "sustancialmente separado" se refiere a la característica de una población de primeras sustancias que se eliminan de la proximidad de una población de segundas sustancias, en la que la población de primeras sustancias no está necesariamente desprovista de la segunda sustancia, y la población de segundas sustancias no está necesariamente desprovista de la primera sustancia. Sin embargo, una población de primeras sustancias que está "sustancialmente separada de" una población de segundas sustancias tiene un contenido considerablemente menor de segundas sustancias en comparación con la mezcla no separada de primeras y segundas sustancias. En algunos ejemplos, la primera sustancia es un tipo particular de célula identificable por su expresión de marcadores de superficie celular.

Una "población" se usa en la presente memoria para referirse a un grupo de células que tienen una característica fenotípica sustancialmente similar.

"Trasplante" se refiere a un tejido, órgano o célula de un donante que se va a trasplantar. Un ejemplo de un trasplante puede incluir, pero no se limita a, células o tejidos de la piel, células hematopoyéticas, médula ósea y órganos sólidos tales como corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.

El término "célula T", como se usa en la presente memoria, se define como una célula derivada del timo que participa en una variedad de reacciones inmunes mediadas por células.

El término "célula B", como se usa en la presente memoria, se define como una célula derivada de la médula ósea y/o del bazo. Las células B pueden convertirse en células plasmáticas que producen anticuerpos.

Como se usa en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de una composición terapéutica suficiente para proporcionar un efecto beneficioso a un mamífero al que se administra la composición.

Como se usa en la presente memoria, "tratar" se refiere a la reducción, alivio o eliminación de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno que se está tratando, por ejemplo, alivio de la disfunción inmune o evitación del rechazo del trasplante, en relación con los síntomas previos al tratamiento. Como se usa en la presente memoria, "tratar" o "tratamiento" incluye tratamientos tanto terapéuticos como profilácticos.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido o virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares.

"Xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

Rangos: a lo largo de esta descripción, se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un rango ha descrito específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango tal como de 1 a 6 tiene subrangos específicamente descritos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Descripción

La presente invención se basa en el hallazgo de que las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) expresan marcadores de superficie celular específicos que permiten su selección, enriquecimiento, aislamiento y purificación. Si bien se conocen en la técnica ciertos métodos para generar células Tr1, hasta ahora todavía no existe un método para producir una población enriquecida de células Tr1 para uso en investigación y métodos terapéuticos clínicos. La capacidad de

usar los marcadores específicos descritos en la presente memoria para seleccionar, enriquecer, aislar y purificar células Tr1 permite métodos mejorados de terapias con Tr1 para tratar una amplia variedad de enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se demuestra en la presente memoria que las células Tr1 seleccionadas, enriquecidas, aisladas y purificadas mediante los métodos de la invención muestran actividades inmunosupresoras tanto in vitro como in vivo.

Se describen métodos para administrar células Tr1 a un sujeto que lo necesite, para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica una respuesta inmune no deseada. Las enfermedades y trastornos ejemplares que se pueden tratar o prevenir con las composiciones y métodos de células Tr1 incluyen, pero no se limitan a, enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades o trastornos autoinmunes y trastornos asociados con el trasplante, tales como el rechazo del trasplante y la enfermedad de injerto frente al huésped. Los ejemplos de enfermedades y trastornos autoinmunitarios e inflamatorios tratables o prevenibles con las composiciones de células Tr1 y los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades y trastornos agudos y crónicos tales como alergia, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enteropatía autoinmune, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, epidermolisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa y colitis ulcerosa. Las composiciones y métodos de células Tr1 se utilizan para tratar a sujetos que han recibido un trasplante, tal como un trasplante de células hematopoyéticas, un trasplante de células madre, un trasplante de médula ósea, un trasplante de sangre de cordón, un trasplante de órganos y células, una transfusión de sangre y similares.

Se describen métodos que comprenden seleccionar células T que expresan uno o más marcadores selectivos de Tr1. El método de la invención comprende seleccionar células T que expresan los marcadores CD4, CD49b y LAG-3, y que son CD45RA negativos. Preferiblemente, el método de la invención comprende la etapa de aislar células que expresan adicionalmente CD226 (DNAM-1). También se describen métodos que comprenden seleccionar células T que co-expresan CD49b y LAG-3 o seleccionar células T que co-expresan CD49b, LAG-3 y CD226. En algunas realizaciones de la invención, el método comprende seleccionar células T como se describió anteriormente, en el que las células T expresan un nivel elevado de CD226, en comparación con el nivel de CD226 en una población de células comparadoras que son células T CD49b⁻ LAG-3⁻, o células T_H0. Las células Tr1 no expresan constitutivamente altos niveles de Foxp3, en comparación con el nivel de Foxp3 en una célula comparadora seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD25brillante y una célula Treg Foxp3⁺. Las células Tr1 también pueden mostrar actividad reguladora dependiente de IL-10. También se describen métodos que comprenden seleccionar células T que expresan uno o más marcadores de Tr1 después de que se activan las células T.

El nivel de células Tr1 en un sujeto puede detectarse detectando el número absoluto, o la cantidad relativa, de células T que expresan los marcadores de Tr1 en una muestra obtenida del sujeto. El método puede comprender detectar las células T que expresan uno o más marcadores de Tr1 seleccionados del grupo que consiste en CD49b, LAG-3 y CD226. Las células Tr1 no expresan constitutivamente altos niveles de Foxp3, en comparación con el nivel de Foxp3 en una célula comparadora seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD25brillante y una célula Treg Foxp3⁺. Las células Tr1 también pueden mostrar actividad reguladora dependiente de IL-10. El método se puede usar para determinar si el sujeto es tolerante o tolera una terapia de trasplante, que incluye, pero no se limita a, un trasplante de células hematopoyéticas, tal como un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). El método también se puede usar para monitorizar el número absoluto o la cantidad relativa de células Tr1 en un sujeto a lo largo del tiempo, lo que permite, de este modo, predecir el riesgo de una respuesta inmune adversa.

Diferenciación de células Tr1

También se describen métodos y composiciones para convertir o diferenciar células T no reguladoras en células Tr1. El método puede comprender convertir células T no reguladoras en células Tr1 que expresan al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD49b, LAG-3 y CD226 (DNAM-1). El método también puede comprender convertir células T no reguladoras en células Tr1 que co-expresan CD49b y LAG-3. Además, el método puede comprender convertir células T no reguladoras en células Tr1 que co-expresan CD49b, LAG-3 y CD226. El método comprende convertir células T no reguladoras en células Tr1 que no expresan constitutivamente altos niveles de Foxp3, en comparación con el nivel de Foxp3 en una célula comparadora seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD25brillante y una célula Treg Foxp3⁺. El método también puede comprender convertir células T no reguladoras en células Tr1 que muestran actividad reguladora dependiente de IL-10.

El método de diferenciar células en células Tr1 incluye la etapa de obtener células T no reguladoras de un sujeto. Las células T no reguladoras del sujeto son células T CD4⁺. Las células T no reguladoras del sujeto también pueden ser células T CD4⁺CD25⁻. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano o un ratón. El método de diferenciar células en células Tr1 puede incluir la etapa de cultivar las células T no reguladoras del sujeto en presencia de células alimentadoras que pueden ser células L. Las células alimentadoras se pueden transfectar con al menos uno de CD32, CD80 y CD58. Las células alimentadoras se pueden transfectar con al menos uno de hCD32, hCD80 y hCD58. El método de diferenciar células en células Tr1 también puede incluir la etapa de cultivar las células T no reguladoras del sujeto en presencia de mAb anti-CD3. El método de diferenciar células en células Tr1 también puede incluir la etapa

de cultivar las células T no reguladoras del sujeto en presencia de IL-2, tal como rhIL-2. El método de diferenciar células en células Tr1 también puede incluir la etapa de cultivar las células T no reguladoras del sujeto en presencia de IL-15, tal como rhIL-15. Las células Tr1 diferenciadas pueden estar polarizadas. Las células Tr1 diferenciadas se pueden polarizar cultivando las células Tr1 diferenciadas en presencia de al menos uno de IL-10, tal como rhIL-10, e IFN α -2b, tal como rhIFN α -2b.

También se describen métodos y composiciones para la conversión y expansión ex vivo de células Tr1 a partir de células no-Tr1. Los métodos de expansión para células Tr1 pueden incluir el uso de una célula presentadora de antígeno artificial basada en perlas o células. Sin embargo, se puede utilizar cualquier método de la técnica para expandir las Tr1.

También se describe un método de conversión y expansión a gran escala de Tr1 que aborda el bajo número de células Tr1 naturales que pueden aislarse y expandirse. Por tanto, los métodos y composiciones son útiles con fines terapéuticos, por ejemplo, en la prevención y el tratamiento de trastornos de base inmunitaria y en la prevención y tratamiento del rechazo de aloinjertos.

Aislamiento y expansión de células Tr1

Las células Tr1 suprimen las respuestas inmunes y desempeñan un papel importante en la inmunoterapia contra la inflamación y las enfermedades autoinmunes y contribuyen a la tolerancia al trasplante. Algunos usos in vivo requieren procesos de expansión para generar un número suficiente de células Tr1 para uso terapéutico in vivo.

La presente invención proporciona un método para generar una población enriquecida de células Tr1 inmunosupresoras a partir de la población de células T CD4⁺ abundantes. La mayoría de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, y CD49b y LAG-3. En algunas realizaciones del método de la invención, más del 90% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3. preferiblemente más del 95% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3, preferiblemente más del 98% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3, preferiblemente más del 99% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3. En algunas realizaciones, más del 99,5% de las células de la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3.

Este método permite la generación de células Tr1 en cantidades suficientes para infusiones in vivo. El método puede usarse tanto para generar células Tr1 con fines de investigación como para uso clínico mediante la administración a un sujeto que lo necesite.

También se describe un método para generar una población de células Tr1 inmunosupresoras a partir de la población de células T CD4⁺ abundantes. Este método permite la generación de células Tr1 en cantidades suficientes para infusiones in vivo. El método puede usarse tanto para generar células Tr1 con fines de investigación como para uso clínico mediante la administración a un sujeto que lo necesite.

La invención proporciona métodos para seleccionar o aislar las células así identificadas. En algunas realizaciones, las células T CD4⁺ se obtienen de sangre (por ejemplo, aisladas de PBMC), médula ósea, sangre de cordón, tejido linfoide, timo, bazo o cualquier muestra de tejido/órgano de interés, que incluye, pero no se limita a, páncreas, ojo, corazón, hígado, nervios, intestino, piel, músculos y articulaciones.

Las células que llevan los marcadores deseados (por ejemplo, CD49b y LAG-3) pueden aislarse, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos o ligandos marcados con FACS o tecnologías de partículas/perlas magnéticas conocidas por un experto en la técnica. En consecuencia, también se describe un método para generar una población enriquecida de células Tr1 inmunosupresoras que son sustancialmente CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ obteniendo una muestra biológica que también comprende células no-Tr1, incluyendo, pero no limitado a, células CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺, y convertir o diferenciar las células que no-Tr1 en células Tr1.

Para mejorar el enriquecimiento de las células Tr1, la selección positiva para CD49b y/o LAG-3 se puede combinar con la selección negativa frente a los marcadores de superficie celular específicos para tipos de células no-Tr1, incluyendo, a modo de ejemplos no limitantes, CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56.

Fuentes de células T y métodos para aislar poblaciones particulares de células T (por ejemplo, células CD4⁺) que se pueden convertir o diferenciar mediante cultivo según los métodos descritos anteriormente son bien conocidos y se describen en la bibliografía. Así, por ejemplo, las células T pueden aislarse convenientemente de la sangre, por ejemplo, de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aislada de sangre, o de otras preparaciones derivadas de sangre tales como productos de leucoféresis o de médula ósea, linfa, timo, bazo o cordón umbilical. Las poblaciones de células T pueden derivarse de cualquier fuente apropiada, incluyendo fuentes humanas o animales.

Se describe la conversión o diferenciación de células no-Tr1, o poblaciones mixtas de células Tr1 y células no-Tr1, en presencia de un sistema celular que presenta un antígeno artificial basado en perlas o células. Independientemente del sistema utilizado para la expansión celular, las células se pueden expandir antes de, simultáneamente con y/o después de la conversión de Tr1. Por ejemplo, las células se pueden expandir usando un sistema de células que presentan antígenos artificiales basado en perlas o células antes de la etapa de conversión inicial de Tr1. Alternativamente, las células pueden expandirse usando un sistema celular que presenta un antígeno artificial basado en perlas o células después de la etapa de conversión inicial de Tr1, pero antes de la etapa de crecimiento selectivo que favorece la proliferación de Tr1s. Alternativamente, las células se pueden expandir usando un sistema celular que presenta un antígeno artificial basado en perlas o células después de la etapa de crecimiento, pero antes de la etapa de impresión. Alternativamente, las células se pueden expandir usando un sistema de células que presentan antígenos artificiales basadas en perlas o células después del estado de impresión.

Se pueden usar perlas de tamaño celular especiales (por ejemplo, perlas magnéticas de hierro-dextrano) que están recubiertas con anticuerpos, tales como anti-CD3 y/o anti-CD28. El uso de perlas anti-CD3 y/o anti-CD28 indujo una fuerte proliferación de células. Como ejemplo no limitante, una relación de perlas:células T de 3:1 expande y conserva la función de Tr1 en un nivel deseable. Las proporciones de anticuerpos frente a CD3 y/o CD28 se pueden ajustar para obtener resultados óptimos. Las perlas se pueden eliminar fácilmente pasando las células cultivadas a través de una columna magnética. Como una ventaja adicional, las Tr1 expandidas en cultivo retienen una potente actividad supresora funcional.

Las Tr1 expandidas en cultivo son capaces de suprimir un MLR, con, a modo de ejemplo, células CD4⁺ primarias o células CD4⁺CD25⁻ cultivadas como células T respondedoras. Las células Tr1 convertidas y expandidas inhiben la proliferación autóloga de células de sangre periférica. Las células Tr1 convertidas y expandidas bloquean o previenen la GVHD, o inhiben o revierten la enfermedad si ya está en curso. Las células Tr1 convertidas y expandidas se introducen en un huésped diferente; mientras que las células Tr1 también pueden establecerse como una línea celular para uso terapéutico continuo. Preferiblemente, el huésped es un huésped humano y las células Tr1 expandidas en cultivo son humanas, aunque también se incluyen animales, incluyendo modelos de animales para estados patológicos humanos, y los tratamientos terapéuticos de dichos animales se contemplan en la presente memoria.

Después de la conversión o diferenciación de Tr1 usando los métodos descritos anteriormente, las células Tr1 se pueden expandir en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células Tr1. Se permite que el crecimiento progrese durante un período de tiempo seleccionado según el número final de células T requeridas y la velocidad de expansión de las células. El paso de las células puede realizarse durante este período. Dicho período de tiempo es normalmente de entre 3 y 10 días, pero puede ser de hasta 14 a 20 días o incluso más, siempre que se mantenga la viabilidad y la proliferación continua de las células T.

Aplicación Terapéutica

También se describen métodos para administrar células Tr1 a un sujeto que lo necesite, para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o trastorno inflamatorio, una enfermedad o trastorno autoinmune, o el rechazo de un trasplante. Las células Tr1 convertidas en cultivo ex vivo y expandidas en cultivo, con o sin células Tr1 de origen natural, pueden introducirse en el sujeto huésped o en otro sujeto mediante cualquier número de enfoques. Pueden inyectarse por vía intravenosa. Opcionalmente, el sujeto huésped puede tratarse con agentes para promover la función in vivo y la supervivencia de las células Tr1. Por supuesto, las Tr1 expandidas en cultivo también se puede introducir en una variedad de formulaciones farmacéuticas. Estas pueden contener aditivos empleados normalmente como aglutinantes, rellenos, vehículos, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes y tampones. Los diluyentes y excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina y dextrosa, como se utilizan en los métodos descritos en la presente memoria. La administración de células Tr1 a un sujeto antes, durante o después del inicio de la enfermedad o trastorno, sirve para disminuir la frecuencia o gravedad de los signos o síntomas de la enfermedad o trastorno experimentado por el sujeto.

Las células se pueden convertir directamente después de la cosecha o las células se pueden almacenar (por ejemplo, mediante congelación) antes de su expansión, o las células se pueden almacenar (por ejemplo, mediante congelación) después de la expansión y antes de su administración terapéutica. Las células Tr1 se pueden administrar solas o las células Tr1 se pueden administrar en combinación con una terapia inmunosupresora conocida.

Por tanto, los métodos proporcionan la consecución de un efecto inmunosupresor en un sujeto, es decir, un método para prevenir o disminuir una respuesta inmune. La enfermedad o trastorno tipificado por una respuesta inmune aberrante puede ser una enfermedad o trastorno inflamatorio o autoinmune, tal como alergia, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enteropatía autoinmune, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, epidermolisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa y colitis ulcerosa.

Las composiciones y los métodos de células Tr1 se usan para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio, o una enfermedad o trastorno autoinmune, en un sujeto que lo necesite. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunes que se pueden prevenir o tratar con las composiciones y métodos incluyen, pero no se limitan a, alergia, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enteropatía autoinmune, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgaris, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa y colitis ulcerosa.

Las composiciones y métodos de células Tr1 se utilizan para tratar sujetos que han recibido un trasplante, tal como un trasplante de células hematopoyéticas, un trasplante de células madre, un trasplante de médula ósea, un trasplante de órganos o células, una transfusión de sangre y similares. Las condiciones en las que la inmunosupresión sería ventajosa incluyen condiciones en las que una respuesta inmune normal o activada es desventajosa para el mamífero, por ejemplo, alotrasplante de células o tejidos, para evitar el rechazo, o en tratamientos de fertilidad en los que se han implicado respuestas inmunes inapropiadas en la falta de concepción y el aborto espontáneo. El uso de tales células antes, durante o después del trasplante evita la extensa enfermedad crónica de injerto frente al huésped que puede ocurrir en pacientes postrasplante. Las células pueden convertirse inmediatamente después de la recolección o almacenarse (por ejemplo, mediante congelación) antes de la expansión o después de la expansión y antes de su uso terapéutico. Las terapias pueden realizarse junto con terapias inmunosupresoras conocidas.

Los métodos son particularmente útiles para humanos, pero también pueden practicarse en sujetos veterinarios. Un "individuo", "sujeto", "paciente" o "huésped" al que se hace referencia en la presente memoria es un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Más preferiblemente, dicho individuo es un ser humano y las células expandidas en cultivo son humanas, aunque también se incluyen animales, incluyendo modelos animales para estados patológicos humanos, y los tratamientos terapéuticos de tales animales se contemplan en la presente memoria. Dichos modelos animales pueden usarse para probar y ajustar las composiciones y métodos si se desea. Ciertos modelos implican inyectar animales consanguíneos con poblaciones de células establecidas. También son útiles los modelos animales quiméricos, descritos en los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,663,481, 5,602,305 y 5,476,993; la solicitud de Patente EP application 379,554; y la solicitud de Patente Internacional International Appl. WO 91/01760. Los mamíferos no humanos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja o veterinarios, animales de deporte y mascotas. Por consiguiente, a diferencia de los modelos animales, dichos animales se pueden someter a tratamientos terapéuticos seleccionados.

También se describe un método para reducir y/o eliminar una respuesta inmune en un sujeto con una enfermedad o trastorno inflamatorio o autoinmune administrando al sujeto una cantidad de células Tr1 eficaz para reducir o inhibir una respuesta inmune en el sujeto. Las células Tr1 se pueden administrar al sujeto, antes, durante o después del inicio de la enfermedad o trastorno. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunes tratables con las composiciones y métodos incluyen, pero no se limitan a, alergia, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía autoinmune, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa y colitis ulcerosa.

También se describe un método para reducir y/o eliminar una respuesta inmune a un trasplante en un receptor administrando al receptor del trasplante una cantidad de células Tr1 eficaz para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por parte del huésped. Las células Tr1 se pueden administrar al paciente trasplantado, antes del trasplante, durante el trasplante o después de que se haya producido el trasplante. Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, las células Tr1 que se administran al receptor del trasplante inhiben la activación y proliferación de las células T del receptor o inducen tolerancia. El trasplante puede incluir un tejido, órgano o célula de un donante. Un ejemplo de un trasplante puede incluir, pero no se limita a, células o tejidos de la piel, células hematopoyéticas, médula ósea, islotes pancreáticos y órganos sólidos tales como corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.

También se describe un método para inhibir una respuesta inmune mediada por células T, poniendo en contacto al menos una célula T con una cantidad eficaz de células Tr1 CD4+CD49+LAG-3+. La respuesta inmune mediada por células T inhibida por los métodos es una actividad de las células T efectoras. La respuesta inmune mediada por células T inhibida por los métodos también puede ser una actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL).

También se describe un método para inhibir al menos una célula T alorreactiva, poniendo en contacto la al menos una célula T alorreactiva con una cantidad eficaz de células Tr1 CD4+CD49+LAG-3+.

También se describe un método para generar un efecto inmunomodulador en un sujeto que tiene una respuesta alorreactiva, una respuesta inflamatoria o una respuesta autoinmune, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de células Tr1 CD4+CD49+LAG-3+.

También se describe un método para prevenir una respuesta alorreactiva, respuesta inflamatoria o respuesta autoinmune en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto, antes del inicio de la respuesta alorreactiva, respuesta inflamatoria o respuesta autoinmune, una cantidad eficaz de células Tr1 CD4+ CD49+LAG-3+ para prevenir la respuesta.

5 En base a la divulgación proporcionada en la presente memoria, las células Tr1 se pueden obtener de cualquier fuente, por ejemplo, del donante de tejido, del receptor del trasplante o de una fuente no relacionada de otro modo (un individuo o especie diferente en conjunto). Las células Tr1 pueden ser autólogas con respecto a las células T (obtenidas del mismo huésped) o alogénicas con respecto a las células T. En el caso de que las células Tr1 sean alogénicas, las células Tr1 pueden ser autólogas con respecto al trasplante al que responden las células T, o las
10 células Tr1 pueden obtenerse de un mamífero que es alogénico con respecto tanto a la fuente de las células T como a la fuente del trasplante al que responden las células T. Además, las células Tr1 pueden ser xenogénicas para las células T (obtenidas de un animal de una especie diferente), por ejemplo, las células Tr1 de ratón pueden usarse para suprimir la activación y proliferación de las células T humanas.

15 Otro aspecto es la ruta de administración de células Tr1 al sujeto. Las células Tr1 se pueden administrar por una ruta que sea adecuada según las circunstancias. Las células Tr1 pueden administrarse sistémicamente, es decir, parenteralmente, mediante inyección intravenosa o pueden dirigirse a un tejido u órgano particular, como la médula ósea. Las Tr1 se pueden administrar mediante una implantación subcutánea de células o mediante la inyección de las células en el tejido conectivo, por ejemplo, en el músculo.

20 Las células Tr1s se pueden suspender en un diluyente apropiado, a una concentración de aproximadamente 5×10^6 células/ml. Los excipientes adecuados para soluciones inyectables son aquellos que son biológica y fisiológicamente compatibles con las Tr1s y con el receptor, tales como solución salina tamponada u otros excipientes adecuados. La composición para administración puede formularse, producirse y almacenarse según los métodos estándar que cumplen con la esterilidad y estabilidad adecuadas.

25 La dosis de las células Tr1 varía dentro de amplios límites y puede ajustarse a los requisitos del sujeto en cada caso particular. El número de células utilizadas depende del peso y el estado del receptor, el número y/o frecuencia de las administraciones y otras variables conocidas por los expertos en la técnica.

30 En varias realizaciones, se pueden administrar al sujeto entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{13} células Tr1 por 100 Kg de peso corporal. En algunas realizaciones, se administran entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ y aproximadamente $1,5 \times 10^{12}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones, se administran entre aproximadamente 1×10^9 y aproximadamente 5×10^{11} células por 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones, se administran entre aproximadamente 4×10^9 y aproximadamente 2×10^{11} células por 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones, se administran entre aproximadamente 5×10^8 células y aproximadamente 1×10^{10} células por 100 kg de peso corporal.

35 Las células Tr1 a pueden administrarse al receptor antes, al mismo tiempo o después de un trasplante para reducir y/o eliminar el rechazo del trasplante por parte del huésped. Si bien no se desea estar ligado a ninguna teoría en particular, las Tr1s se pueden usar para acondicionar el sistema inmunológico del receptor para el trasplante administrando las Tr1s al receptor, antes, al mismo tiempo o después del trasplante, en una cantidad eficaz para reducir, inhibir o eliminar una respuesta inmunitaria frente al trasplante por parte de las células T del receptor. Las células Tr1 afectan a las células T del receptor de manera que la respuesta de las células T se reduce, inhibe o elimina
40 cuando se les presenta el trasplante. Por tanto, puede evitarse el rechazo del trasplante por parte del huésped, o reducirse la gravedad del mismo, administrando células Tr1 al receptor, antes, al mismo tiempo o después del trasplante.

45 Las células Tr1 también se pueden administrar al paciente antes, al mismo tiempo o después del inicio de enfermedades inflamatorias o autoinmunes para prevenir y/o restablecer la tolerancia. Si bien no se desea estar ligado a ninguna teoría en particular, las Tr1s se pueden usar para acondicionar el sistema inmunológico de un paciente administrando Tr1s al paciente, antes, al mismo tiempo o después del inicio de la enfermedad, en una cantidad eficaz para prevenir, reducir, inhibir o eliminar una respuesta inmune de las células T del paciente. Las células Tr1 afectan a las células T de los pacientes de manera que la respuesta de las células T se previene, reduce, inhibe o elimina.

50 Se describe además un método para tratar a un paciente que está experimentando una respuesta inmune adversa a un trasplante mediante la administración de células Tr1 al paciente en una cantidad eficaz para reducir, inhibir o eliminar la respuesta inmune al trasplante, también conocido como rechazo del huésped al trasplante. trasplante.

55 También se describe un método para usar células Tr1 como terapia para inhibir la enfermedad de injerto frente al huésped o el rechazo de injerto después del trasplante. Por consiguiente, se describe un método para poner en contacto un trasplante de donante, por ejemplo, un tejido, órgano o célula de un donante, con células Tr1 antes, durante o después del trasplante del trasplante a un receptor. Las células Tr1s sirven para mejorar, inhibir o reducir una respuesta adversa del trasplante del donante frente al receptor.

Como se discutió en otra parte de la presente memoria, las células Tr1 se pueden obtener de cualquier fuente, por ejemplo, del donante de tejido, el receptor del trasplante o una fuente no relacionada (un individuo o especie diferente

en conjunto) para el uso de eliminar o reducir una respuesta inmune no deseada mediante un trasplante frente a un receptor del trasplante. Por consiguiente, las células Tr1 pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas para el donante de tejido, el receptor del trasplante o una fuente no relacionada de otro modo.

El trasplante puede exponerse a las células Tr1 antes, al mismo tiempo o después del trasplante del trasplante al receptor. En esta situación, una respuesta inmune frente al trasplante causada por cualquier célula receptora alorreactiva sería suprimida por las células Tr1 presentes en el trasplante. Las células Tr1 son alogénicas para el receptor y pueden derivarse del donante o de una fuente distinta del donante o receptor. En algunos casos, las células Tr1 autólogas del receptor pueden usarse para suprimir una respuesta inmune frente al trasplante. En otro caso, las células Tr1 pueden ser xenogénicas para el receptor, por ejemplo, las células Tr1 de ratón o rata pueden usarse para suprimir una respuesta inmune en un ser humano. Sin embargo, es preferible utilizar células Tr1 humanas.

El trasplante de donante puede ser "preacondicionado" o "pretratado" poniendo en contacto el trasplante antes del trasplante en el receptor con células Tr1 con el fin de reducir la inmunogenicidad del trasplante frente al receptor, reduciendo y/o previniendo así la enfermedad de injerto frente al huésped o el rechazo de injerto. Por ejemplo, el trasplante puede ponerse en contacto con células o un tejido del receptor antes del trasplante para activar las células T que pueden estar asociadas con el trasplante. Después del tratamiento del trasplante con células o un tejido del receptor, las células o el tejido se pueden eliminar del trasplante. A continuación, el trasplante tratado se pone en contacto adicionalmente con células Tr1 para reducir, inhibir o eliminar la actividad de las células T que fueron activadas por el tratamiento de las células o tejido del receptor. Después de este tratamiento del trasplante con células Tr1, las células Tr1 pueden eliminarse del trasplante antes del trasplante al receptor. Sin embargo, algunas células Tr1 pueden adherirse al trasplante y, por lo tanto, pueden introducirse al receptor con el trasplante. En esta situación, las células Tr1 introducidas en el receptor pueden suprimir una respuesta inmune frente al receptor provocada por cualquier célula asociada al trasplante. Sin querer estar ligado a ninguna teoría en particular, el tratamiento del trasplante con células Tr1 antes del trasplante del trasplante en el receptor sirve para reducir, inhibir o eliminar la actividad de las células T activadas, evitando así la re-estimulación o induciendo una hiporespuesta de las células T a la estimulación antigénica posterior de un tejido y/o células del receptor. Un experto en la técnica comprenderá basándose en la presente divulgación, que el preacondicionamiento o el pretratamiento del trasplante antes del trasplante puede reducir o eliminar la respuesta injerto frente al huésped.

En el contexto del trasplante de sangre de cordón umbilical, médula ósea o células madre de sangre periférica (células madre hematopoyéticas), el ataque del huésped por el injerto puede reducirse, inhibirse o eliminarse acondicionando previamente la médula del donante mediante el uso de los métodos de pretratamiento descritos en la presente memoria con el fin de reducir la inmunogenicidad del injerto frente al receptor. Como se describe en otra parte de la presente memoria, una fuente de células madre y progenitoras hematopoyéticas de un donante puede tratarse previamente con células Tr1 de cualquier fuente, preferiblemente con células Tr1 del receptor in vitro antes del trasplante de la médula ósea del donante al receptor. Preferiblemente, la médula del donante se expone primero al tejido o células del receptor y luego se trata con células Tr1. Aunque no se desea estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que el contacto inicial de la esteina hematopoyética del donante y la fuente de células progenitoras con el tejido o las células del receptor funcionan para activar las células T en la médula ósea del donante. El tratamiento de la médula ósea del donante con las células Tr1 induce la hiposensibilidad o previene la re-estimulación de las células T a la estimulación antigénica posterior, reduciendo, inhibiendo o eliminando así un efecto adverso inducido por la médula ósea del donante sobre el receptor.

Un receptor de trasplante que padece una enfermedad de injerto frente al huésped o rechazo de injerto puede tratarse administrando células Tr1 al receptor para reducir, inhibir o eliminar la enfermedad de injerto frente al huésped en la que las células Tr1 se administran en una cantidad eficaz para reducir o eliminar la enfermedad de injerto frente al huésped.

Las células Tr1 del receptor pueden obtenerse del receptor antes del trasplante y pueden almacenarse y/o expandirse en cultivo para proporcionar una reserva de células Tr1 en cantidades suficientes para tratar una reacción de injerto frente al huésped en curso. Sin embargo, como se describe en otra parte de la presente memoria, las células Tr1 pueden obtenerse de cualquier fuente, por ejemplo, del donante de tejido, del receptor del trasplante o de lo contrario de una fuente no relacionada (un individuo o una especie diferente en conjunto).

El experto en la materia comprenderá que las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse junto con los enfoques terapéuticos actuales para tratar las enfermedades y trastornos descritos en otra parte de la presente memoria. A modo de ejemplo no limitante, las células Tr1 pueden usarse junto con el uso de terapia con fármacos inmunosupresores. Una ventaja de usar células Tr1 junto con fármacos inmunosupresores es que, al usar los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la gravedad de la respuesta inmune en un sujeto, tal como un receptor de trasplante, la cantidad de terapia con fármacos inmunosupresores utilizada y/o la frecuencia de administración de la terapia con fármacos inmunosupresores se puede reducir. Un beneficio de reducir el uso de la terapia con fármacos inmunosupresores es el alivio de la supresión inmunológica general y los efectos secundarios no deseados asociados con la terapia con fármacos inmunosupresores.

También se contempla que las células Tr1 se puedan administrar a un receptor repetidamente o como una terapia "única" para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o trastorno

autoinmune, una enfermedad o trastorno inflamatorio, o una enfermedad o trastorno asociado con el trasplante, tal como el rechazo del tejido del donante por parte del huésped o la enfermedad de injerto frente al huésped. Una administración única de células Tr1 en el receptor del trasplante elimina la necesidad de una terapia con fármacos inmunosupresores crónica. Sin embargo, si se desea, también se pueden emplear múltiples administraciones de células Tr1.

También se describe un método para prevenir o tratar el rechazo de trasplantes y/o la enfermedad de injerto frente al huésped mediante la administración de células Tr1 en una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz para la prevención, tratamiento o mejora del rechazo del huésped del trasplante y/o la enfermedad de injerto frente al huésped. En base a la presente divulgación, una cantidad terapéuticamente eficaz de células Tr1 es una cantidad que inhibe o disminuye el número de células T activadas, en comparación con el número de células T activadas en ausencia de la administración de células Tr1. En la situación de rechazo del trasplante por parte del huésped, una cantidad eficaz de células Tr1 es una cantidad que inhibe o disminuye la cantidad de células T activadas en el receptor del trasplante en comparación con el número de células T activadas en el receptor antes de la administración de las células Tr1.

Se puede determinar una cantidad eficaz de células Tr1 comparando el número de células T activadas en un sujeto con una enfermedad o trastorno antes de la administración de células Tr1 al mismo, con el número de células T activadas presentes en el sujeto después de la administración de células Tr1 al mismo. Una disminución, o la ausencia de un aumento, en el número de células T activadas en el sujeto, o en el propio trasplante, que está asociado con la administración de células Tr1 al mismo, indica que el número de células Tr1 administradas es una cantidad terapéuticamente eficaz de Tr1s.

Debe entenderse que los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo de varias formas y con diversas modificaciones y permutaciones de las mismas que son bien conocidas en la técnica. También se puede apreciar que cualquier teoría expuesta en cuanto a modos de acción o interacciones entre tipos de células no deben interpretarse como limitantes de esta invención de ninguna manera, sino que se presentan de manera que los métodos de la invención puedan entenderse más completamente.

Estos métodos descritos en la presente memoria no son de ningún modo inclusivos, y los métodos adicionales que se adapten a la aplicación específica serán evidentes para el experto en la materia. Además, la cantidad eficaz de las composiciones se puede aproximar más a través de la analogía con compuestos que se sabe que ejercen el efecto deseado.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos.

Sin descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, realizar y utilizar la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la divulgación.

Ejemplo 1: La co-expresión de CD49b y LAG-3 identifica células Tr1 humanas y murinas.

Las células T CD4⁺ reguladoras de tipo 1 (Tr1) se inducen en la periferia y desempeñan un papel fundamental en la promoción y el mantenimiento de la tolerancia. La ausencia de marcadores de superficie que identifiquen de forma única las células Tr1 ha limitado su estudio y su aplicación clínica. Los estudios presentados en la presente memoria demuestran que mediante el perfil de expresión génica de clones de células Tr1 humanas, se identificaron los marcadores de superficie CD49b y LAG-3, que se co-expresan de forma estable y selectiva en células Tr1 murinas y humanas. Como se describe en la presente memoria, la especificidad de estos marcadores se prueba en dos modelos de inflamación de ratón y en sangre periférica de voluntarios sanos. La co-expresión de CD49b y LAG-3 permite el aislamiento de células Tr1 humanas altamente supresoras de cultivos anergizados *in vitro* y permite rastrear las células Tr1 en la sangre periférica de sujetos tolerantes. Además de ser un hallazgo importante para la biología de las células Tr1, la identificación de estos marcadores convierte a las células Tr1 en una herramienta aún más atractiva para las intervenciones terapéuticas.

A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Ratones

Ratones C57BL/6 (B6), ratones C57BL/6, RAG1 ^{-/-}, ratones C57BL/6 CD45.1⁺ y C57BL/6 IL-4^{eGFP} (4get) se adquirieron en The Jackson Laboratories. Ratones IL-10R dominantes negativos (Pacciani et al., 2010, J Allergy Clin Immunol 125, 727-736), ratones de reporteros Foxp3 (Wan and Flavell, 2005, Proc Natl Acad Sci U S A 102, 5126-5131), ratones de reporteros IL-17A^{eGFP} (Esplugues et al., 2011, Nature 475, 514-518), ratones de reporteros IL-10^{eGFP} (Kamanaka et al., 2006, Immunity 25, 941-952) y se cruzaron y generaron ratones de reporteros IFN- γ ^{Katushka}. Se utilizaron compañeros de camada emparejados por edad y sexo entre las 8 y las 12 semanas de edad.

Aislamiento celular y purificación de células humanas.

La sangre periférica humana de donantes sanos (HDs) se obtuvo con el consentimiento informado según la aprobación del comité de ética local (TIGET PERIBLOOD) y con la Declaración de Helsinki. Se aislaron PBMC mediante centrifugación sobre gradientes Lymphoprep Ficoll (Fresenius Kabi Norge AS, Halden, Norway). Los linfocitos T CD4⁺ se purificaron a partir de PBMC mediante selección negativa utilizando el kit intacto CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), según las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD4⁺CD45RO⁻ nativos se purificaron a partir de linfocitos T CD4⁺ mediante microperlas CD45RO (Miltenyi Biotech). La proporción de CD4⁺CD45RO⁻CD45RA⁺ fue consistentemente superior al 90%.

Aislamiento de clones de células T humanas

Los clones de células T se obtuvieron a partir de células CD4⁺ limitando la dilución a 0,3 células/pocillo en presencia de una mezcla de células alimentadoras y mAbs anti-CD3 solubles (1 µg/mL, OKT3, Jansen-Cilag, Raritan, NJ, US), en medio X-vivo15 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) suplementado con suero AB humano combinado al 5% (BioWhittaker), 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (BioWhittaker). El día 3, se añadió IL-2 (40 U/ml; Chiron, Italia, Milán, Italy). Los clones de células T se re-estimularon cada 14 días con una mezcla de células alimentadoras y mAbs anti-CD3 solubles (1 µg/ml). Entre estimulaciones con células alimentadoras, los clones de células T se expandieron con rhIL-2 (40 U/mL). Una vez que se establecieron los clones de células T, se añadió rhIL-15 (5 ng/mL, R&D System, Minneapolis, MN, USA) en cada cambio de medio como factor de crecimiento de células Tr1 (Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426; Bacchetta et al., 2002, Eur J Immunol 32, 2237-2245). Los clones se clasificaron en base al perfil de producción de citocinas (Romagnani, 1994, Annual review of immunology 12, 227-257). Los clones de células Tr1 se definieron cuando la proporción entre IL-10 e IL-4 fue superior a 8, como se describió anteriormente (Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426; Bacchetta et al., 2002, Eur J Immunol 32, 2237-2245). Todos los clones de células T se probaron en un ensayo de supresión para evaluar su actividad reguladora.

Diferenciación de la línea de células T

Células T humanas

Las líneas de células Tr1 y TH0 humanas se diferenciaron utilizando células L murinas transfectadas con hCD32, hCD80 y hCD58 y suplementadas con mAb anti-CD3 (100 ng/ml; OKT3, Jansen-Cilag, Raritan, NJ, USA) (APCs artificiales), como se describió anteriormente (Levings et al., 2001, J Immunol 166, 5530-5539). Brevemente, las células T CD4⁺CD45RO⁻ se activaron mediante células L irradiadas (7000 rad) previamente en placa en medio X-vivo 15 (BioWhittaker) suplementado con suero AB humano combinado al 5% (BioWhittaker), penicilina/estreptomicina 100 U/ml (BioWhittaker). Las líneas de células TH0 se diferenciaron en presencia de rhIL-2 (100 U/ml; Chiron Italia) y rhIL-15 (1 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), mientras que las células Tr1 se polarizaron con rhIL-10 (100 U/ml; BD Pharmingen) y rhIFNα-2b (5 ng/ml; IntronA, Schering Plough Europe, Bruxelles, Belgium). Después de 7 días, las células T se re-estimularon en condiciones idénticas durante 7 días adicionales. Al final de los 14 días de cultivo, las células T se lavaron, contaron y analizaron para determinar la producción de citocinas. Las células T que producen IL-10 se purificaron mediante un ensayo de secreción de IL-10 (Miltenyi Biotech), según las instrucciones del fabricante.

DC-10 se diferenció como se describió anteriormente (Gregori et al., 2010, Blood 116, 935-944). Brevemente, los monocitos CD14⁺ se aislaron como la fracción adherente de PBMC después de la incubación durante 1 hora en RPMI 1640 (Biowhittaker) suplementado con FCS al 10% (Biowhittaker), 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Bristol-Myers Squibb) y 50 µM de 2 mercaptoetanol (BioRad) (Medio DC) a 37°C. Después del lavado, los monocitos adherentes se cultivaron en 10 ng/ml de rhIL-4 (R&D Systems) y 100 ng/ml de rhGM-CSF (R&D Systems) en medio DC en ausencia (mDC) o presencia (DC-10) de 10 ng./ml de rhIL-10 (BD, Bioscience) durante 7 días. Después de 5 días, las mDC diferenciadas en ausencia de rhIL-10 se estimularon con 1 µg/ml de LPS (Sigma Aldrich) durante 2 días adicionales. Para generar líneas de células T (DC-10), 10⁵ DC-10 se cultivaron con 10⁶ células T CD4⁺CD45RO⁻ alogénicas en 1 ml de medio X-vivo 15 (Biowhittaker), suplementado con suero humano AB combinado al 5% (Biowhittaker) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Bristol-Myers Squibb). Después de 6 o 7 días, se añadió rhIL-2 (20 U/ml; Chiron Italia) y las células se expandieron durante 7-8 días adicionales. Catorce días después del cultivo, las células T se recolectaron, lavaron y analizaron funcionalmente. Como control, se utilizaron células T diferenciadas con mDC. Las células T estimuladas con DC-10 se indican como pTr1 (DC-10) y las células T estimuladas con mDC como T(mDC).

Células T murinas

Las células T CD4⁺ murinas nativas (CD4⁺CD62L^{Hi}CD25⁻) de ratones C57BL/6 se activaron con mAbs anti-CD3 (2-5 µg/ml; 145-2C 11) y anti-CD28 (1-2 µg/ml; PV-1) unidos a placa. Las células TH0 se diferenciaron en presencia de mAbs anti-IFN-γ (10 µg/ml) y anti-IL-4 (10 µg/ml). Las células Tr1 se diferenciaron en presencia de IL-27 recombinante murina (25 ng/ml) y TGF-β (2 ng/ml). Las células TH2 se diferenciaron en presencia de IL-4 recombinante murina (10 ng/ml) y anti-IFNγ (10 µg/ml). Las células TH17 se diferenciaron en presencia de TGF-β recombinante murina (0,5 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml), anti-IFNγ (10 µg/ml) y anti-IL-4 (10 µg/ml). Las células TH1 se diferenciaron en presencia de IL-12 recombinante murina (10 ng/ml), IL-2 (50 u/ml) y anti-IL-4 (10 µg/ml). Las células Tregs Foxp3⁺ se diferenciaron en presencia de TGF-β recombinante murino (2 ng/ml), IL-2 (50 U/ml) anti-IFNγ (10 µg/ml) y anti-IL-4 (10 µg/ml). Después de cuatro días de cultivo, las células T se recolectaron y analizaron.

Experimentos de aislamiento de RNA y micromatrices de DNA

Se aisló RNA de clones de células Tr1 y T_H0 de dos HDs distintas no estimuladas (t0) o estimuladas (6 y 16 horas) con mAb anti-CD3 inmovilizado (10 µg/mL; Jansen-Cilag) y mAb anti-CD28 soluble (1 µg/mL, BD Pharmingen) en medio completo a una concentración de 10⁶ Células T/ml. El RNA total se extrajo con el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó un RNA total (100 ng) para el análisis GeneChip. La preparación de cDNA marcado en el terminal, la hibridación con el transcrito completo GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.) y el escaneo de las matrices se llevó a cabo según los protocolos del fabricante. Los datos brutos se pre-procesaron con el algoritmo RMA. Para detectar genes expresados diferencialmente, se realizó la prueba t de Welch sin corrección del valor p. Los genes se consideraron expresados diferencialmente si la expresión génica era más de 2 veces diferente con un valor de p < 0,05. Todas estas etapas se realizaron utilizando R y Bioconductor.

Análisis de PCR cuantitativo en tiempo real**Muestras humanas**

El RNA total se extrajo con el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany) y el cDNA se sintetizó con el kit de alta capacidad cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. El análisis en tiempo real se realizó utilizando el software ABI Prism 7500/SDS2.2.1. Los niveles de mRNA se cuantificaron utilizando los kits Assay on Demand quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (Applied Biosystems) con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las muestras se analizaron por duplicado o triplicado, y la expresión relativa se determinó normalizando a hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (*HPRT*) y/o expresión de β2-microglobulina (*B2M*) en cada conjunto de muestras para calcular un cambio de veces en el valor y comparando la cantidad relativa con el calibrador (nivel de expresión de un grupo de línea de células T CD4⁺ de 4 HDs distintas). Los análisis se realizaron con el software qBase v1.3.5 (Jan Helleman & Jo Vandesompele).

Muestras murinas

El RNA total se extrajo de las células utilizando el reactivo Trizol®, seguido de la limpieza del RNA utilizando el kit RNeasy (Qiagen). Se utilizó el kit de síntesis de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems) para la síntesis de cDNA. El análisis de PCR en tiempo real se realizó utilizando TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix y TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) en una máquina del sistema 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems). Las muestras se analizaron por duplicado o triplicado, y la expresión relativa se determinó normalizando a la expresión de hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (*hrpt*).

Detección de citocinas**Muestras humanas**

Las células T humanas (0,2-0,4 x 10⁶ células/ml) se estimularon con mAb anti-CD3 inmovilizado (10 µg/ml; Jansen-Cilag) y mAb anti-CD28 soluble (1 µg/ml, BD Pharmingen) en medio completo. Para medir la producción de IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ e IL-17, los sobrenadantes del cultivo se recolectaron después de 24 (para la detección de IL-2) o 72 horas (para otras citocinas) de cultivo y los niveles de citocinas se determinaron mediante ELISA de captura según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Los límites de detección fueron los siguientes: IFN-γ: 60 pg/ml; IL-10: 19 pg/ml; IL-4: 9 pg/ml; IL-17: 30 pg/ml.

Muestras murinas

Las células T murinas (0.3-0.5 x 10⁶ células/ml) se estimularon durante 72 horas con mAb anti-CD3 inmovilizado (10 µg/ml; Jansen-Cilag) y mAb anti-CD28 soluble (10 µg/ml, BD Pharmingen) en medio completo. Las citocinas se cuantificaron mediante Cytometric Bead Array (BD Bioscience) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de citometría de flujo**Células T humanas.**

Las células T humanas se tiñeron con mAbs anti-CD4 (BD Pharmingen), anti-CD49b (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-LAG-3 (R&D System), anti-CD226 (Biolegend), anti-CD45RA y anti-CD25 (BD Pharmingen). La tinción para CD49b y LAG-3 se realizó a 37°C durante 15 minutos. Se utilizó tinción intracelular para la detección de FOXP3 (clon 259D, Biolegend), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las muestras se adquirieron utilizando un citómetro de flujo BD FACS Canto (BD Biosciences) y los datos se analizaron con FCS express (De Novo Software). Los marcadores de cuadrante se establecieron según los controles no teñidos.

Células T murinas

Las células T murinas se tiñeron con mAbs anti-CD4, anti-TCRβ, anti-CD45.1, anti-CD45.2, anti-CD49b (clon HMA2), anti-LAG-3 (clon C9B7W), anti-CD226, todos adquiridos de Biolegend. La tinción para CD49b y LAG-3 se realizó a

37°C durante 15 minutos y a temperatura ambiente durante 15 minutos adicionales. Para la purificación de poblaciones de células T según la expresión de CD49b y LAG-3, las células T CD4⁺ se enriquecieron primero con perlas de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS; Miltenyi Biotec) y luego se purificaron más con un FACS Advantage (BD). La pureza de las células clasificadas fue superior al 95%.

5 **Funciones supresoras**

Células T humanas

Para evaluar la actividad supresora de las células T humanas, las células T CD4⁺ (células que responden) se tiñeron con CFSE (sondas moleculares) y se activaron con perlas recubiertas con anti-CD3, anti-CD2 y anti-CD28 (TrI Inspector, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), en una proporción de tres perlas por célula. Se añadieron células supresoras en una proporción de 1:1. El porcentaje de células T respondedoras divididas se calculó mediante el control de células CD4⁺, como se describe en otra parte (Lyons and Parish, 1994, J Immunol Methods 171, 131-137).

Células T murinas

Para determinar la actividad supresora de las células T murinas, células T CD45.1⁺CD4⁺CD25⁻ (células respondedoras) se marcaron con el kit Cell Trace Violet Cell Proliferation Kit (1 µM; Invitrogen) y se cultivaron en placas de fondo plano de 96 pocillos (20-50 x 10³ células/pocillo) con o sin células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺Foxp3^{RFP-}, CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺Foxp3^{RFP-}, CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺Foxp3^{RFP-} y CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺Foxp3^{RFP-} clasificadas por FACS a partir de los diferentes órganos. La proporción entre respondedor y supresor fue 1:1, 2:1, 4:1, 8:1. Se utilizaron APCs irradiadas (esplenocitos MACS empobrecidos para células T CD4 y CD8) como células alimentadoras (4 x 10⁵ células/pocillo). Las células se estimularon con 1 µg/ml de mAb CD3 (2C11). En algunos experimentos, la supresión se realizó en presencia de mAb anti-IL10Rα (50 µg/ml; clon 1B1). Después de 72 horas, la dilución Cell Trace Violet en CD45.1⁺CD4⁺ (células respondedoras) se analizó mediante citometría de flujo. El porcentaje de células T respondedoras divididas se calculó como se describe (Lyons and Parish, 1994, J Immunol Methods 171, 131-137).

Procedimiento endoscópico e histopatológico

La colonoscopia se realizó de forma ciega para la puntuación de colitis mediante el sistema Coloview (Karl Storz, Germany) (Huber et al., 2011, Immunity 34, 554-565; Becker et al., 2006, Nature 440, 303-307). En resumen, la puntuación de la colitis se basó en la granularidad de la superficie de la mucosa, la consistencia de las heces, el patrón vascular, la translucidez del colon y la fibrina visible (0-3 puntos para cada uno). Para la histología, los cólonos se fijaron en la solución fijadora de Bouin y se embebieron en parafina.

30 **Aislamiento de linfocitos intestinales y anti-CD3**

A los ratones se les inyectó mAb anti-CD3 (15 µg, 145-2C11), anticuerpo de isotipo o PBS i.p. dos veces cada dos días. Después de la eliminación de los parches de Peyer, los linfocitos intraepiteliales (IEL) y los linfocitos de la lámina propia (LPL) se aislaron mediante incubación con EDTA 5 mM a 37°C durante 30 min (para IEL), seguido de una digestión adicional con colagenasa IV y DNasa a 37°C durante 1 hora (para LPL). A continuación, las células se separaron adicionalmente con un gradiente de Percoll. Si no se indica de manera diferente, se aislaron células de la parte superior del intestino delgado (duodeno + yeyuno) de ratones tratados con anti-CD3.

Parásito e infección

Larvas de tercer estadio (L3) de *N. brasiliensis* se recuperaron de coprocultivos de ratas infectadas y se lavaron extensamente. Se inyectaron quinientos parásitos por vía subcutánea en 0,2 ml de PBS en la base de la cola, como se describió anteriormente (Fowell and Locksley, 1999, Bioessays 21, 510-518). Los ratones se sacrificaron en tiempos designados y se evaluó la presencia de gusanos adultos en los intestinos mediante microscopía invertida. Se extirparon pulmones completos, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y mediastínicos, se trituraron y se dispersaron en suspensiones unicelulares. Las suspensiones de pulmón se purificaron adicionalmente mediante centrifugación sobre Ficoll (Brown et al., 1996, J Exp Med 184, 1295-1304).

45 **Pacientes**

Los pacientes afectados por β-talasemia con edades comprendidas entre 2 y 17 años han sido trasplantados de donantes hermanos HLA idénticos en San Raffaele Scientific Institute desde 2005 y en el Istituto Mediterraneo IME desde 2004. Once pacientes que desarrollaron quimerismo mixto persistente (PMC), en el que las células del paciente y del donante coexisten durante más de 2 años después del trasplante, y se analizaron siete pacientes que desarrollaron quimerismo completo (CC) después de un HSCT alogénico. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes según las directrices institucionales y la Declaración de Helsinki.

Análisis estadístico

Los valores medios se expresan como Media ± SEM. Se utilizaron la prueba de Mann Whitney y la prueba ANOVA para determinar el significado estadístico de los datos. El significado se definió como * P≤0.05, ** P≤0.005, ***

P $\leq$ 0.0005 y *** P <0.0001. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). La precisión de los porcentajes de las células T CD49b⁺LAG-3 se cuantificaron para discriminar a los sujetos tolerantes frente a los no tolerantes mediante el análisis de la característica operativa del receptor (ROC) mediante mediciones de área bajo curva (AUC). Para establecer el mejor poder de cribado de los biomarcadores, se investigó el "mejor" punto de corte, que diferencia los casos (sujetos tolerantes) de los controles (HDs o sujetos no tolerantes). Se eligieron diferentes puntos de corte y se calculó la sensibilidad correspondiente (proporción de sujetos con PMC que afirmaron ser tolerantes) y la especificidad (proporción de sujetos HDs o CC que afirmaron ser controles). La curva ROC empírica y suavizada se trazó y comparó con la situación "teórica" con sensibilidad y especificidad iguales a uno. Se eligió el "mejor" punto de corte para maximizar la especificidad y sensibilidad "observadas" y de tal manera que el porcentaje de células positivas separe los mejores casos de los controles. Los análisis se realizaron con el software estadístico R 2.15.2 (R-proyect.org/R).

A continuación, se describen los resultados de los experimentos.

Perfil de expresión génica de clones de células Tr1 humanas

El transcriptoma de los clones de células Tr1 humanas se comparó con el de clones de células T_{H0} no estimulados o estimulados durante 6 y 16 h. La alta expresión de *IL-10* (Groux et al., 1997, Nature 389, 737-742), *GzB* (Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662; Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426; Grossman et al., 2004, Blood 104, 2840-2848) y *PD-1* (Akdis et al., 2004, J Exp Med 199, 1567-1575) (Figura 7A) que se sabe que se expresa en células Tr1, validó la precisión de la micromatriz. Los perfiles de las células Tr1 y T_{H0} eran similares en general (Figura 1A), pero un pequeño número de transcritos se expresaron de forma única en clones de células Tr1 (Figura 1A). Se identificaron diecisiete genes expresados diferencialmente (DEGs) en Tr1 en comparación con clones de células T_{H0} en todos los puntos de tiempo y 28 DEGs tras la activación (Figura 1B, C). Entre los 17 DEGs identificados tanto en células Tr1 estimuladas como no estimuladas *ITGA2* (CD49b) y *CD226* se seleccionaron según los valores de p y Log2FC (Figura 7B). Como CD49b se puede expresar también en las células T_H efectoras (Charbonnier et al., 2006, J Immunol 177, 3806-3813; Boisvert et al., 2010, Eur J Immunol 40, 2710-2719), se buscó otro marcador que, en asociación con CD49b, pudiera permitir el aislamiento de células Tr1. Se seleccionó *LAG-3* (Figura 7B), que previamente se ha demostrado que está asociado con las funciones de Tr1 (Workman and Vignali, 2005, J Immunol 174, 688-695), que estaba altamente regulada anteriormente en los clones de células Tr1 activadas. La RT-PCR confirmó que *CD49b*, *CD226*, y *LAG-3* fueron significativamente más altos en Tr1 que en clones de células T_{H0} (Figura 7C), y en líneas de células Tr1 productoras de IL-10 enriquecidas aisladas de cultivos polarizados con Tr1 *in vitro*, en comparación con las líneas de células T_{H0} (Figura 7D). El análisis FACS confirmó que los clones de células Tr1 expresaron niveles significativamente más altos de CD49b y LAG-3 que los clones de células T_{H0} (Figura 1D). Todos los clones de células T expresaron CD226, pero los clones de células Tr1 mostraron una mayor intensidad de fluorescencia media (MFI) que los clones de células T_{H0} (Figura 1D). En general, se identificaron CD49b, CD226 y LAG-3 como marcadores putativos para las células Tr1 humanas.

La co-expresión de CD49b y LAG-3 identifica células Tr1 humanas

La presencia de células T CD4⁺ humanas que expresan CD49b, LAG-3 y CD226 se investigaron a continuación. Se observó una pequeña población (2,14 $\pm$ 0,25%) de células T CD45RA⁺CD4⁺ de memoria que co-expresaban CD49b, LAG-3 (Figura 2A) y CD226 (Figura 8A) en la sangre periférica de donantes sanos (HDs). Cabe destacar que, las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ no expresaron CD25 a niveles altos y la expresión de FOXP3 a niveles de mRNA y proteínas fue significativamente menor que en células T CD25^{brillante} (Figura 8B).

Las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺, clasificadas por FACS de sangre periférica de HDs, secretaron niveles significativamente más altos de IL-10 en comparación con las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺, CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁻ y CD4⁺CD49b⁻LAG-3⁻, así como bajas cantidades de IL-4 (Figura 2B). Las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ mostraron una alta proporción IL-10/IL-4, que es uno de los parámetros clave para distinguir las células Tr1 de T_{H2} (Groux et al., 1997, Nature 389, 737-742; Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662; Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426; Passerini et al., 2011, Eur J Immunol 41, 1120-1131), (Figuras 2B y 8C). Además, las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ secretaron IFN- γ , pero no IL-17 (Figura 2B).

Es importante destacar que las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ suprimieron la proliferación de células T CD4⁺ *in vitro*, que es una característica clave de las células Tr1, a niveles significativamente más altos que los otros subconjuntos analizados (Figura 2C).

Como se demuestra en la presente memoria, las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ representan una subpoblación de células T CD4⁺ de memoria que secretan grandes cantidades de IL-10, no expresan altos niveles de FOXP3 y ejercen actividad supresora *in vitro*.

La coexpresión de CD49b y LAG-3 identifica células Tr1 murinas

Recientemente se demostró que las células T CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ (Tr1) con fuertes funciones reguladoras se acumulan en el intestino delgado de los ratones tras el tratamiento con mAb anti-CD3 (Huber et al., 2011, Immunity 34, 554-565). Aquí, se probó si estas células Tr1 murinas (definidas como CD4⁺TCR β ⁺Foxp3^{RFP}-TL-10^{eGFPbrillante}) expresan CD49b y LAG-3. La gran mayoría (70 $\pm$ 5%) de las células T CD4⁺IL-10^{eGFPbrillante} coexpresaron CD49b y LAG-3 (Figura 3A),

mientras que menos del $13 \pm 5\%$ de las células T $CD4^+IL-10^-$ eran $CD49b^+LAG-3^+$ (Figura 3A). De acuerdo con este hallazgo, las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ aisladas del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3 contenían una frecuencia muy alta de células $IL-10^{eGFP+}$ (Figuras 3B y 3C), y expresaron un MFI alto para $IL-10^{eGFP+}$ (Figura 3B) y CD226 (Figura 9A). Estos resultados indican que las células T productoras de IL-10 y las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ son en gran parte superponibles. En consecuencia, las frecuencias de las células T $CD4^+TCR\beta^+Foxp3^{RFP}IL-10^{eGFPbrillante}$ y $CD4^+TCR\beta^+CD49b^+LAG-3^+$ mostraron la misma cinética después del tratamiento con mAb anti-CD3 (Figura 9B). En particular, el fenotipo de las células Tr1 fue estable, ya que CD49b y LAG-3 se co-expresaron permanentemente por las células T $CD4^+Foxp3^-IL-10^{eGFPbrillante}$ (Figura 9B).

Para determinar si CD49b y LAG-3 pueden usarse para aislar células Tr1 murinas, las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ se clasificaron y caracterizaron por FACS. Sin re-estimulación *in vitro*, las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ expresaron altos niveles de *Il10* y niveles muy bajos de *Il4*; la expresión de *Ilfng*, *Il2*, *Tnfa*, y *Il17a* fue significativamente menor que en las células T_H1 y T_H17 , respectivamente (Figura 9C). Tras la re-estimulación *in vitro*, las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ secretaron grandes cantidades de IL-10, que fueron de cinco a ocho veces más altas que IL-4, IL-17A, IL-2 y TNF- α (Figuras 3D y 9D), y cantidades significativas de IFN- γ (Figura 3D).

Las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ expresaron *Tbx21*, *Rorc*, y *Foxp3* en niveles significativamente más bajos que las células T_H1 , T_H17 , y Treg $Foxp3^+$, respectivamente. Los niveles de *Gata3* fueron similares a los de las células T_H1 y Treg $Foxp3^+$ (Figura 10). A pesar de la expresión de LAG-3, las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ expresaron niveles bajos de *Egr2*, un factor de transcripción críticamente implicado en el desarrollo de las células Tr1 $LAG-3^+$ productoras de IL-10 (Okamura et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106, 13974-13979). La expresión de *Ahr*, un factor de transcripción clave para la producción de IL-10 por las células Tr1 (Apetoh et al., 2010, Nat Immunol 11, 854-861), fue significativamente mayor en las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ en comparación con los otros subconjuntos de células analizados (Figura 10).

Las células T $CD4^+Foxp3^{RFP}CD49b^+LAG-3^+$ del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3 suprimieron las células T efectoras de una manera dependiente de la dosis *in vitro* (Figuras 4A y 11). Además, utilizando un modelo de IBD de transferencia de células T (Huber et al., 2011, Immunity 34, 554-565) (Figura 4B), se demostró que las células T $CD4^+Foxp3^{RFP}CD49b^+LAG-3^+$ suprimieron las células eT_H17 colitogénicas *in vivo* (Figuras 4C, 4D y 4E), de una manera dependiente de IL-10 (Figura 12).

Anteriormente se demostró que las células Tr1 se acumulaban en el bazo de ratones tolerantes trasplantados de islotes pancreáticos (Battaglia et al., 2006, Diabetes 55, 40-49; Gagliani et al., 2011, PLoS One 6, e28434). En el bazo de los ratones tratados con anti-CD3, se encontró una población de células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$ que contenían una alta frecuencia de células $IL-10^{eGFP+}$ (Figuras 13A y 13B), mostraban un perfil de citocinas Tr1 (Figuras 13C) y suprimían las respuestas de las células T *in vitro* de una manera parcialmente dependiente de IL-10 (Figuras 13D).

Como se demuestra en la presente memoria, las células T $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$, que se acumulan en el intestino y el bazo de los ratones tratados con anti-CD3, producen grandes cantidades de IL-10 y tienen una fuerte actividad supresora *in vitro* e *in vivo*. La co-expresión de CD49b y LAG-3 en células T $CD4^+$, por lo tanto, identifica las células Tr1 no solo en humanos sino también en ratones.

La coexpresión de CD49b y LAG-3 distingue las Tr1 de otras células T_H .

Para probar la especificidad de CD49b y LAG-3 como marcadores para las células Tr1, se analizó la expresión de estos marcadores en otras células T_H .

Los ratones reporteros $IL-4^{eGFP}$ fueron infectados con *N. brasiliensis* para examinar las células T_H2 . En este modelo, las larvas entran al pulmón 2-3 días después de la inyección subcutánea causando hemorragia e inflamación masiva (Chen et al., 2012, Nat Med 18, 260-266) (Figuras 14A y 14B). Dentro de los 9-10 días, los gusanos adultos son expulsados debido al desarrollo de las respuestas del tipo T_H2 (Wills-Karp et al., 2012, J Exp Med 209, 607-622; Mohrs et al., 2001, Immunity 15, 303-311). En el presente estudio, se demuestra que la mayoría de las células T_H2 ($CD4^+IL-4^{eGFP+}$) presentes en los ganglios linfáticos de drenaje (LNs) (Figuras 5A y 5D) y en los pulmones (Figuras 14C y 14E) no co-expresaron CD49b y LAG-3.

La infección por *N. brasiliensis* también induce una fuerte respuesta de IL-17 en los pulmones, lo que contribuye a la inflamación y daño tisular (Chen et al., 2012, Nat Med 18, 260-266). Se observó que tanto las células T_H17 ($CD4^+Foxp3^{RFP}IL-17A^{GFP+}$) como las células Tregs $Foxp3^+$ ($CD4^+Foxp3^{RFP}IL-17A^{GFP-}$) fueron inducidas por *N. brasiliensis*. Estas células se acumularon en los LNs de drenaje y en los pulmones y no co-expresaron CD49b y LAG-3 (Figuras 5A, 5C, 14C y 14E).

Para demostrar aún más que las células T_H17 no-coexpresan CD49b y LAG-3, estas células se aislaron del colon del modelo de IBD descrito anteriormente (Huber et al., 2011, Immunity 34, 554-565). Las células $Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP+}$ colitogénicas, que incluyen células T_H17 y una proporción significativa de células T_H1+T_H17 (Huber et al., 2011, Immunity 34, 554-565) y células T $CD4^+Foxp3^{RFP}IL-17A^{eGFP-}$, que contenían casi el 30-40% de las células T_H1 productoras de IFN- γ , expresaron CD49b, pero no LAG-3 (Figuras 14D y 14E). Además, las células T_H1 colitogénicas ($Foxp3^{RFP}IFN-\gamma^{Katushka+}$) no co-expresaron CD49b y LAG-3 (Figuras 14D y 14E).

Por lo tanto, como se demuestra en la presente memoria, a diferencia de las células Tr1, las células Th1, Th2, Th17, y Treg Foxp3⁺ no co-expresan CD49b y LAG-3 *in vivo*.

Durante la última fase de la infección por *N. brasiliensis* (día 10 después de la infección) la producción de IL-10 aumenta y contribuye a la resolución de la inflamación y, en consecuencia, al daño tisular (Chen et al., 2012, Nat Med 18, 260-266), lo que sugiere la inducción de células Tr1. Se encontraron células T CD4⁺Poxp3⁺IL-10⁺ en los LNs drenantes y en el pulmón de ratones infectados por *N. brasiliensis* (Figuras 5B, 5C, 14C y 14E). La gran mayoría de las células T CD4⁺Foxp3^{RFP}IL-10^{GFPbrillante} eran CD49b⁺LAG-3⁺ (Figuras 5B y Figura 14C). Además, las células T CD4⁺ que co-expresan CD49b y LAG-3 contenían la frecuencia más alta de las células IL-10^{GFP+} con el MFI más alto (Figuras 5D y 5E). Las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ clasificadas por FACS de los LNs drenantes de ratones infectados expresaron altos niveles de mRNA *Il10* (Figura 15S) y suprimieron la proliferación de células T CD4⁺ efectoras *in vitro* (Figura 5F). En particular, durante la infección por helmintos en la que la concentración de citosinas del tipo Th2 está particularmente mejorada en células innatas y adaptativas, las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ expresaron mRNA de *Il4*, *Il13*, y *Gata3* a niveles comparables a los expresados por las células Treg Foxp3⁺, pero significativamente más bajos que las de las células Th2 (Figura 15A). La expresión de *Ahr* en las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ fueron altas, pero no selectivas.

Siete días después de la infección por *N. brasiliensis* las células Tr1 se acumularon tanto en los pulmones como en los LNs drenantes (Figuras 15B y 15C), lo cual está de acuerdo con el papel descrito de IL-10 durante la resolución de la infección (Chen et al., 2012, Nat Med 18, 260-266). La frecuencia de las células Tr1 (Figuras 15B y 15C) disminuyó en ratones infectados con el tiempo, pero CD49b y LAG-3 se co-expresaron de manera estable por las células CD4⁺Foxp3^{RFP}IL-10^{GFPbrillante} (Figuras 15B y 15C).

La expresión y estabilidad de CD49b y LAG-3 en células Tr1 también se confirmó en células Tr1 diferenciadas *in vitro* con IL-27 y TGF- β . Las células Tr1 expresaron *Il10* y *Ahr* en niveles significativamente más altos que las células Th1, Th2, Th17 y células iTreg diferenciadas *in vitro* (Figura 16A). Similar a las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ del intestino delgado de ratones tratados con anti-CD3, la expresión de *Erg2*, *Gata3*, *Rorct*, *Tbx21*, y *Foxp3* fue baja o indetectable en células Tr1 inducidas *in vitro* (Figura 16A). Curiosamente, la mayoría de las células Tr1 inducidas por IL-27 eran CD49b⁺LAG-3⁺ (Figura 16B y 16C) y la expresión de CD49b/LAG-3 se mantuvo estable *in vitro* en células Tr1 productoras de IL-10 (Figuras 17A y 17B). En particular, después de la transferencia *in vivo*, las células Tr1 que mantuvieron la expresión de IL-10 de manera estable permanecieron como células CD49b⁺LAG-3⁺ (Figuras 18A y 18B).

Por tanto, los estudios presentados en la presente memoria demuestran que CD49b y LAG-3 se co-expresan de forma selectiva y estable por las células Tr1 productoras de IL-10, pero no por las células Th1, Th2, Th17, y las células Treg Foxp3⁺.

Aplicación clínica de marcadores de superficie específicos de células Tr1

Para generar células Tr1 *in vitro* para uso terapéutico, las células T humanas se polarizaron en presencia de IL-10. La población de células resultante contiene solo una pequeña proporción de células Tr1 y está contaminada por una gran fracción de células T no productoras de IL-10 (Bacchetta et al., 2010, Haematologica 95, 2134-2143). Utilizando los protocolos descritos anteriormente para diferenciar células Tr1 humanas *in vitro* (Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662; Levings et al., 2001, J Immunol 166, 5530-5539; Gregori et al., 2010, Blood 116, 935-944; Gregori et al., 2011, Methods in molecular biology 677, 31-46), se demostró que la frecuencia de células T que co-expresan CD49b y LAG-3 fue significativamente mayor en células polarizadas con Tr1 (Figuras 6A y Figura 6B y 19A), en comparación con células Th0. Las células T CD49b⁺LAG-3⁺ clasificadas por FACS a partir de células polarizadas con Tr1 secretaron niveles significativamente más altos de IL-10 (Figura 6C) y mostraron una mayor capacidad supresora en relación con la población bruta original (Figuras 6D y 19B), lo que indica que CD49b y LAG-3 pueden usarse para purificar las células Tr1 a partir de células polarizadas *in vitro*.

La frecuencia de las células T CD49b⁺LAG-3 se evaluó en una cohorte única de sujetos β -talasémicos en los que el quimerismo mixto persistente (PMC) de las células del donante y del huésped después de un HSCT alogénico se correlaciona con la tolerancia y la presencia de células CD4⁺IL-10⁺ circulantes (Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426). Las células CD49b⁺LAG-3⁺ circulantes fueron significativamente más altas en sangre periférica de sujetos con PMC (Andreani et al., 2011, Quimerismo 2, 21-22; Andreani et al., 2011, Haematologica 96, 128-133) en comparación tanto con HDs como con sujetos con quimerismo completo (CC) (Figuras 6E y 6F). El análisis estadístico confirmó que el porcentaje de células T CD49b⁺LAG-3⁺ pueden usarse para discriminar sujetos tolerantes de controles (HDs o CC) (Figuras 20A y 20B). Estos hallazgos demuestran que la expresión concomitante de CD49b y LAG-3 permite el aislamiento de células Tr1 a partir de poblaciones polarizadas con Tr1 *in vitro* y rastrear las células Tr1 *in vivo* en sujetos tolerantes.

Co-expresión de CD49b y LAG-3b

Los estudios presentados en la presente memoria demuestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 identifica células Tr1 humanas y murinas. Las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ secretan grandes cantidades de IL-10, muestran una alta proporción de IL-10/IL-4 e IL-10/IL-17, expresan niveles altos de CD226, no expresan Foxp3 alto y poseen

una fuerte actividad reguladora dependiente de IL-10. La expresión concomitante de CD49b y LAG-3 es específica para las células Tr1, ya que las células T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} y las células Treg Foxp3⁺ no co-expresan estos marcadores. La co-expresión de CD49b y LAG-3 se puede utilizar para purificar células Tr1 humanas *in vitro* a partir de cultivos de células polarizadas con Tr1 y permite el rastreo de células Tr1 en sujetos tolerantes.

La expresión de CD49b se ha descrito previamente en células T CD4⁺ de memoria efectoras (Kassiotis et al., 2006, J Immunol 177, 968-975), células T_{H17} (Boisvert et al., 2010, Eur J Immunol 40, 2710-2719) y células T productoras de IL-10 (Charbonnier et al., 2006, J Immunol 177, 3806-3813; Rahmoun et al., 2006, Int Arch Allergy Immunol 140, 139-149). Los datos actuales muestran que CD49b se expresa en células Tr1, pero también en células T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} y células Treg Foxp3. LAG-3 se expresa en células T esplénicas aisladas de ratones nativos con función reguladora y se correlaciona con la producción de IL-10 (Okamura et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106, 13974-13979; Huang et al., 2004, Immunity 21, 503-513). Sin embargo, las células T activadas también expresan LAG-3 (Workman and Vignali, 2005, J Immunol 174, 688-695; Bettini et al., 2011, J Immunol 187, 3493-3498; Bruniquel et al., 1998, Immunogenetics 48, 116-124; Lee et al., 2012, Nat Immunol 13, 991-999; Huard et al., 1997, Proc Natl Acad Sci U S A 94, 5744-5749). Se muestra que las células T murinas y humanas que expresan LAG-3 pero no CD49b producen IL-4, bajas cantidades de IL-10, son altamente proliferativas y no muestran una actividad supresora significativa *in vitro*.

Por lo tanto, el uso de CD49b solo o LAG-3 solo, no es suficiente para seleccionar una población altamente enriquecida de células Tr1 funcionales, o para distinguir estas células de otros subconjuntos de células T_H o Treg. En la presente memoria se demuestra que la combinación de CD49b y LAG-3 es necesaria para identificar y seleccionar células Tr1 murinas y humanas, que secretan altos niveles de IL-10 y tienen actividad reguladora *in vitro* e *in vivo*. Tanto CD49b como LAG-3 se expresan de forma estable en células Tr1 funcionales. CD49b se expresa en células Tr1 independientemente de su activación, mientras que LAG-3 se expresa en células Tr1 cuando producen IL-10 y muestran actividad supresora. La co-expresión de CD49b y LAG-3 distingue las células Tr1 de las células T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} durante la infección por helmintos y IBD.

La identificación de las células Tr1 en pacientes se ha visto limitada por su capacidad para producir IL-10 solo tras la re-estimulación *in vitro* (Bacchetta et al., 1994, J Exp Med 179, 493-502; Meiler et al., 2008, J Exp Med 205, 2887-2898; Petrich de Marquesini et al., 2010, Diabetologia 53, 1451-1460; Sanda et al., 2008, Clin Immunol 127, 138-143). Además, el análisis de citometría de flujo intracelular de la expresión de IL-10 es insensible y muy variable según el tipo de estímulo. Alternativamente, la clonación de células T de células T CD4⁺ circulantes permite la enumeración de células Tr1 productoras de IL-10 en sujetos tolerantes (Bacchetta et al., 1994, J Exp Med 179, 493-502; Gregori et al., 2011, Methods in molecular biology 677, 31-46). Utilizando estas técnicas, se demostró previamente que las altas frecuencias de células T productoras de IL-10 y de clones de células Tr1 en sangre periférica de sujetos trasplantados con HSCT alogénico se correlacionaban con quimerismo mixto persistente y tolerancia (Bacchetta et al., 1994, J Exp Med 179, 493-502; Serafini et al., 2009, Haematologica 94, 1415-1426). Se muestra en la presente memoria que en estos sujetos tolerantes la frecuencia de las células T CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ aumenta significativamente. El análisis estadístico muestra diferencias significativas en los porcentajes de células T CD49b⁺LAG-3⁺ en sujetos tolerantes frente a los grupos de control. Ya que las células T CD49b⁺LAG-3⁺ son células T supresoras productoras de IL-10, estos datos indican que se puede controlar la frecuencia de las células Tr1 *in vivo* usando estos marcadores.

Las terapias reguladoras basadas en células T se han convertido en una opción terapéutica atractiva para inducir/restaurar la tolerancia. Se han desarrollado varios protocolos para generar y expandir células Tr1 *in vitro* (Bacchetta et al., 2010, Haematologica 95, 2134-2143; Brun et al., 2009, Int Immunopharmacol 9, 609-613), y recientemente se han completado pruebas de ensayos clínicos de principio que demuestran la seguridad y viabilidad de la infusión de células Tr1 (Bacchetta et al., 2009, Blood, 45 (ASH Annual Meeting Abstract; Desreumaux et al., 2012, Gastroenterology 143, 1207-1217 e 1201-1202). Sin embargo, la preparación celular que consiste en células T anergizadas con IL-10 específicas de antígeno generadas con IL-10 recombinante o DC-10 (Gregori et al., 2010, Blood 116, 935-944; Bacchetta and Gregori, 2010, Hematologica 95, 2134-2143) todavía contiene un subconjunto de células no Tr1 contaminantes, que podrían exacerbar potencialmente la condición clínica patógena de los pacientes. Los datos presentados en la presente memoria muestran que la co-expresión de CD49b y LAG-3 permite el aislamiento de células Tr1 a partir de poblaciones polarizadas con Tr1 *in vitro* y de células T anergizadas con IL-10 específicas de antígeno, lo que hace que su uso clínico sea más seguro y amplía su aplicación clínica.

En resumen, se han descubierto dos marcadores selectivos para las células Tr1 que se conservan en ratones y humanos. Estos marcadores permiten estudiar la localización de las células Tr1 *in vivo* en condiciones fisiológicas, así como el papel de las células Tr1 en sujetos con enfermedades inmunomediadas en las que se ha propuesto un defecto en las células Tr1.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para aislar una población enriquecida de células Tr1 de una muestra biológica de un sujeto, que comprende las etapas de:

a. obtener una muestra biológica de un sujeto que contiene células T,

5 b. aislar las células de la muestra biológica del sujeto que expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3 y que son CD45RA negativos.

2. El método in vitro de la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de aislar células de la muestra biológica del sujeto que expresan el marcador de superficie celular CD226, preferiblemente las células que expresan el marcador de superficie celular CD226 a un nivel mayor que el nivel de CD226 expresado por una población de células comparadoras en la que dicha población de células comparadoras es al menos una seleccionada del grupo que consiste en células T CD49b⁺LAG-3⁻ y células T_H0.

3. El método in vitro de la reivindicación 1, en el que más del 90% de las células en la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, y CD49b y LAG-3, preferiblemente más del 95% de las células en la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4 y CD49b, y LAG-3, preferiblemente más del 98% de las células en la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4 y CD49b, y LAG-3, preferiblemente más del 99% de las células en la población enriquecida de células Tr1 expresan los marcadores de superficie celular CD4, CD49b y LAG-3.

4. El método in vitro de la reivindicación 1, en el que el aislamiento de células de la muestra biológica del sujeto emplea el uso de anticuerpos que se unen específicamente a los marcadores de superficie celular o emplea el uso de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), en el que los marcadores de superficie celular son CD4, CD49b y LAG-3.

5. El método in vitro de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es al menos una seleccionada del grupo que consiste en sangre, médula ósea, sangre del cordón, linfa, timo y bazo.

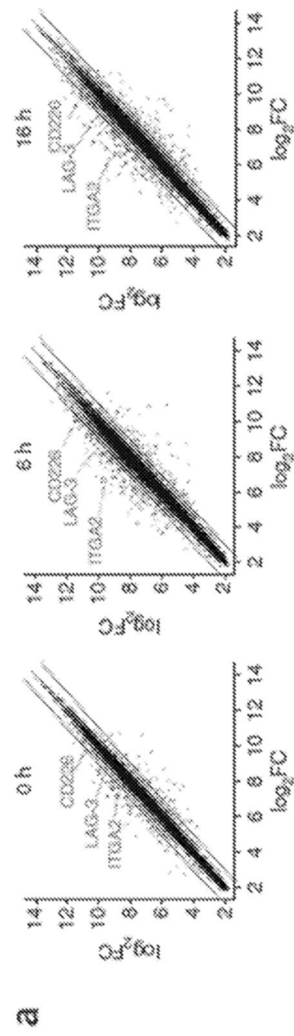


Figura 1A

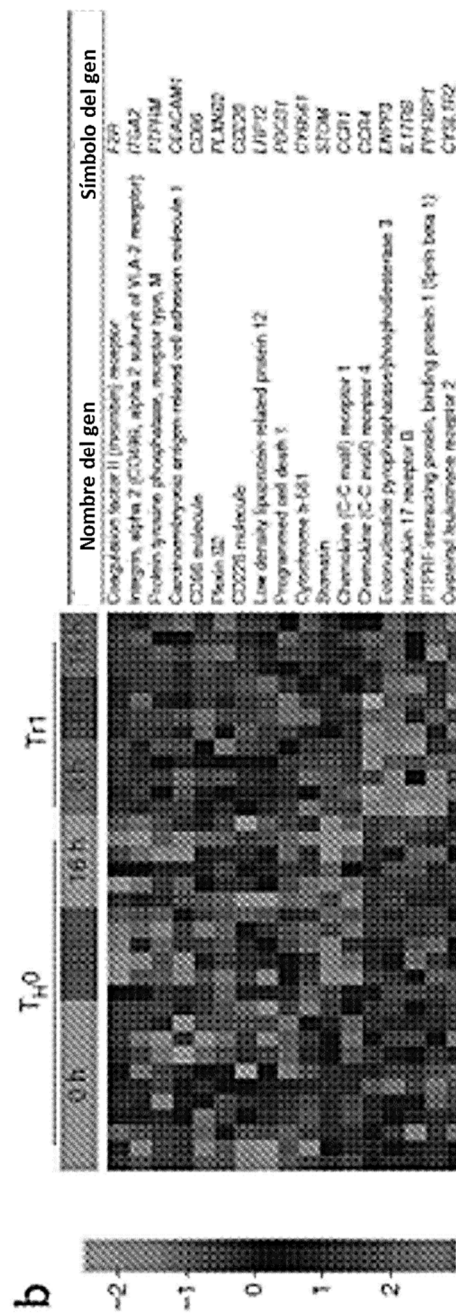


Figura 1B

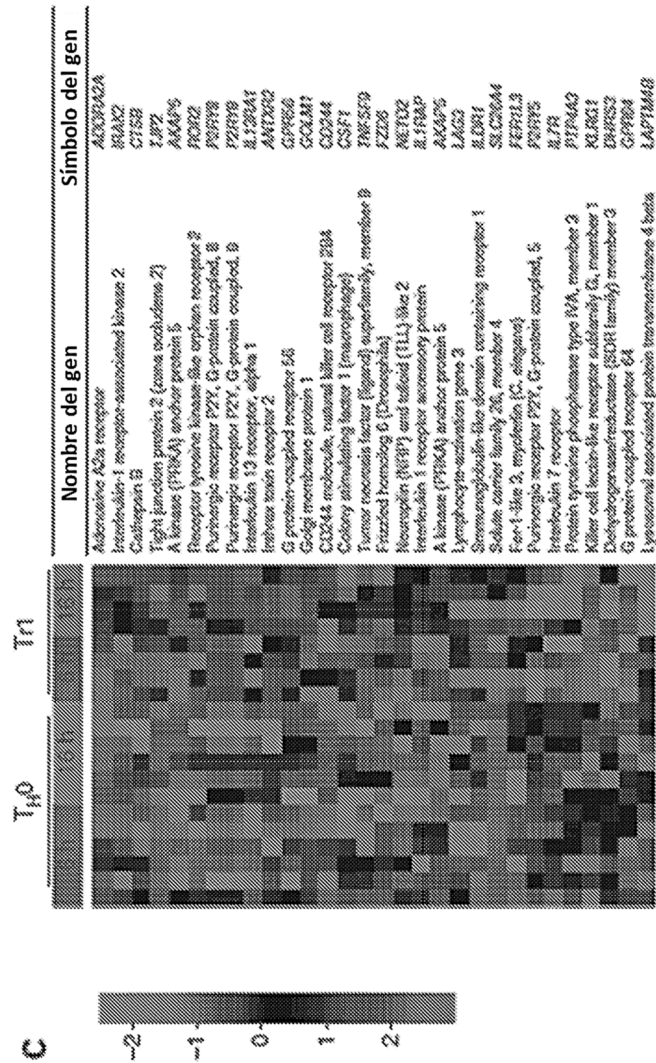


Figura 1C

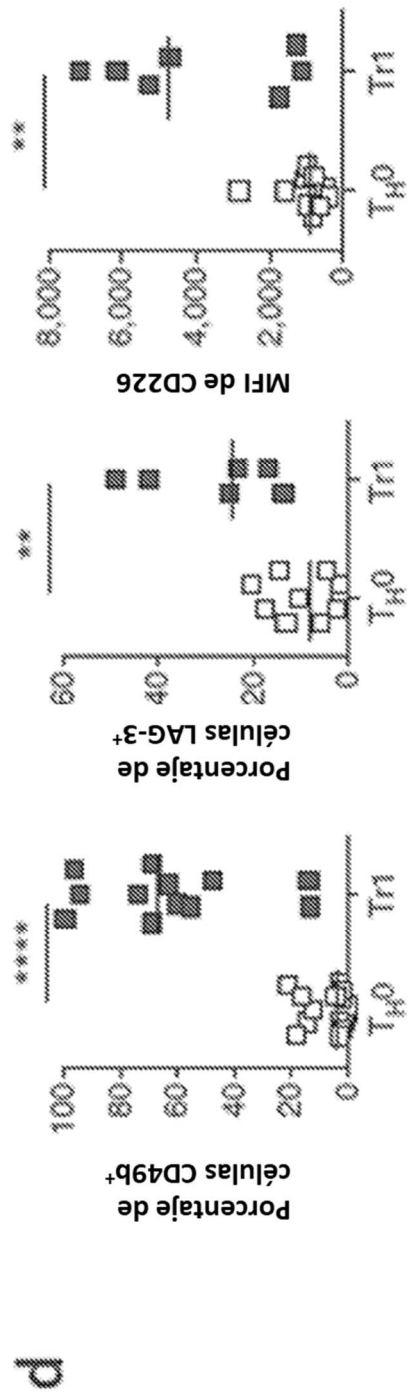


Figura 1D

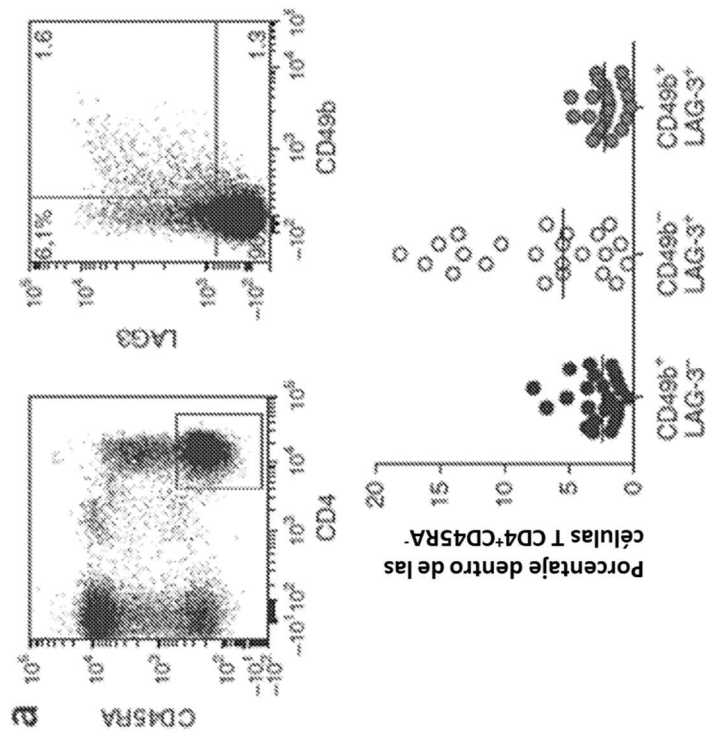


Figura 2A

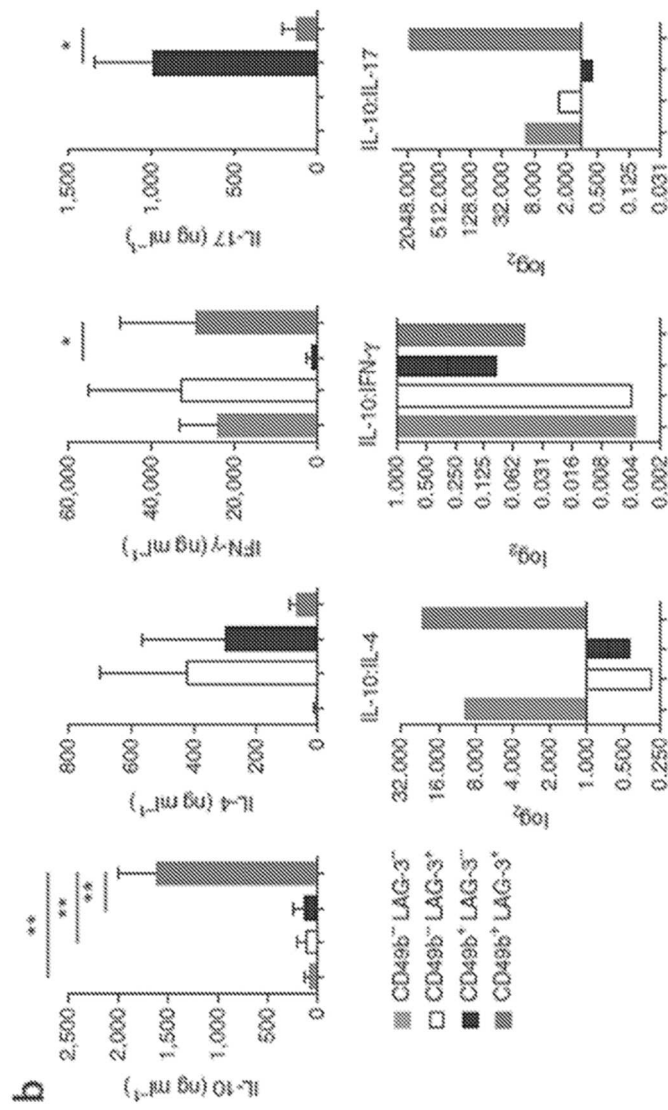


Figure 2B

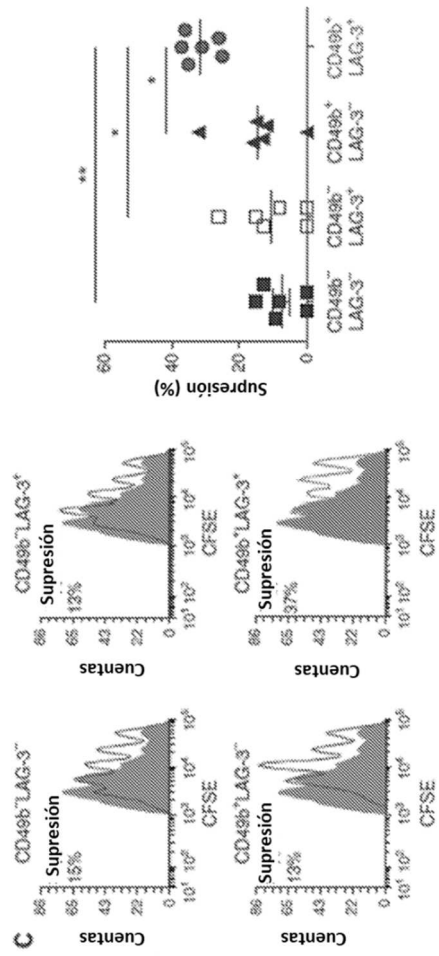


Figura 2C

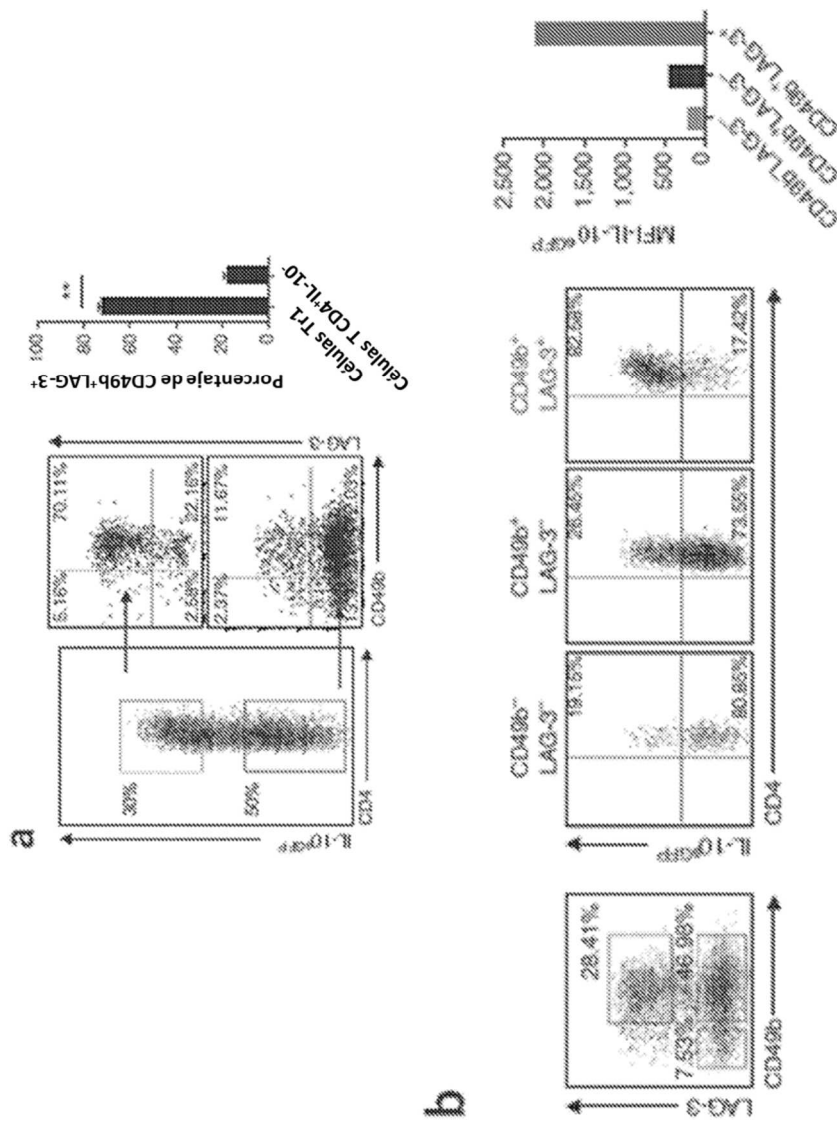
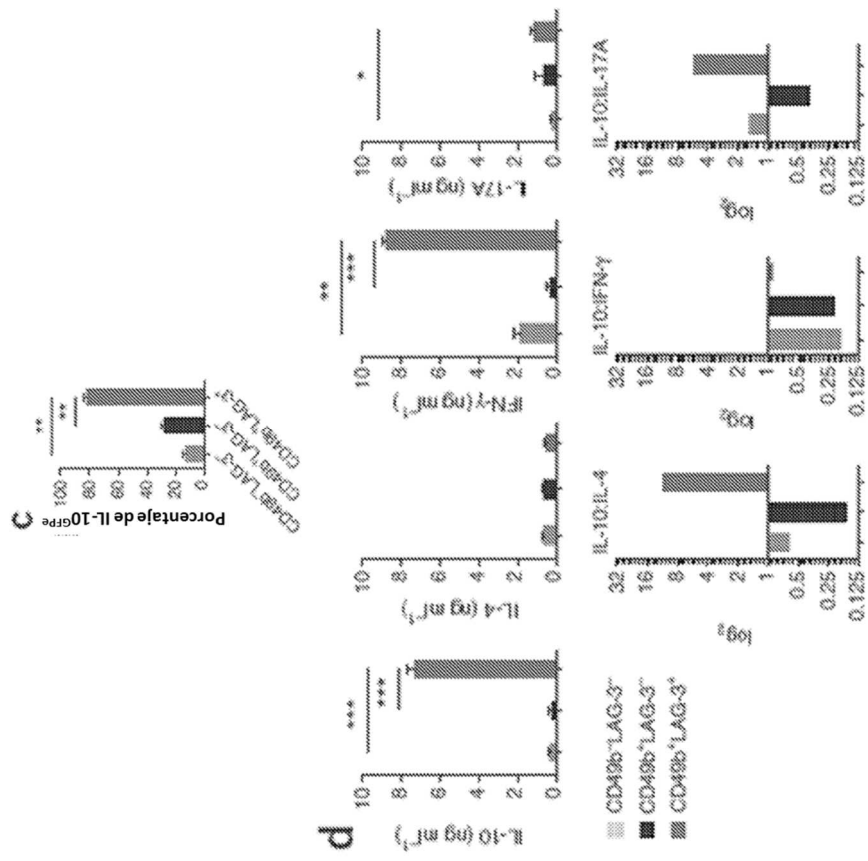


Figura 3A-3B



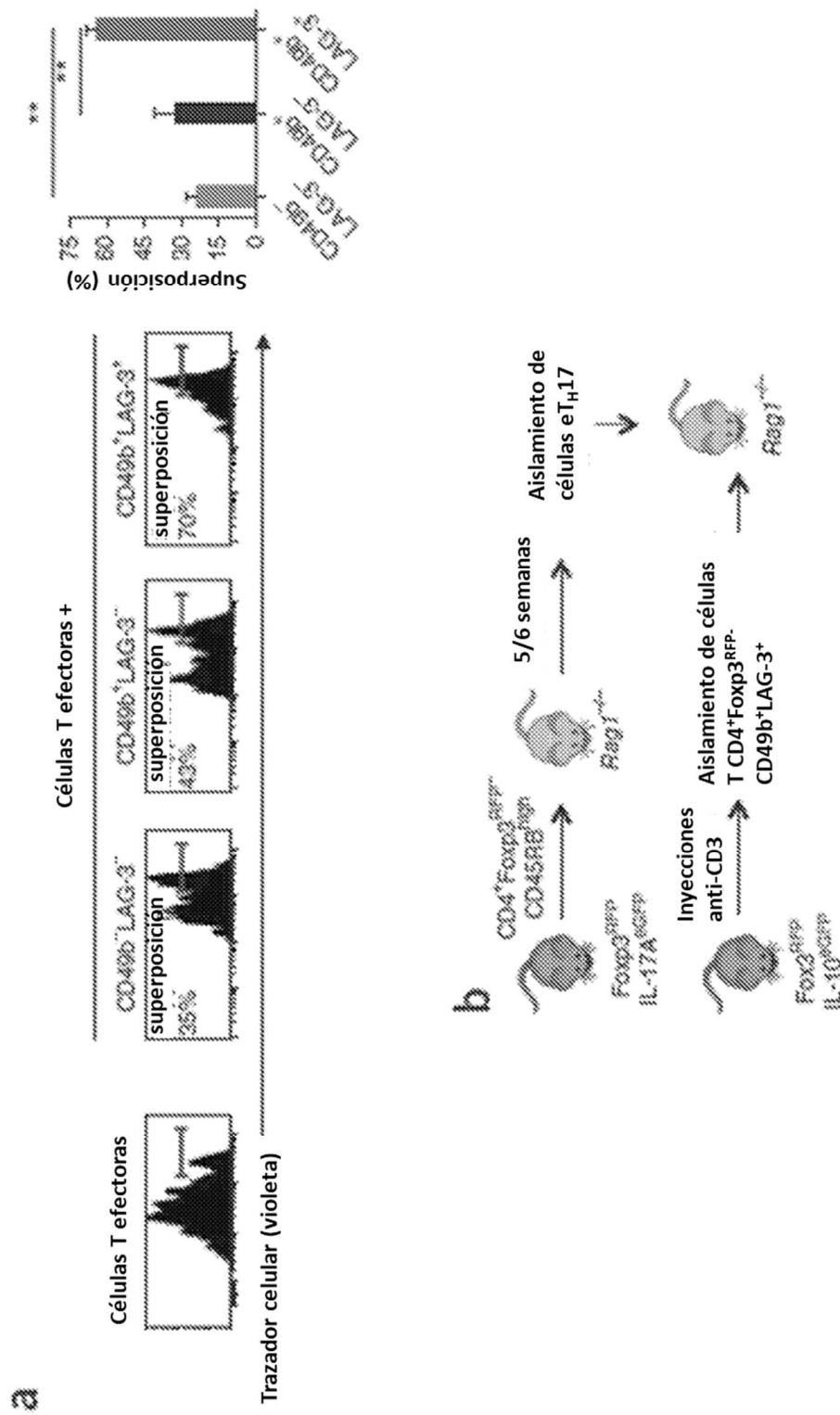


Figura 4A-4B

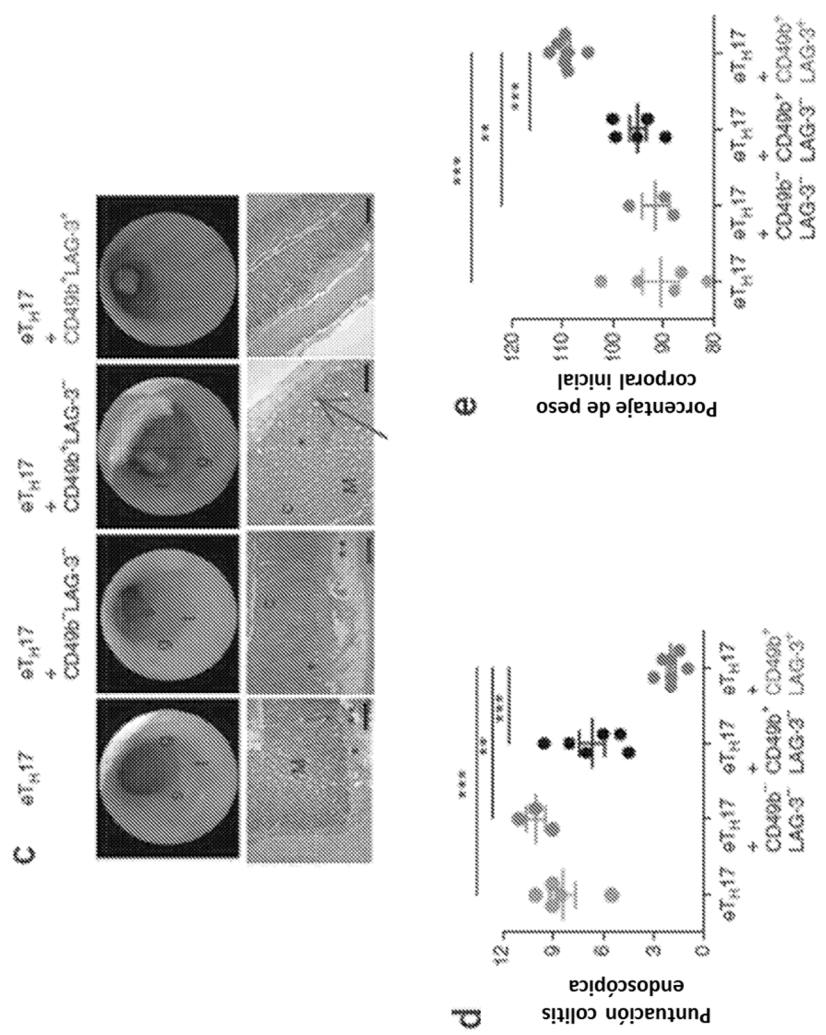


Figura 4C-4E

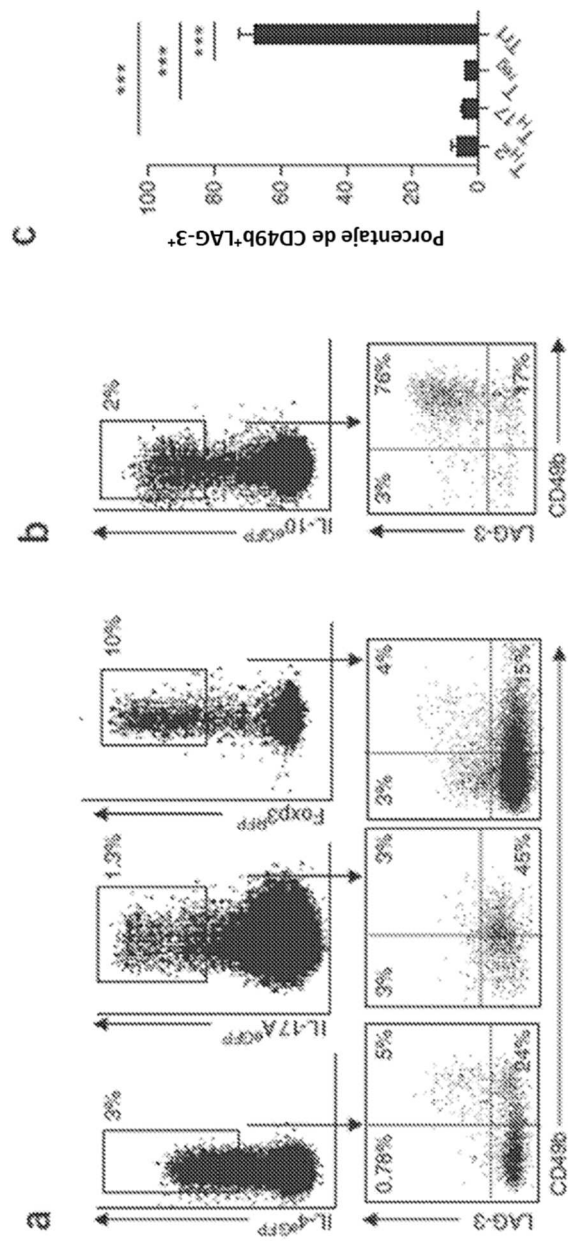


Figura 5A-5C

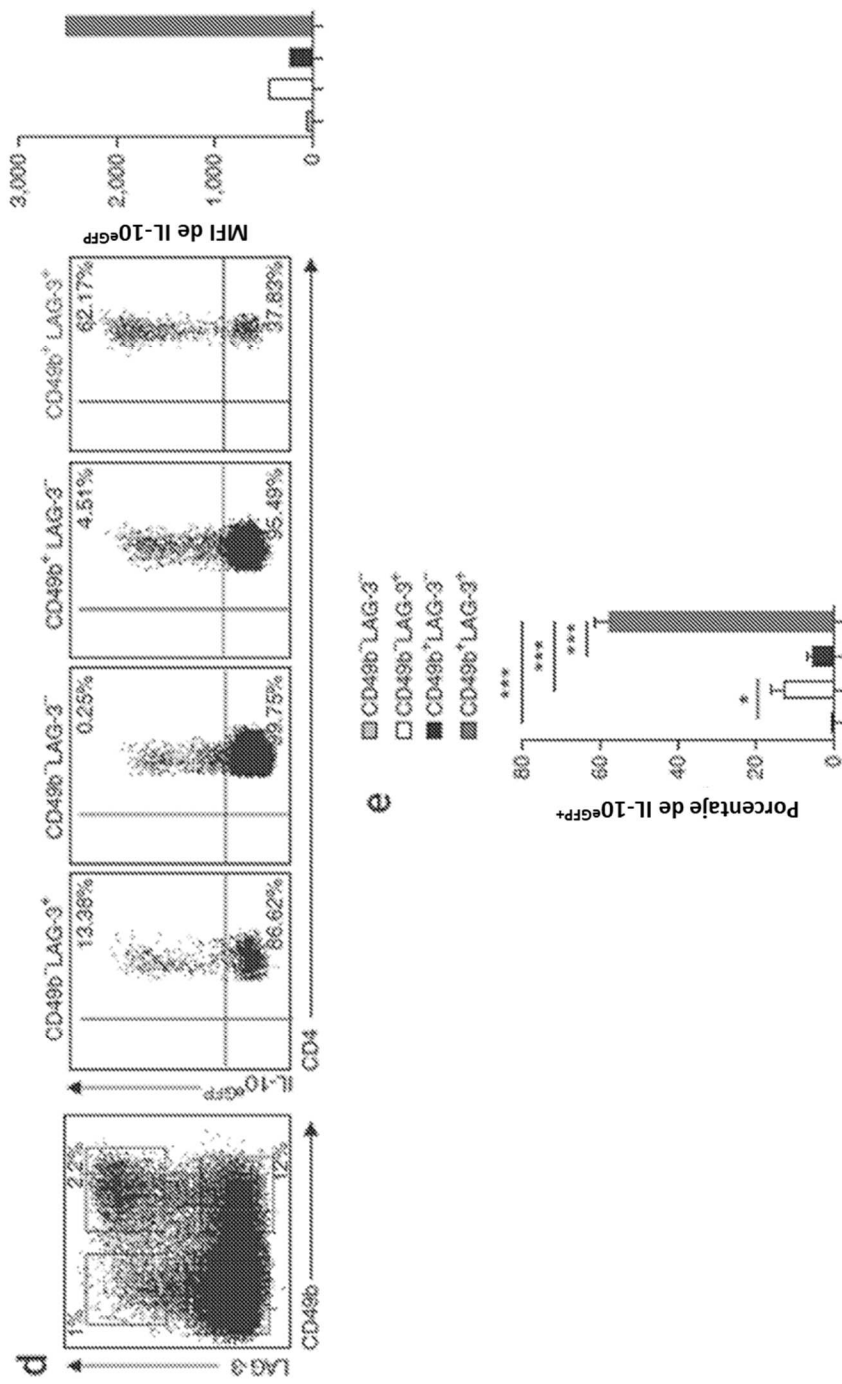


Figura 5D-5E

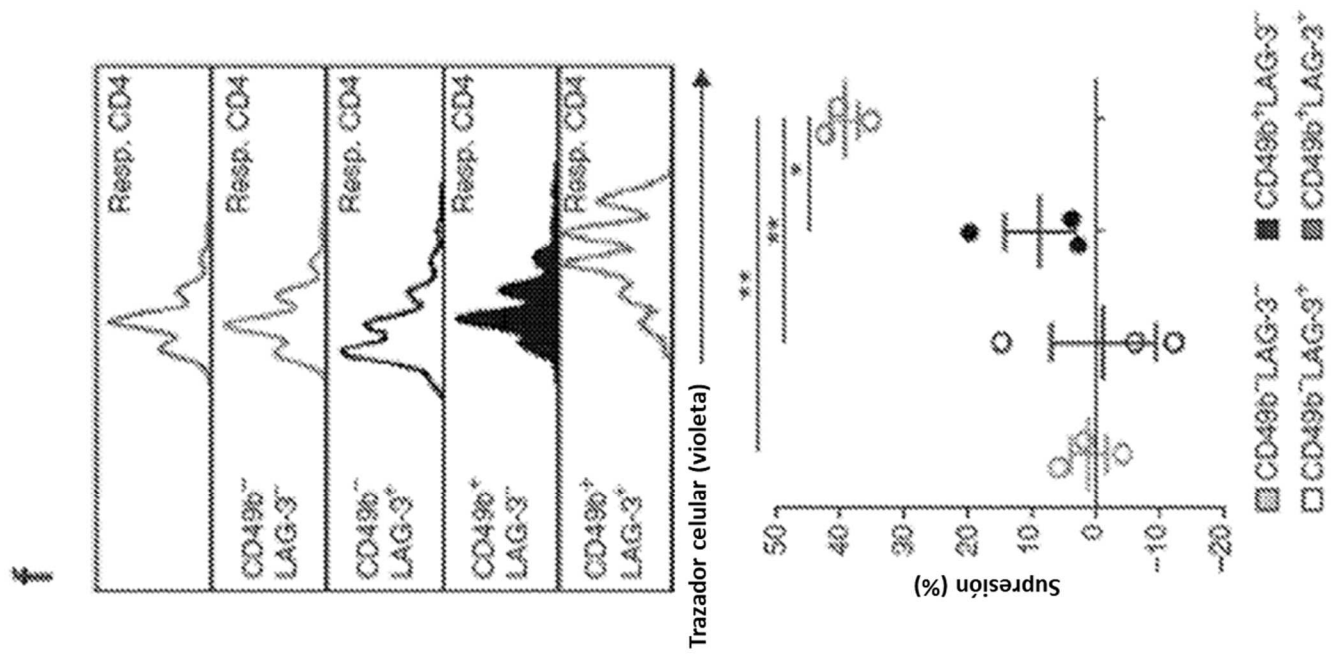


Figura 5F

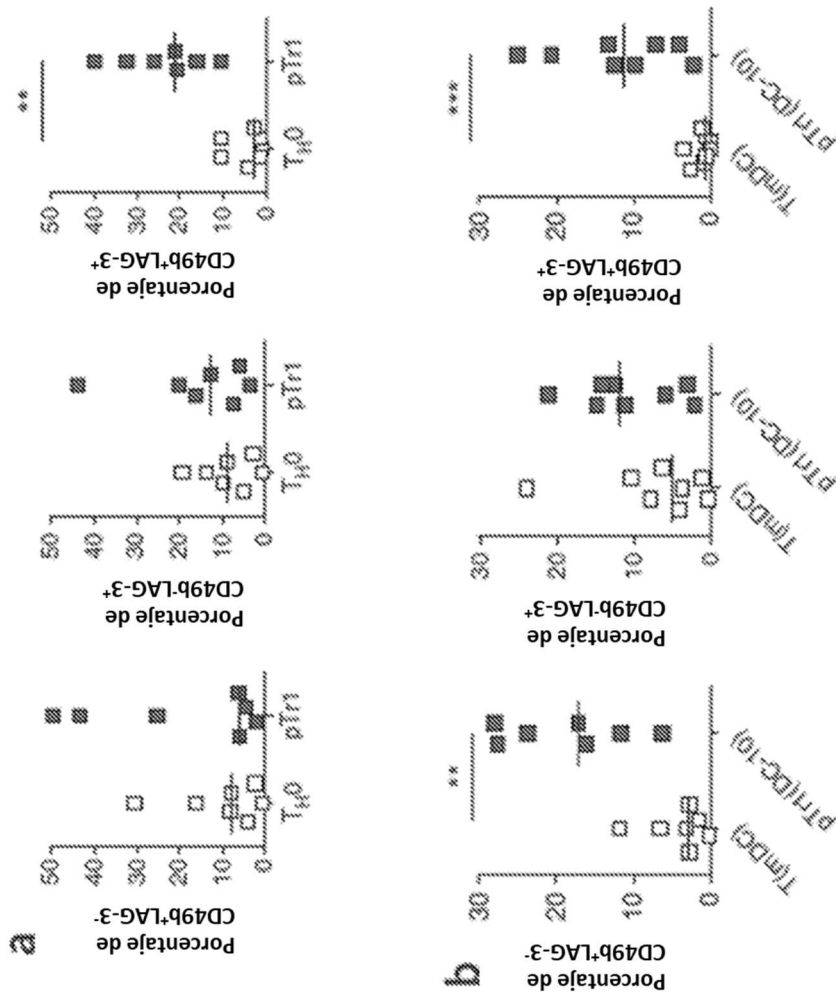


Figura 6A-6B

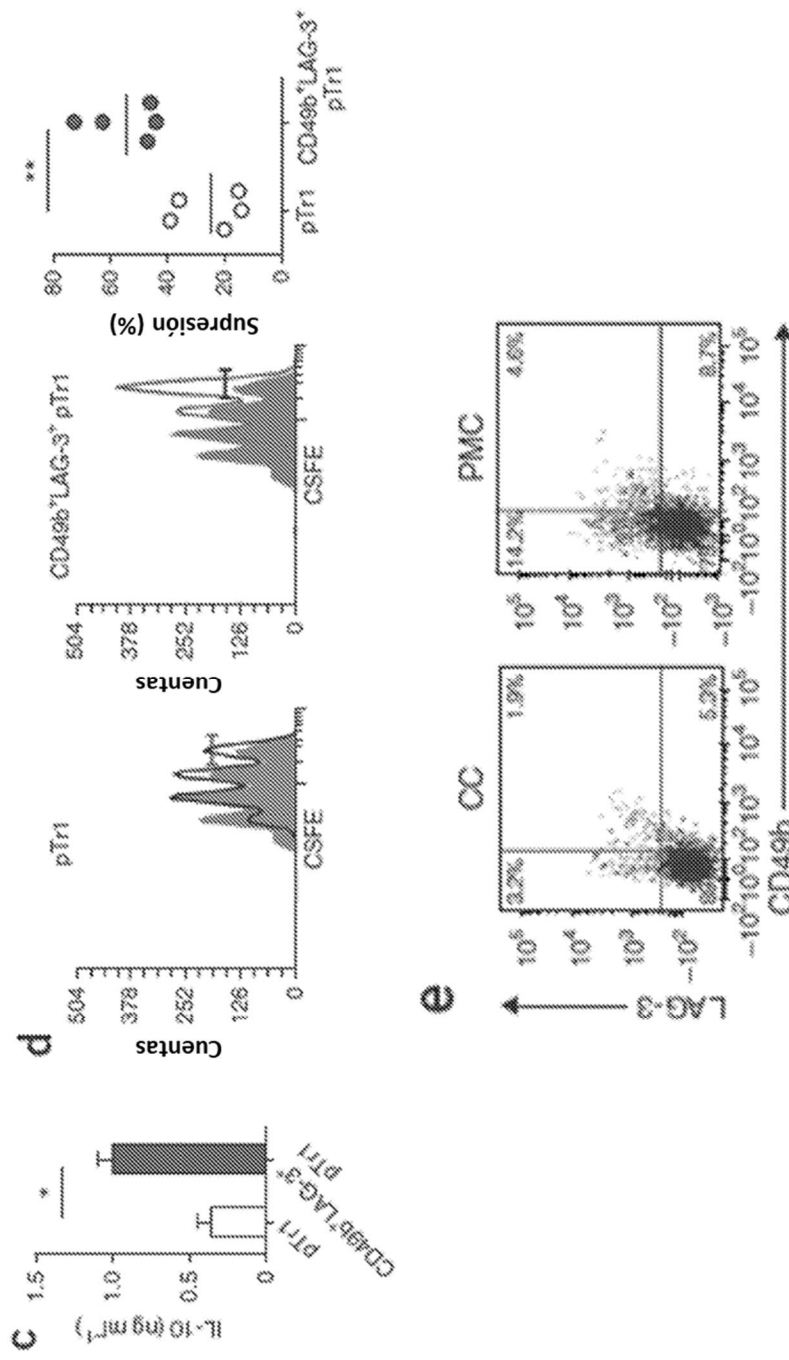


Figura 6C-6D

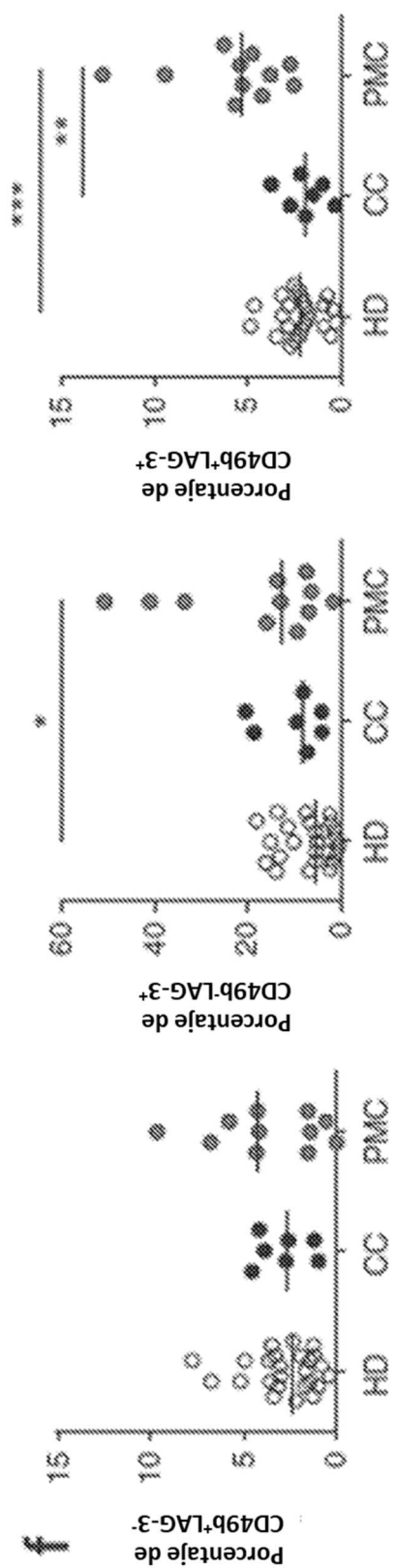


Figura 6F

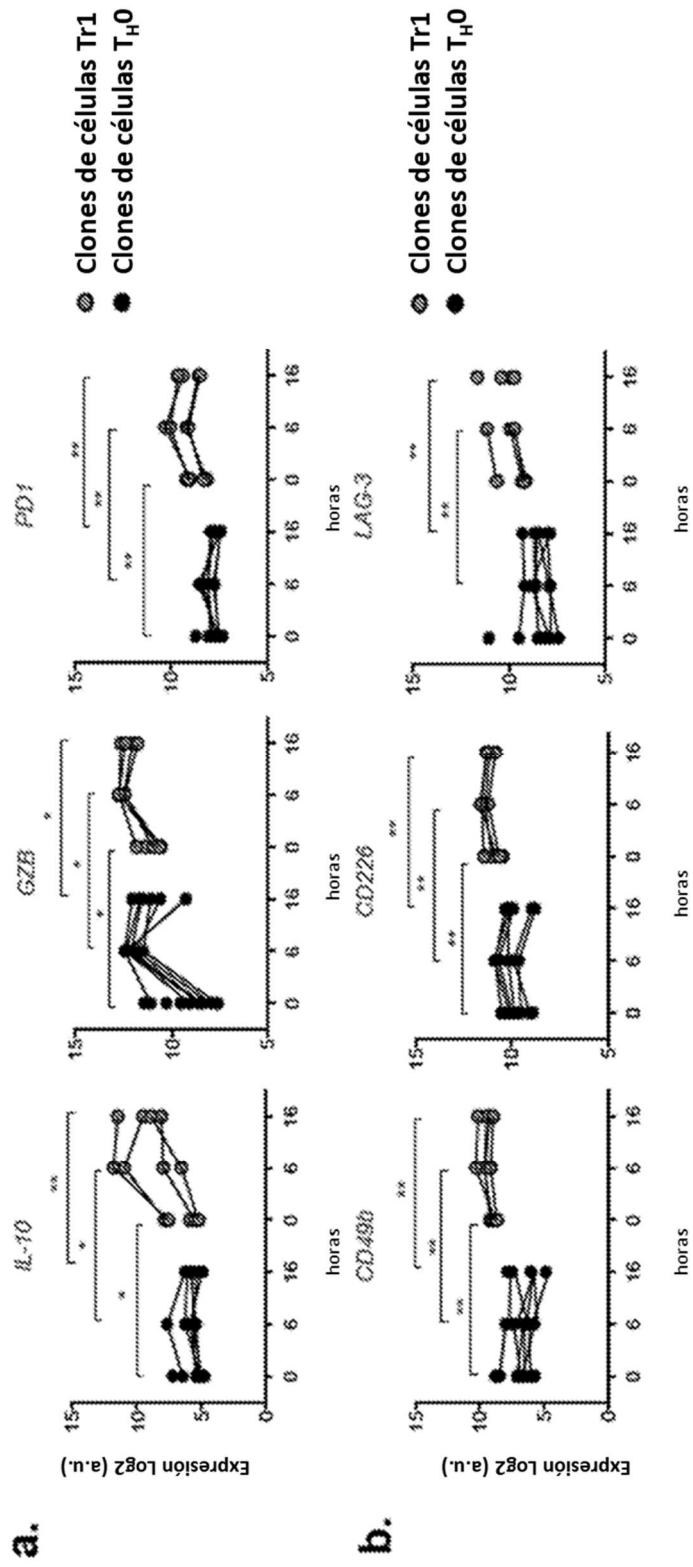


Figura 7A-7B

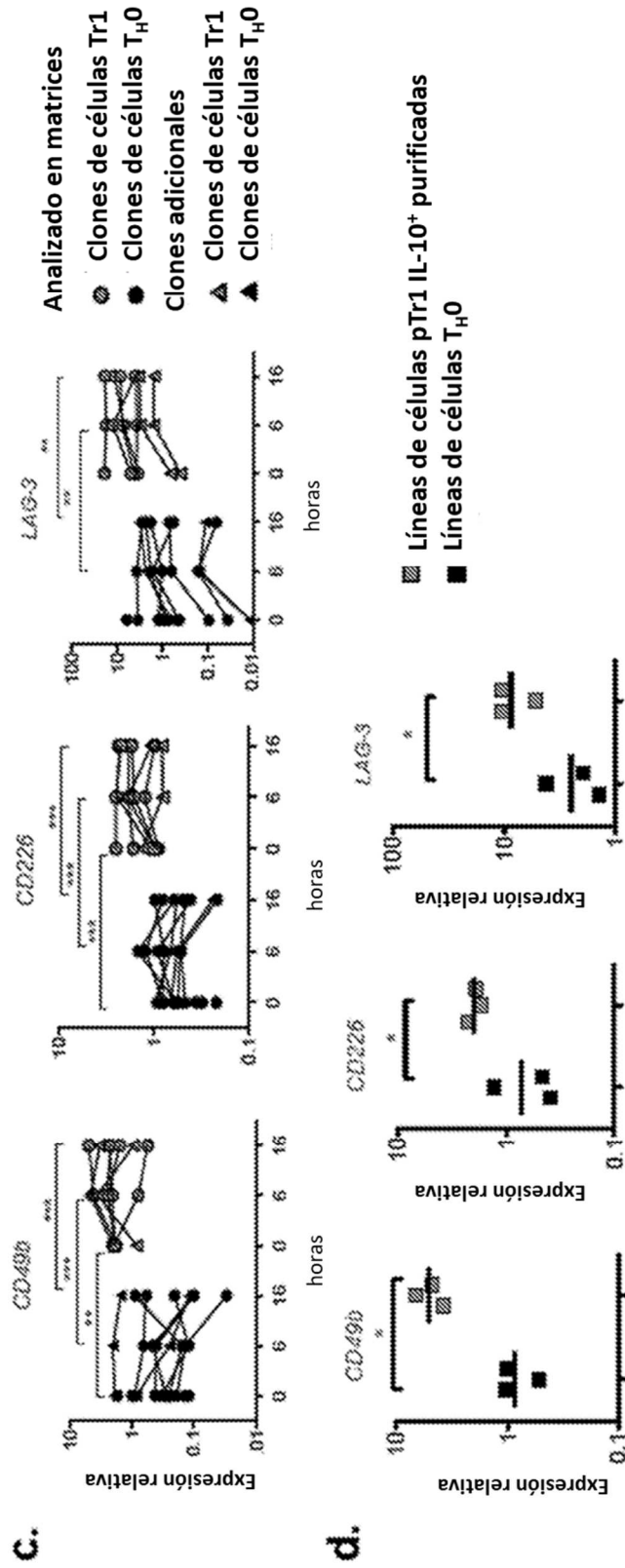


Figura 7C-7D

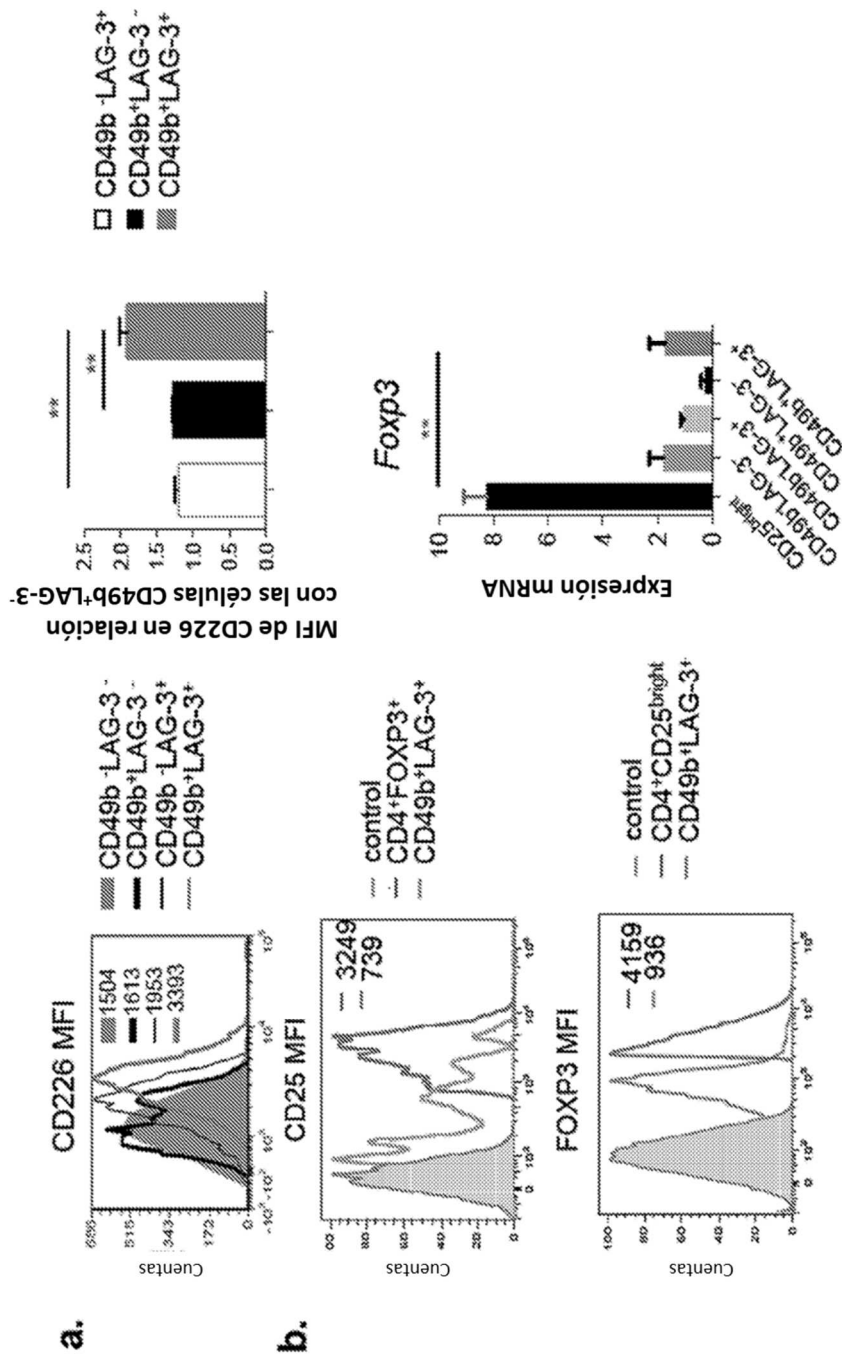


Figura 8A-8B

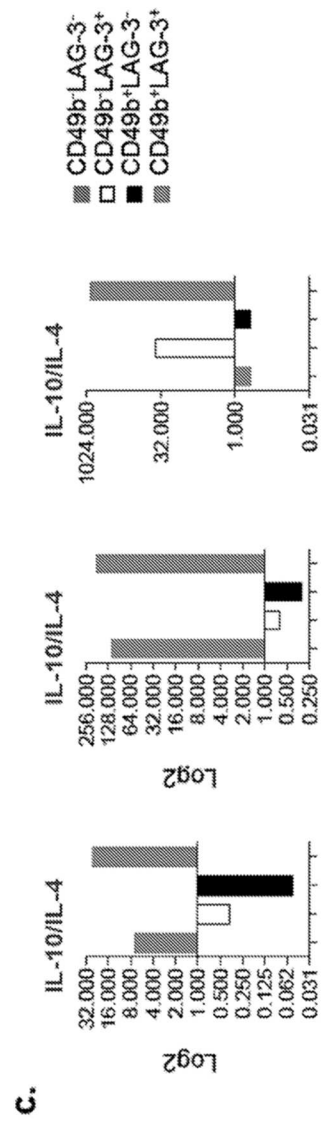


Figura 8C

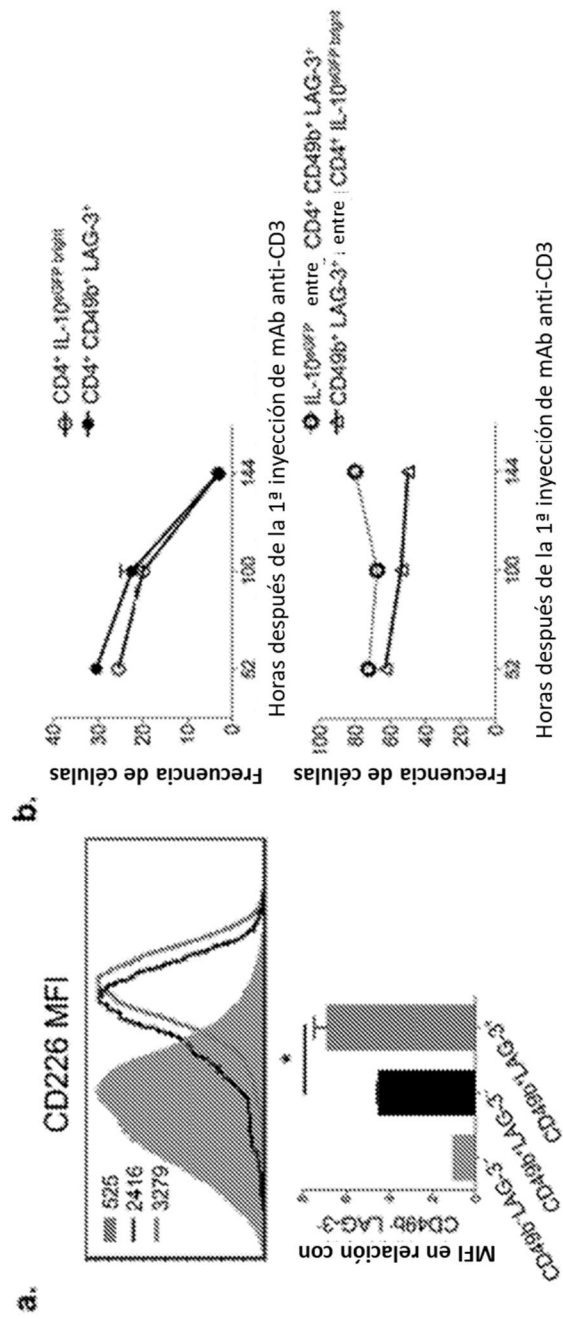


Figura 9A-9B

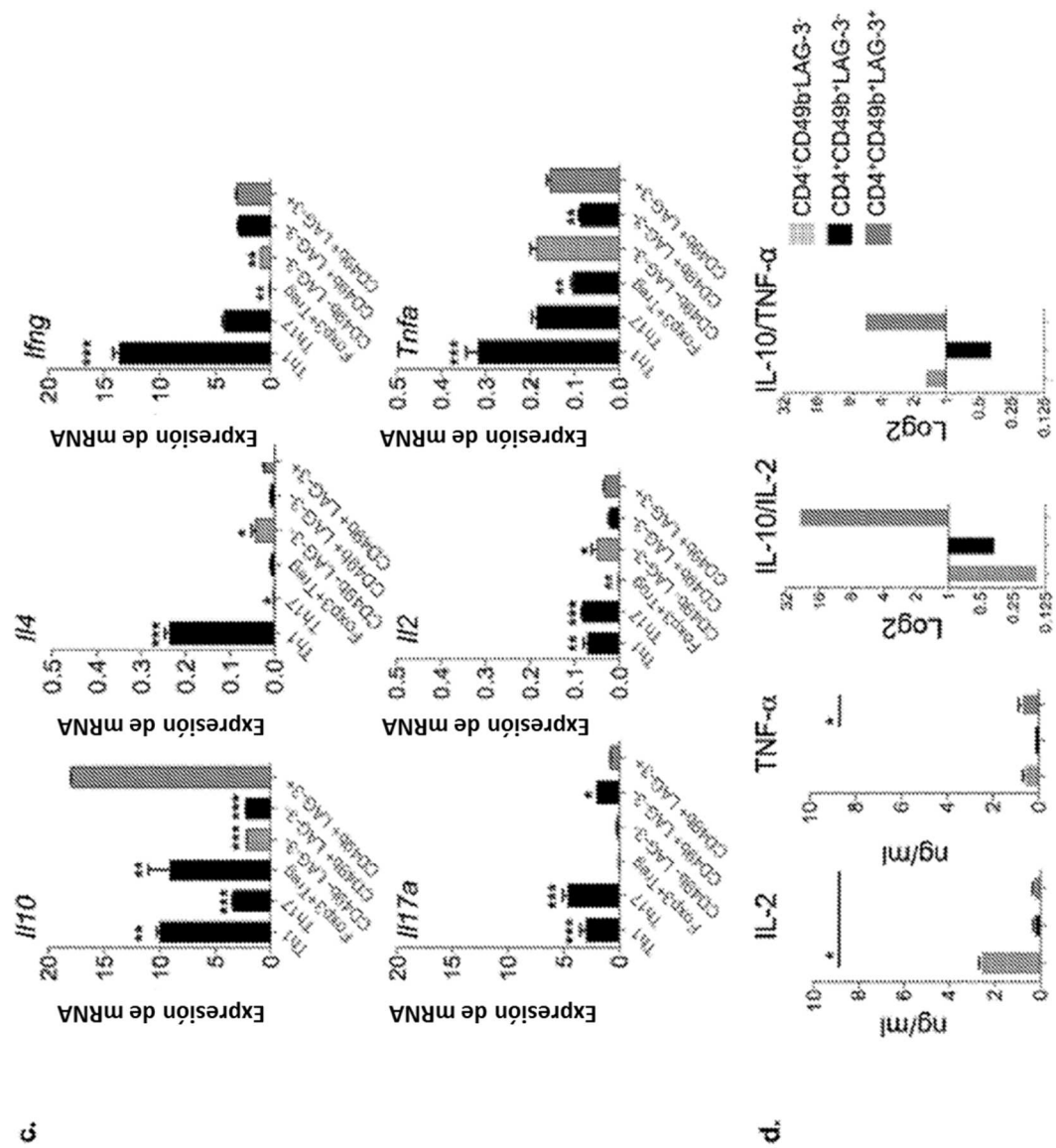


Figura 9C-9D

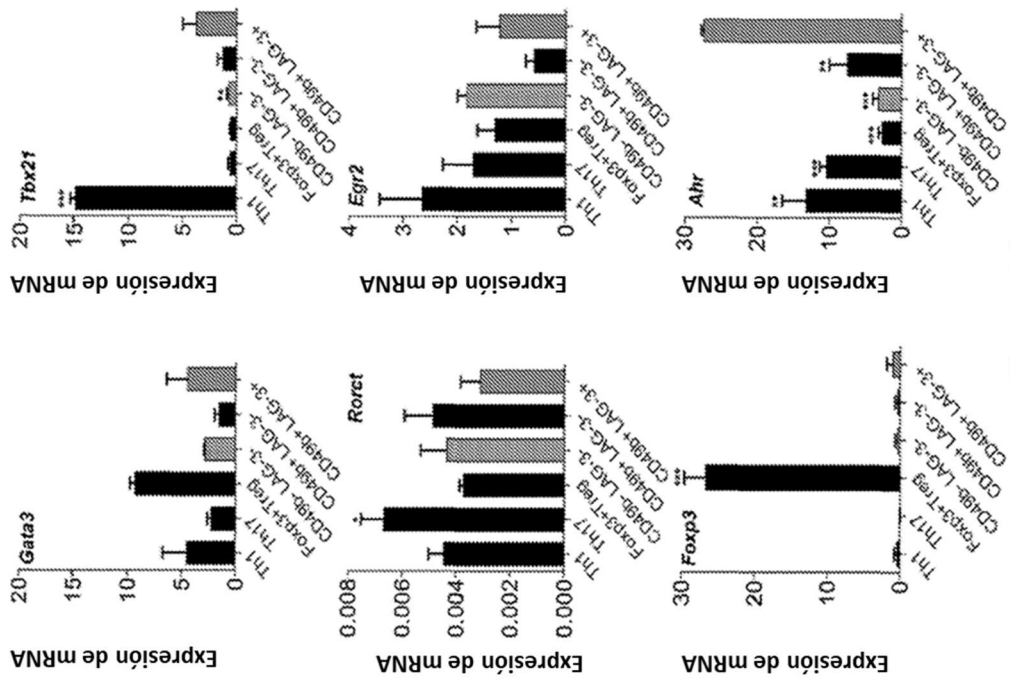


Figura 10

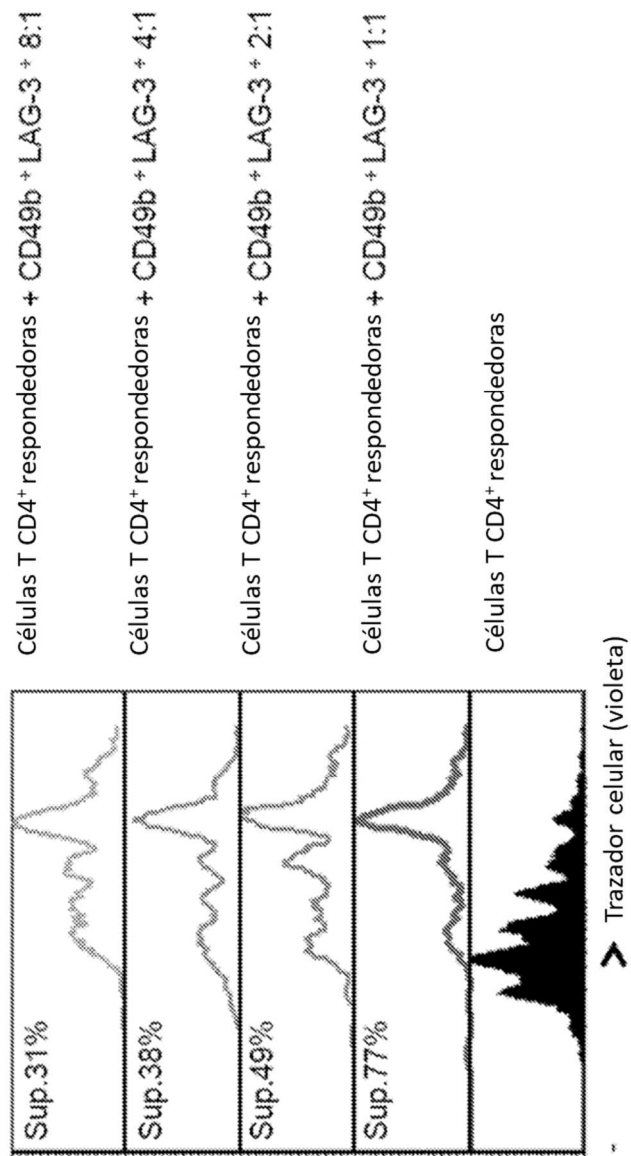


Figura 11

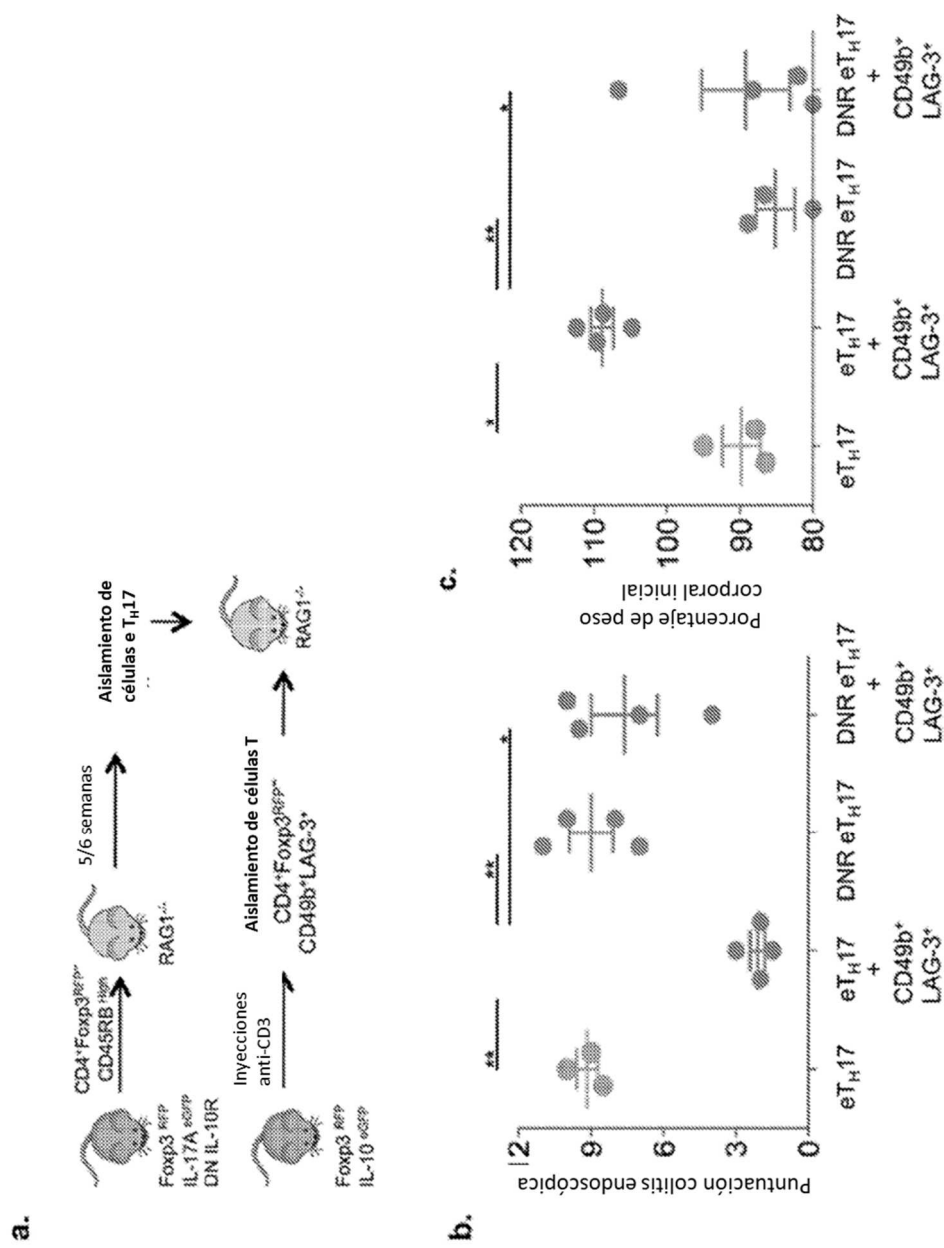


Figura 12

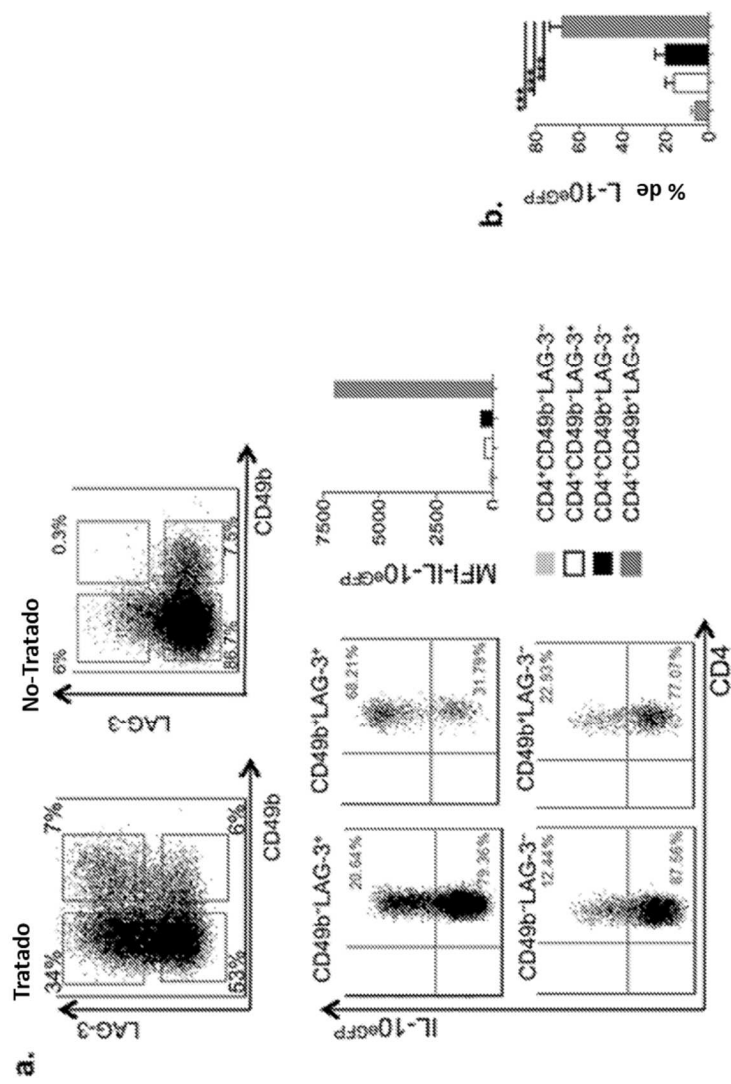


Figura 13A-13B

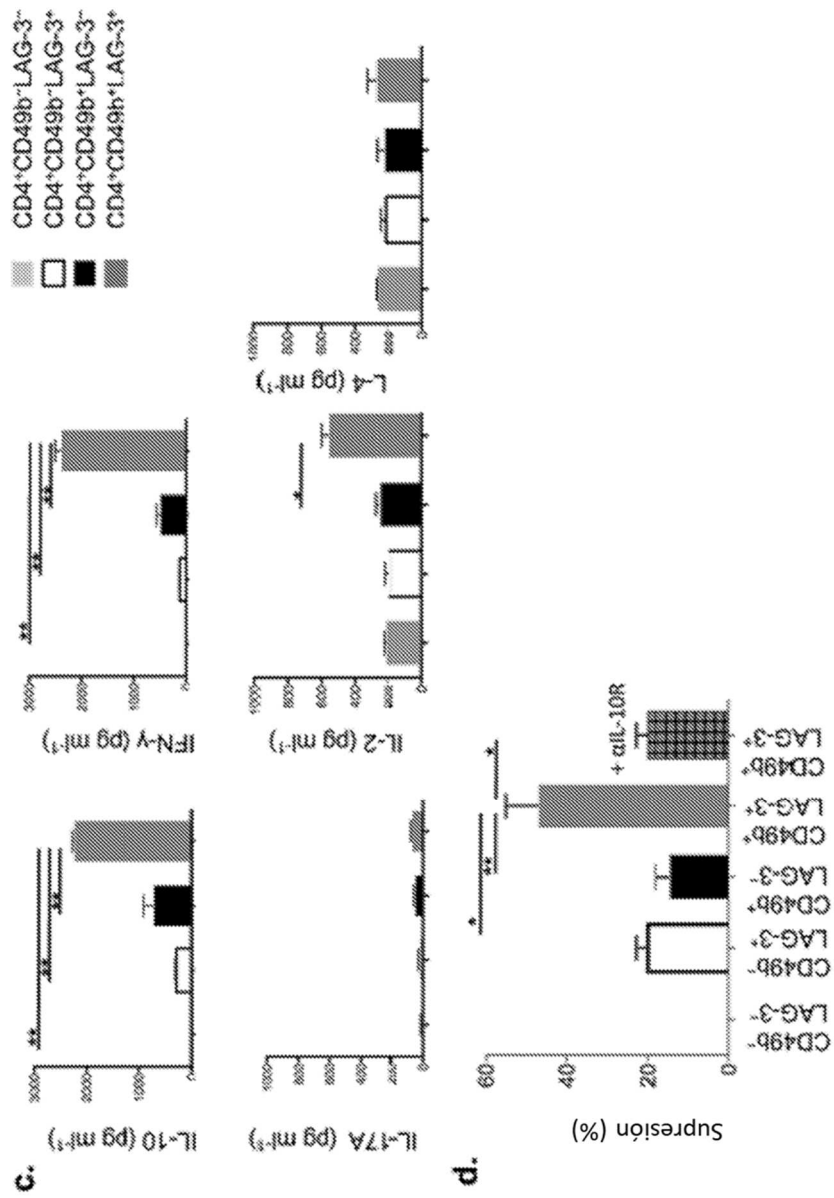


Figura 13C-13D

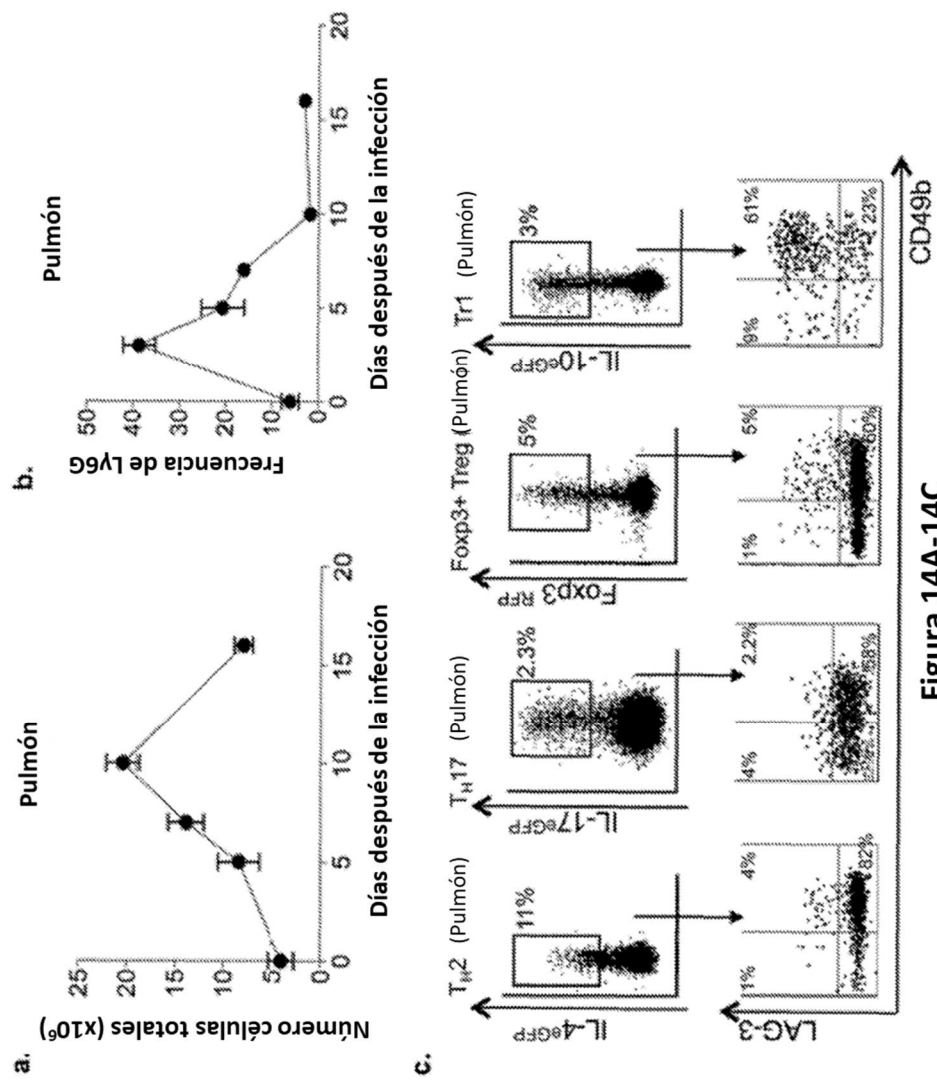


Figura 14A-14C

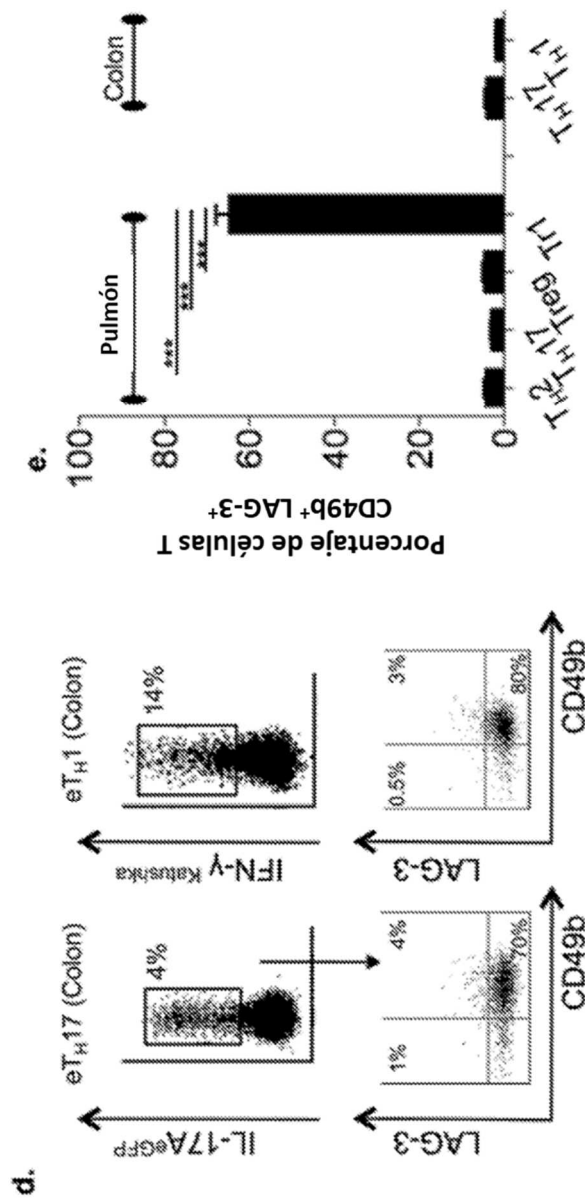


Figura 14D-14E

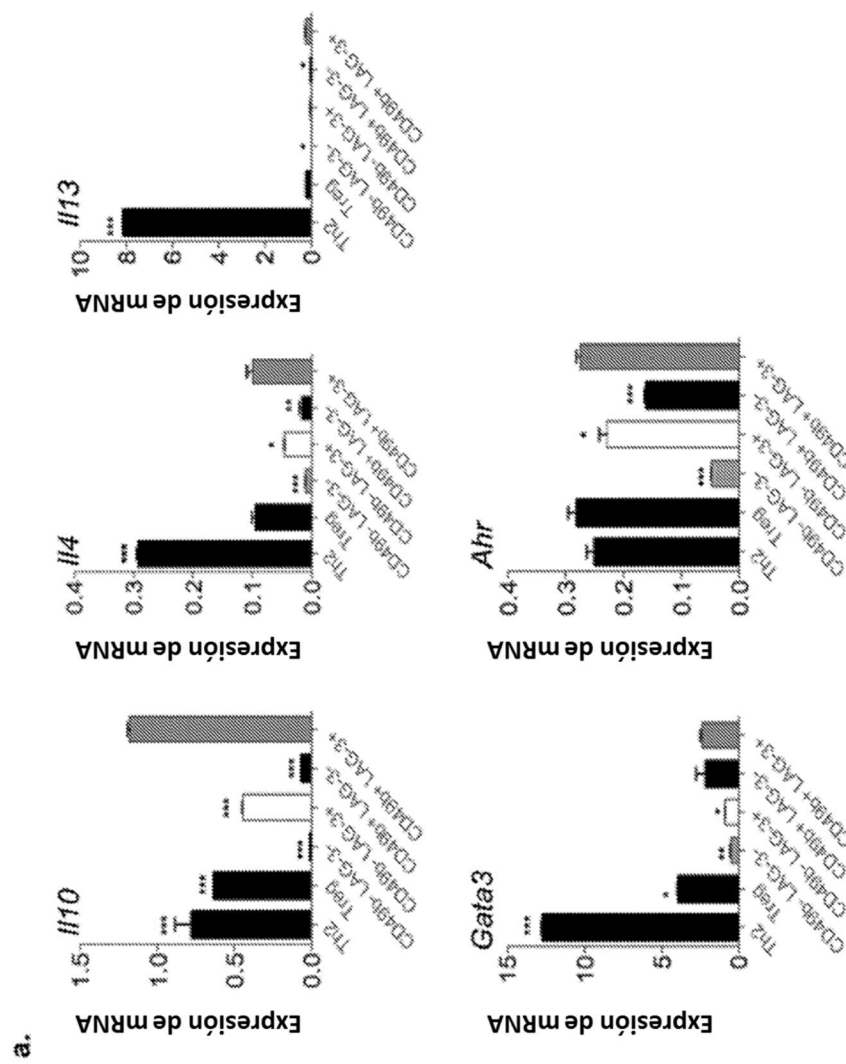


Figura 15A

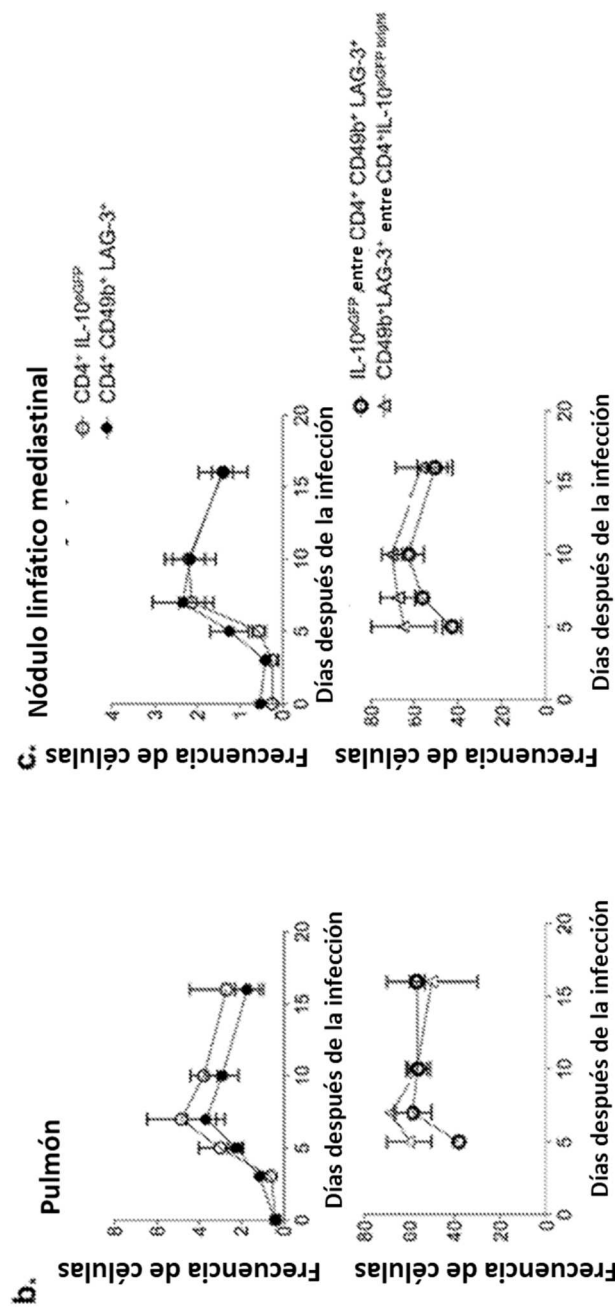


Figura 15B-15C

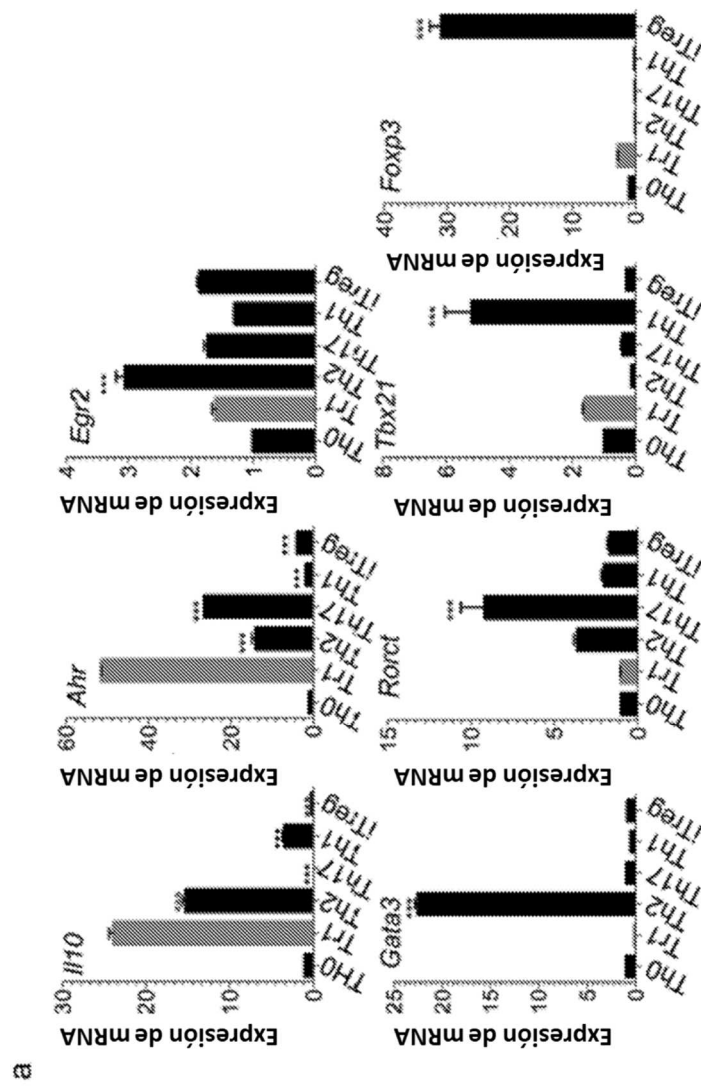


Figura 16A

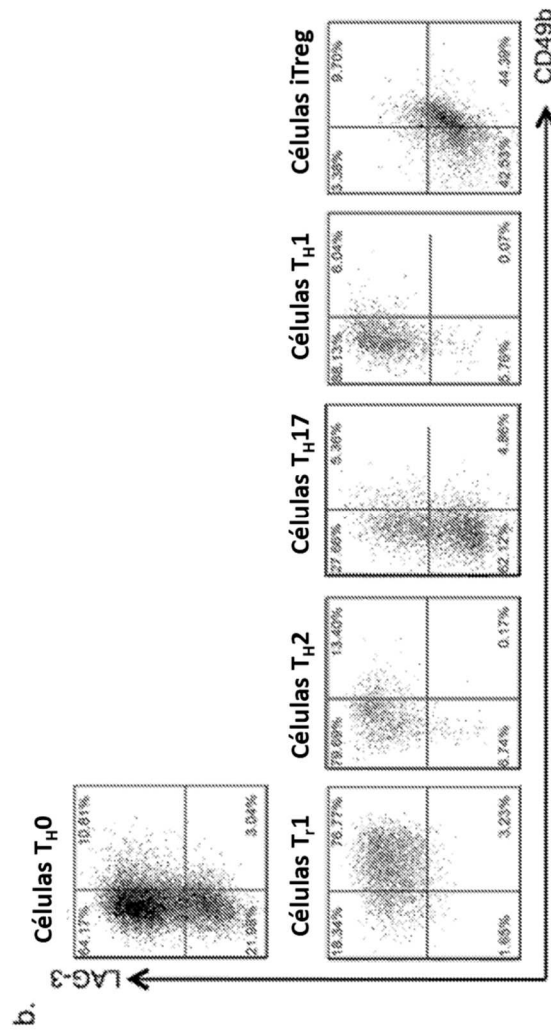


Figura 16B

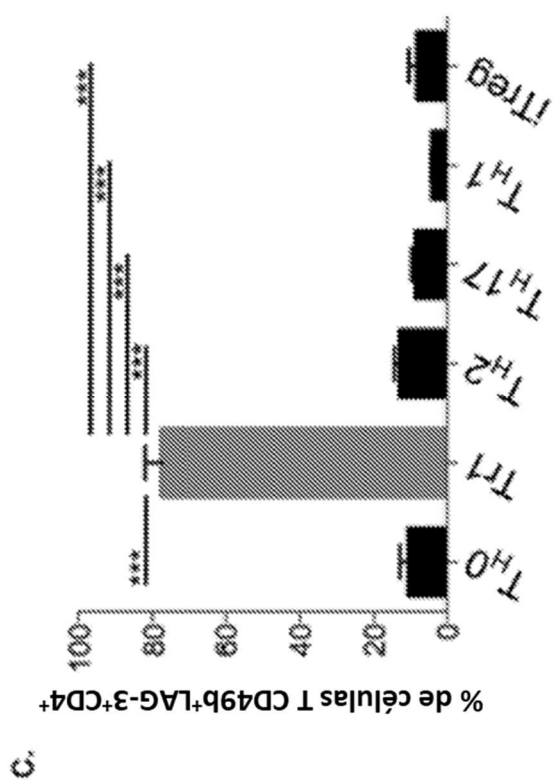


Figura 16C

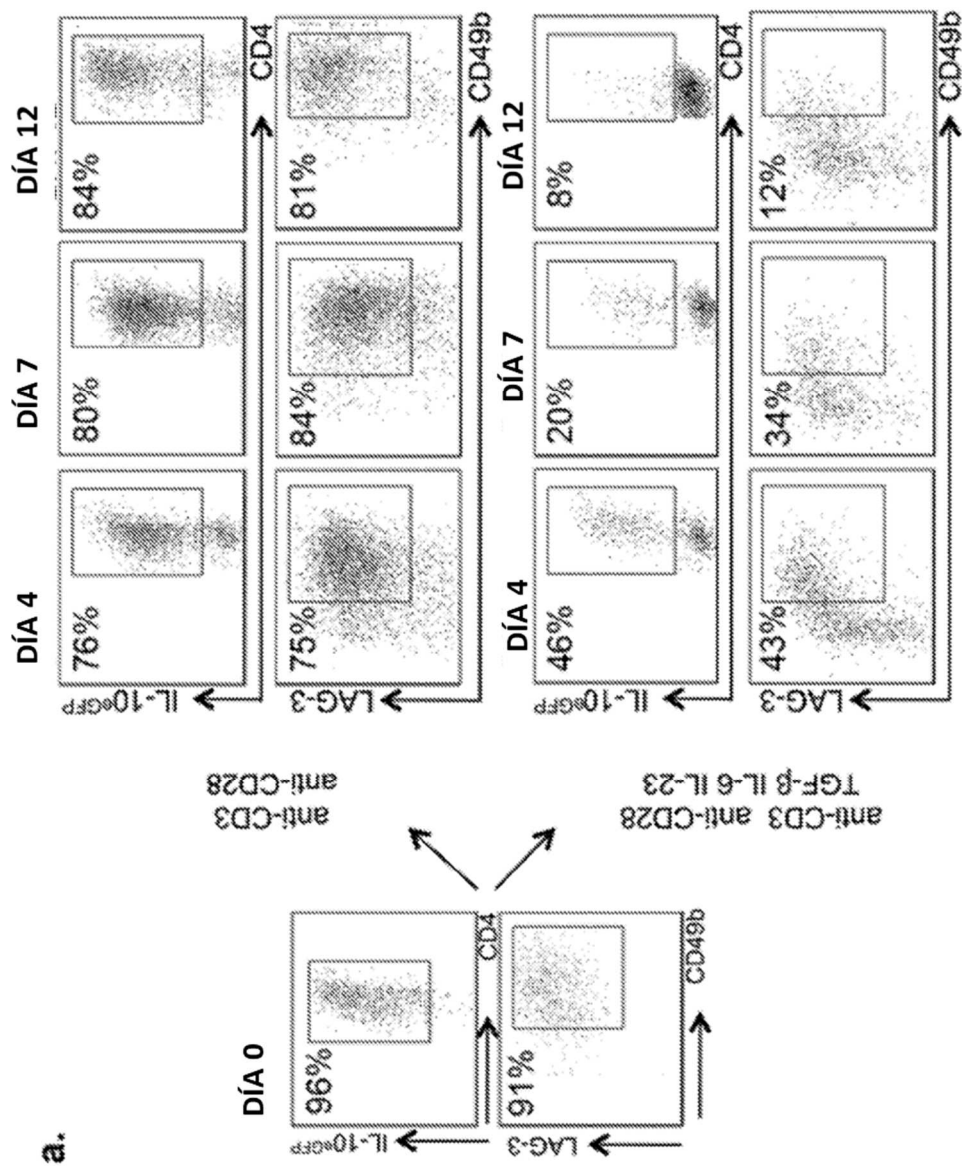


Figura 17A

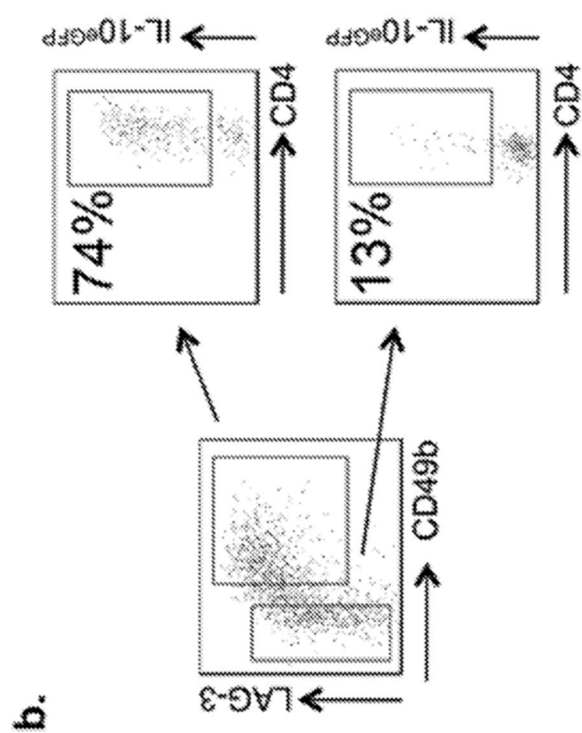


Figura 17B

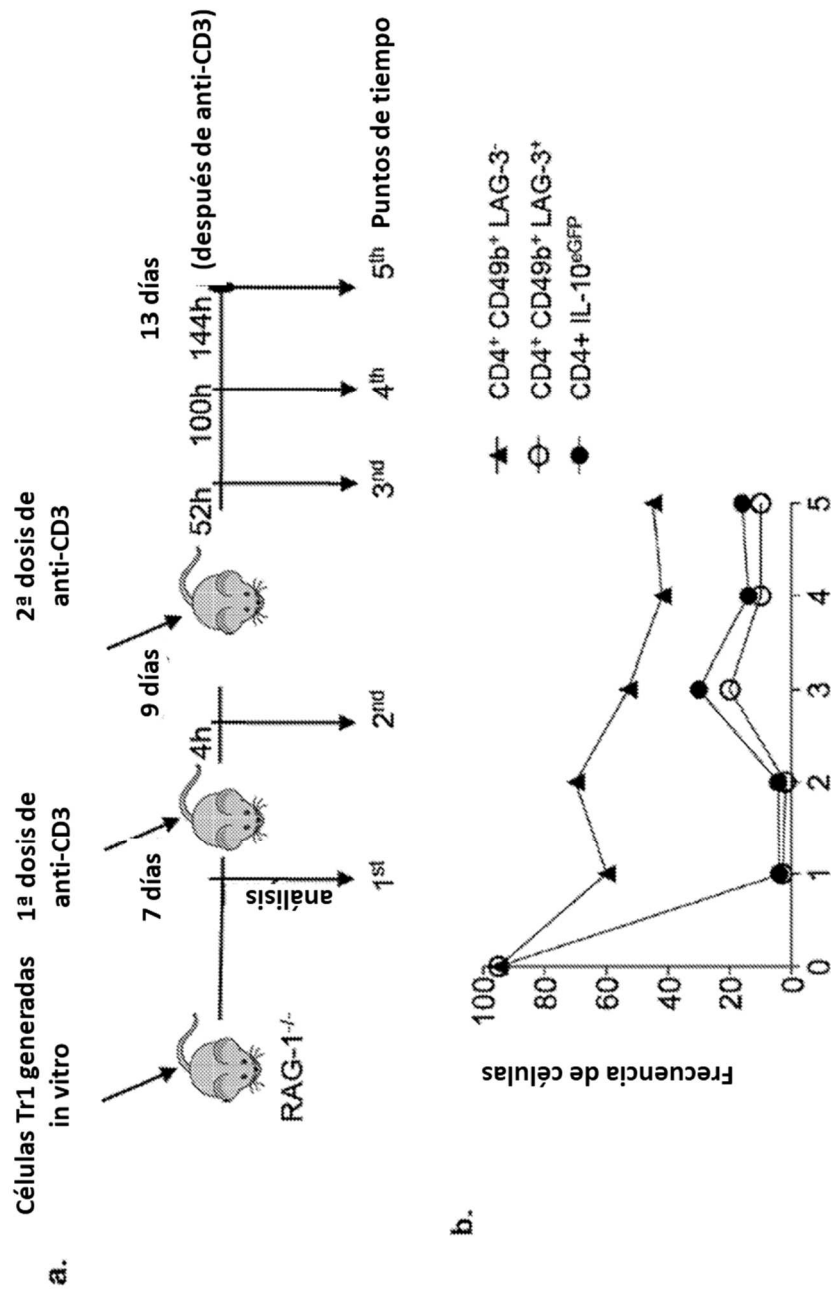


Figura 18A-18B

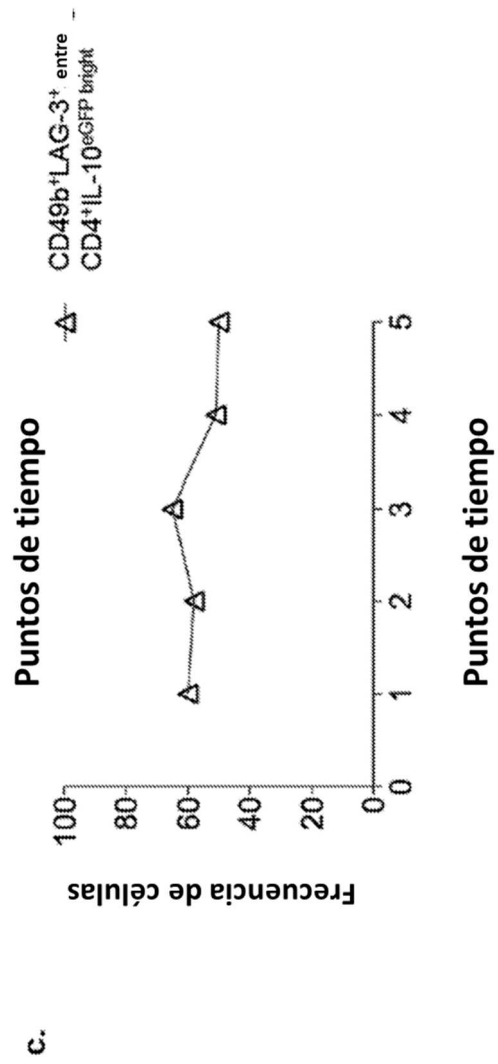


Figura 18C

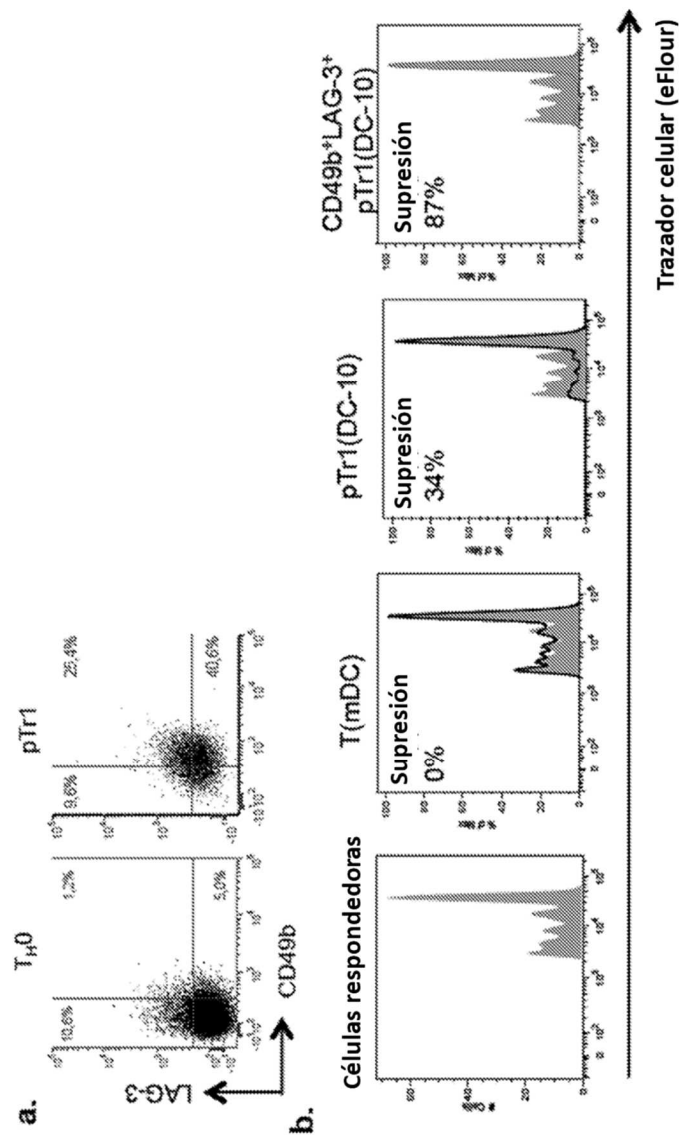


Figura 19

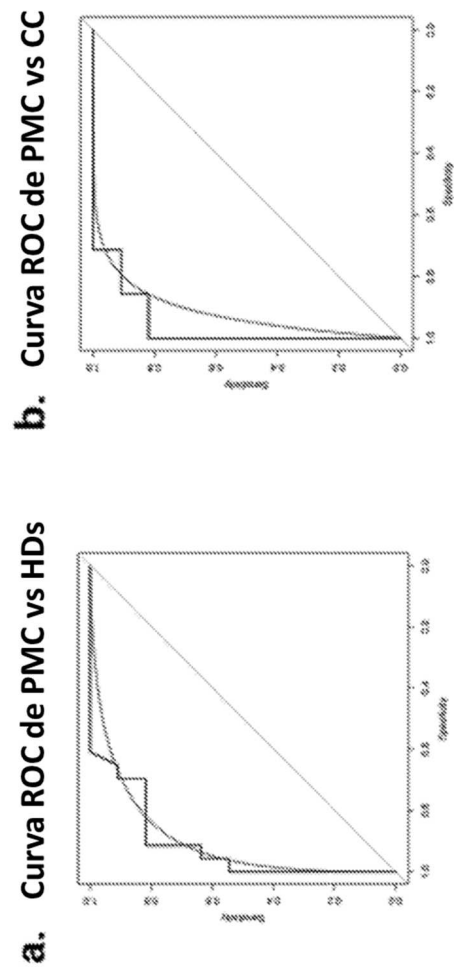


Figura 20