



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 425**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02740789 .9**

(86) Fecha de presentación : **10.05.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1390474**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

(54) Título: **Procedimiento de obtención de linfocitos Tr1 reguladores específicos de antígeno.**

(30) Prioridad: **11.05.2001 FR 01 06231**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

(73) Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

(72) Inventor/es: **Groux, Hervé;
Cottrez, Françoise y
Wakkach, Abdelilah**

(74) Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

Procedimiento de obtención de linfocitos Tr1 reguladores específicos de antígeno.

5 La invención se refiere a la obtención de linfocitos T CD4⁺ reguladores, utilizables en el marco de la prevención y del tratamiento de enfermedades auto-inmunes e inflamatorias.

Las enfermedades auto-inmunes se deben a una desregulación del sistema inmune, que se traduce en una respuesta inmune no deseable de un organismo para sus propios antígenos.

10 Se tiende a manipular los antígenos que provocan estas patologías o las células T agresivas específicas de estos antígenos, pero los resultados obtenidos están a menudo muy limitados particularmente por la falta de conocimiento de todos los antígenos implicados en la patología a la que se refiere. En efecto, no siempre se conocen los auto-antígenos propiamente dichos, o los antígenos responsables de los trastornos inflamatorios y autoinmunes, o son diferentes de un individuo a otro. Los tratamientos utilizados actualmente en estas enfermedades son tratamientos paliativos (insulina en el caso de diabetes, anti-histamina en el caso de trastornos alérgicos) o tratamientos sistémicos mediante anti-inflamatorios (AINE) y/o inmunosupresores (glucocorticoides, ciclosporina, anticuerpos...). Por tanto, existe claramente una necesidad de un tratamiento inmunosupresor potente pero limitado al órgano afectado o de forma más precisa a la zona de hiperactividad del sistema inmune.

20 Entre los numerosos agentes implicados en la regulación de la respuesta inmune, se citarán los linfocitos T CD4⁺, también denominados linfocitos T auxiliares (T *helpers*). Clásicamente se distinguen 2 tipos principales de linfocitos T auxiliares: los linfocitos Th1, implicados en el desarrollo de la respuesta inmune celular, producen citoquinas pro-inflamatorias tales como interleuquina-2 (IL-2) e interferón γ (IFN γ) y presentan efectos activadores de los macrófagos; los linfocitos Th2, que producen citoquinas tales como las interleuquinas IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, favorecen la secreción de anticuerpos.

30 Trabajos recientes en los que ha participado uno de los inventores, han dado como resultado el descubrimiento de una nueva categoría de células T reguladoras, cuya proliferación se induce mediante la activación de células T CD4⁺ en presencia de interleuquina 10 (IL-10), y que se han denominado linfocitos Tr1 (Solicitud PCT WO 97/42324). La consecución de estos trabajos ha permitido el aislamiento y la caracterización de una nueva sub-población de células T reguladoras, que se han denominado linfocitos Tr1 (GROUX *et al.*, Nature, 389, 737-742; 1997). Esta sub-población de linfocitos se ha obtenido mediante activaciones repetidas de células T CD4⁺ en presencia de un antígeno y de interleuquina 10 (IL-10). Cuando se estimulan de nuevo mediante el antígeno utilizado para su inducción, las células Tr1 sólo proliferan débilmente, producen cantidades muy elevadas de IL-10, cantidades importantes de TGF- β (factor de crecimiento tumoral β) y cantidades muy reducidas de IL-2, y no producen IL-4. Cuando se cultivan células Tr1 activadas en presencia de otras células T CD4⁺, suprimen la proliferación de estas últimas en respuesta a un antígeno; este efecto resulta de la secreción de citoquinas, y particularmente de IL-10, por los linfocitos Tr, y no de una acción directa de estos últimos sobre las células T CD4⁺; por tanto, este efecto puede obtenerse sin necesidad de conocer el antígeno responsable de la proliferación de estas células. Esto presenta una ventaja importante en el caso de enfermedades auto-inmunes, cuyo tratamiento puede preverse de este modo sin que sea necesario conocer el antígeno exacto contra el que se dirigen las células patogénicas.

45 De este modo se ha observado, en un modelo experimental de enfermedad de Crohn de ratón, en el que las células pro-inflamatorias se dirigen contra bacterias comensales de la flora digestiva, que la administración a los animales de células Tr1 dirigidas contra ovoalbúmina, acompañada por la administración de ovoalbúmina en el alimento, permitía prevenir la aparición de una inflamación crónica del colon.

50 Por otro lado, en trabajos recientes sobre diferentes modelos animales de enfermedad de Crohn, de esclerosis en placas o de reacción del injerto contra el hospedador, los inventores han demostrado que las células inhibidoras Tr1 no sólo eran capaces de prevenir, sino también de curar estas diferentes patologías. Han observado además, que las células Tr1 migran de forma específica e intensa a los diferentes sitios inflamatorios. Esta propiedad de las células Tr1 representa una ventaja suplementaria en la utilización de estas células como vector de moléculas anti-inflamatorias en los sitios de inflamación intensa. Las células Tr1 obtenidas a partir de células T de un paciente son, por tanto, potencialmente utilizables en el marco de una terapia celular para regular la respuesta inmune del paciente. De este modo estas células son utilizables, particularmente para prevenir o curar, no sólo las enfermedades auto-inmunes e inflamatorias mencionadas anteriormente, sino también cualquier otra patología caracterizada por una respuesta inflamatoria aberrante, como diabetes, psoriasis, aterosclerosis, poliartritis reumatoide o asma; estas células también son utilizables en el tratamiento de rechazos del injerto o de la reacción del injerto contra el hospedador.

65 El método de obtención de los linfocitos Tr1 que se describe en la publicación de GROUX *et al.* citada anteriormente, necesita la estimulación repetida de las células T con el antígeno en presencia de IL-10. Este método es difícil de poner en práctica y no permite obtener rápidamente, a partir de un paciente, una población de linfocitos Tr1 utilizable en el marco de un tratamiento terapéutico.

Diferentes equipos han informado de la implicación de diferentes moléculas de co-estimulación en la obtención de células que poseen características similares a las de las células Tr1, particularmente a nivel de la producción de IL-10;

las moléculas de estimulación potencialmente implicadas son muy diversas, y los efectos relacionados a veces parecen contradictorios.

BLEIJS *et al.* (Eur. J. Immunol., 29, 2248, 1999) han observado que de este modo la co-estimulación mediante la interacción de LFA-1 con ICAM-1, ICAM-2 o ICAM-3 induce una importante producción de GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), de IFN- γ y de IL-10 mediante linfocitos T estimulados por un anticuerpo anti-CD3. La producción de IL-10 es particularmente importante durante la co-estimulación mediante la interacción LFA-1/ICAM-1. BULLENS *et al.* (Int. Immunol. 13, 181-191, 2001) informan de que la co-estimulación mediante CD58 induce la producción de IL-10 y de IFN- γ por células T estimuladas mediante un anticuerpo anti-CD3. DONG *et al.* (Nat. Med., 5, 1365, 1999) han descrito una molécula de co-estimulación emparentada con la familia B-7, y denominada B7-H1, que preferiblemente induce la secreción de IL-10.

VAN GOOL *et al.* (Eur. J. Immunol., 29, 2367, 1999) han observado que la activación de células T mediante un aloantígeno en presencia de anticuerpos que bloquean las interacciones CD80/CD28 o CD86/CD28 y CD40/CD40L, induce una anergia específica de antígeno, acompañada por una disminución de la producción de IFN- γ y por un aumento de la producción de IL-10.

CHABOT *et al.* (J. Immunol., 162, 6819, 1999) informan de que la producción de IL-10, inducida mediante la interacción de células microgliales con linfocitos T disminuye mediante el bloqueo de CD40/CD40L, B7/CTLA-4 o B7/CD28, o de CD23.

JONULEIT *et al.* (J. Exp. Med. 192, 1112, 2000) describe la producción de células T reguladoras a partir de células dendríticas inmaduras (CD83⁻).

Actualmente, los inventores han elaborado un nuevo procedimiento que permite obtener rápidamente linfocitos Tr1 específicos de antígeno, en una cantidad muy superior a la obtenida mediante la activación de células T CD4⁺ en presencia de IL-10. En efecto, han constatado que el cultivo de células T CD4⁺ en presencia de un antígeno inductor, y de células de presentación de antígeno que expresan una molécula HLA de clase II y la molécula LFA-3 (CD58) humana, pero que no expresan ninguna de las moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H1, CD40, CD23 e ICAM-1 (CD54), induce la diferenciación de células Tr1 específicas de dicho antígeno.

La molécula LFA-3 es el ligando del receptor CD2 de los linfocitos T. Se han descrito dos formas de LFA 3: una forma transmembrana (WALNER *et al.*, J. Exp. Med. 166, 923-932, 1987; Solicitud PCT WO 88/09826) y una forma denominada "PI-linked LFA3" que se ancla a la membrana celular por medio de un glicolípido que contiene fosfatidilinositol (Solicitud PCT WO 90/02181).

La presente invención se refiere a la utilización de células de presentación de antígeno artificiales, que expresan una molécula del sistema HLA de clase II y una molécula LFA-3 humana, y que no expresan ninguna de las moléculas de co-estimulación B7-1, B7-2, B7-H1, CD40, CD23 o ICAM-1 (CD54), para la obtención de linfocitos reguladores Tr1 específicos de antígeno.

Se definen como linfocitos reguladores Tr1 específicos de antígeno, células que poseen las siguientes características, después de la estimulación de nuevo mediante dicho antígeno:

- producen una cantidad elevada de IL-10, a saber una cantidad igual o superior a 3×10^3 pg/ 10^6 células, y generalmente de 5×10^3 a 20×10^3 pg de IL-10 por 10^6 células;
- producen una cantidad de IL-2 igual o inferior a 50 pg/ 10^6 células; la relación de IL-10/IL-2 producidas por dichas células es al menos igual a 50/1, generalmente de 100/1 a 500/1;
- producen una cantidad de IL-4 igual o inferior a 50 pg/ 10^6 células; la relación de IL-10/IL-4 producidas por dichas células es al menos igual a 300/1, generalmente de 500/1 a 10000/1;
- la proliferación de células T CD4⁺ estimuladas mediante un antígeno en presencia de células Tr1 disminuye al menos 2 veces, generalmente al menos de 2 a 100 veces.

La presente invención se refiere particularmente a un procedimiento de preparación de linfocitos reguladores Tr1 específicos de antígeno a partir de linfocitos de un paciente, caracterizado porque comprende:

- la activación *in vitro* de dichos linfocitos en presencia del antígeno seleccionado presentado por células de presentación de antígeno artificiales como se han definido anteriormente;
- la recuperación, a partir de dichos linfocitos, de una población de linfocitos T CD4⁺ activados, que comprende al menos el 10%, preferiblemente al menos el 50%, y de manera totalmente preferida, al menos el 80% de linfocitos Tr1 específicos de dicho antígeno.

5 Pueden obtenerse ventajosamente células de presentación de antígeno artificiales para la puesta en práctica de la presente invención, mediante co-transfección de células animales que no expresen ninguna de las moléculas de co-estimulación indicadas anteriormente con una secuencia de ácido nucleico que codifique la cadena α de una molécula HLA de clase II, una secuencia de ácido nucleico que codifique la cadena β de una molécula HLA de clase II y una
 10 secuencia de ácido nucleico que codifique una cualquiera de las 2 formas de LFA-3. Si se desea, estas células pueden transfectarse también con una secuencia de ácido nucleico que codifique el antígeno para el que se desea inducir la especificidad de los linfocitos Tr1. Estas secuencias de ácido nucleico pueden estar en diferentes moléculas de ácido nucleico, o bien 2 o más de ellas pueden estar en la misma molécula de ácido nucleico.

10 Las células animales que pueden utilizarse para la obtención de dichas células de presentación de antígeno artificiales pueden ser células de origen humano, autólogas o heterólogas, o bien células de origen xenogénico, particularmente células de mamífero. Pueden utilizarse cultivos primarios recién aislados; generalmente se preferirá utilizar líneas celulares establecidas, que son más homogéneas, y capaces de proliferar durante varias generaciones.

15 Puede tratarse, por ejemplo, de fibroblastos, de queratinocitos, de células de los túbulos renales, de células de Schwann, de mioblastos, de células endoteliales, etc.

20 La molécula de CMH de clase II expresada por las células de presentación de antígeno artificiales se seleccionará entre las diferentes moléculas HLA-2 humanas disponibles, en función del tipo de HLA de clase II del paciente a partir del que se extraen linfocitos T CD4+ y de la utilización prevista para las células Tr1.

25 Generalmente se utilizarán células de presentación de antígeno artificiales que expresan una molécula HLA-2 expresada también por el paciente; sin embargo, también puede seleccionarse una molécula HLA-2 diferente de las expresadas por dicho paciente; puede tratarse por ejemplo, si se desea producir células Tr1 utilizables en el marco de la prevención del rechazo del injerto, de una molécula HLA-2 expresada por las células del injerto; en este caso, la molécula HLA-2 constituye el antígeno para el que se dirigirán las células Tr1 obtenidas.

30 El antígeno utilizado para la puesta en práctica del procedimiento de acuerdo con la invención se seleccionará en función de la utilización a la que se destinan las células Tr1 específicas de antígeno que se desea producir. Puede tratarse de un antígeno asociado a una patología inflamatoria o auto-inmune; también puede tratarse de un antígeno sin relación con una patología en particular, pero que podrá administrarse si se desea activar las células Tr1 para combatir una respuesta inmune no deseable.

35 La carga del antígeno en las células de presentación de antígeno artificiales puede realizarse de manera clásica, mediante co-incubación de las células y de dicho antígeno. Éste puede presentarse en forma nativa, y dichas células de presentación de antígeno pueden prepararlo; también puede presentarse en forma de uno o varios péptidos antigénicos, que pueden fijarse directamente mediante las moléculas HLA-2 expresadas por dichas células. Como alternativa, las células de presentación de antígeno artificiales pueden expresar el antígeno, en el caso en el que éstas se hayan transfectado previamente con una secuencia de ácido nucleico que codifica este antígeno.
 40

Para la puesta en práctica del procedimiento de acuerdo con la invención, la activación *in vitro* de los linfocitos puede realizarse directamente en las PBMC (células mononucleares de la sangre periférica) extraídas de dicho paciente. La activación también puede realizarse en los linfocitos T CD4+ purificados previamente a partir de estas PBMC.

45 La activación de los linfocitos se realiza mediante co-cultivo de estos últimos, durante de 2 a 10 días, preferiblemente durante de 6 a 8 días, en presencia de las células de presentación de antígeno artificiales descritas anteriormente, cargadas con el antígeno seleccionado.

50 Después de este periodo de cultivo, se seleccionan los linfocitos T CD4+ activados, en base a la expresión del marcador CD4+ y de uno o varios marcadores de activación tales como CD25, CD69, CD45RO, etc.

Después de este periodo de cultivo, se obtiene una población celular en la que los linfocitos Tr1 representan al menos el 10% y generalmente entre el 50 y el 80% de los linfocitos T específicos de antígeno activados.

55 Para enriquecer aún más esta población en linfocitos Tr1, puede repetirse la estimulación en las condiciones definidas anteriormente.

60 Se obtiene entonces una población de linfocitos T CD4+ activados, que comprende al menos el 30% y generalmente entre el 60 y el 90% de linfocitos Tr1 entre las células T específicas de antígeno.

También pueden aislarse clones de linfocitos Tr1 a partir de esta población. Estos clones pueden identificarse fácilmente en base al perfil característico de producción de citoquinas de los linfocitos Tr1, como se ha definido anteriormente.

65 La expansión de los clones puede realizarse en un medio nutritivo que contiene factores de crecimiento no específicos tales como IL-4 e IL-2. Una realización preferida es utilizar como agente de estimulación perlas acopladas con anticuerpos anti-CD3 y CD28.

Las células Tr1 obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con la invención presentan todas las características de las células Tr1 obtenidas mediante activación de linfocitos T CD4+ en presencia de IL-10 y tienen por tanto los mismos usos que estas últimas para la regulación de la respuesta inmune.

5 La presente invención también se refiere a un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o de enfermedades autoinmunes, caracterizado porque comprende la preparación de linfocitos Tr1 específicos de antígeno mediante un procedimiento de acuerdo con la invención, y el envasado de dichos linfocitos Tr1 en una formulación adecuada para su administración a un paciente.

10 La presente invención se comprenderá mejor con ayuda del complemento de descripción que se presenta a continuación, que se refiere a ejemplos no limitantes que ilustran la puesta en práctica del procedimiento de acuerdo con la invención.

15 Ejemplo 1

Preparación de linfocitos Tr

Aislamiento de células T CD4+

20 Se obtienen células mononucleares periféricas (PBMC) mediante centrifugado en Ficoll-Hypaque.

Las células T CD4+ se obtienen por eliminación de células no CD4+, utilizando anticuerpos anti-CD8 (L533), anti-CD11b (OKM1) y anti-CD20 (2H7), de acuerdo con el siguiente protocolo. Se incuban las células con concentraciones de saturación de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C. Después del lavado, se añaden perlas DYNABEADS (DYNAL, Oslo, Noruega), en una relación de perlas/células diana de 1/1, y se incuba durante 1 hora a 4°C. Las perlas que tienen células no CD4+ se eliminan mediante la aplicación de un campo magnético. El análisis por citofluorometría de flujo (FACSstar, BECTON DICKINSON) de las células restantes muestra que éstas comprenden del 90 al 95% de células T CD4+.

30 *Obtención de células de presentación de antígeno artificiales*

Se han co-transfectado células fibroblásticas L (ATCC CCL-1) de ratón con secuencias de ácido nucleico que codifican LFA-3 y una molécula HLA de clase II.

35 *Obtención de un ADNc que codifica LFA-3*

Se ha preparado un ADNc que codifica LFA-3, a partir de un banco de ADNc total de células mononucleares periféricas humanas, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el cebador denominado 5'LFA-3, que comprende la secuencia de los nucleótidos 13 a 33 de la secuencia que codifica LFA-3 humano (número de acceso GENBANK X06296), flanqueada en 5' por un sitio KpnI, y el cebador denominado 3'LFA-3, que comprende la secuencia de los nucleótidos 708 a 728 de la secuencia que codifica LFA-3 humano, flanqueada en 5' por un sitio NotI.

45 *Obtención de un ADNc que codifica DR1*

Se ha obtenido un ADNc que codifica la cadena alfa de DR1, a partir de un banco de ADNc total de células mononucleares periféricas humanas de un donante DR1+, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores denominados DR1A5' y DR1A3', que comprenden respectivamente la secuencia de los nucleótidos 151 a 176, y la secuencia de los nucleótidos 769 a 792 de la secuencia que codifica la cadena alfa de DR1 (número de acceso GENBANK KO1171). Se ha obtenido de la misma manera un ADNc que codifica la cadena beta de DR1, utilizando los cebadores denominados DR1B5' y DR1B3' que comprenden respectivamente la secuencia de los nucleótidos 52 a 74 y 850 a 923 de la secuencia que codifica la cadena beta de DR1 (número de acceso GENBANK NMO02124).

55 *Transfección de las células*

Cada uno de los ADNc obtenidos se ha clonado en un vector pcDNA 3.1/hygro (INVITROGEN), en el sitio TA. Los vectores obtenidos se han utilizado para co-transfectar las células L mediante electroporación.

60 Los transfectantes estables se seleccionan por citofluorometría de flujo (FACSVantage SE, BECTON DICKINSON) marcando las células con ayuda de un anticuerpo anti-LFA-3 (1C3) y de un anticuerpo anti-DR (L243). Las células que expresan al mismo tiempo LFA-3 y DR se retienen y se cultivan en medio F12 (LIFE TECHNOLOGIES) suplementado con suero fetal bovino al 10% (BOEHRINGER) y con adición de penicilina y de estreptomina.

65 También se han preparado células de presentación de antígeno que co-expresan LFA-3 y DR1, como se ha descrito anteriormente, mediante co-transfección de células P815 (ATCC-TIB64).

ES 2 282 425 T3

Como controles, se han utilizado también células L o P815 no transfectadas, o células obtenidas mediante transfección de células L o P815, y que únicamente expresan la molécula DR1.

Obtención de linfocitos Tr

Se suspenden células T CD4⁺ aisladas como se ha descrito anteriormente, a partir de PBMC de un donante no DR1, a razón de 2×10^6 células/ml, en medio de YSSEL (YSSEL *et al.*, J. Immunol. Methods, 72, 219-227, 1984).

La suspensión de células se distribuye en una placa de cultivo de 24 pocillos, a razón de 1 ml por pocillo. Se irradian (60 Gy) células transfectadas L-DR1-LFA3 o células transfectadas L-DR1, obtenidas como se ha descrito anteriormente, o como control, se irradian células linfoblastoides B-EBV DR1+, y se le añaden a cada pocillo, a razón de 5×10^5 células/ml.

Después de la incubación durante 7 días, se recogen las células, se lavan en PBS y después se marcan con ayuda de anticuerpos anti-CD4 (RPA-T1) y anti-CD25 (M-A251). Las células CD4⁺CD25⁺ se seleccionan por citofluorometría de flujo y se clonan a razón de 1 célula/pocillo en una placa de 96 pocillos, en medio de YSSEL. La expansión de los clones se realiza en presencia de IL-2 y de IL-4 mediante la técnica descrita por SPITS e YSSEL (J. Immunol. Methods, 9, 416-421, 1996). Después de la expansión de los clones, se estimulan de nuevo los diferentes clones mediante células linfoblastoides B-EBV DR1+. 48 horas después de la estimulación, se recupera el sobrenadante celular y se determina el perfil de producción de citoquinas IL-10 e IFN- γ en respuesta a esta estimulación, mediante dosificación de estas citoquinas mediante ELISA de acuerdo con el procedimiento descrito por ABRAMS *et al.* (Curr. Protocols Immunol., 13, pp 6.1-6-15, 1995).

Los resultados que se ilustran a continuación en la Tabla I representan la producción de citoquinas IL-10, e IFN- γ de células Tr1 (media \pm desviación típica de 10 clones) de dos donantes diferentes.

TABLA I

célula	Donante 1		Donante 2	
	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
L-DR1	326 \pm 40	13372 \pm 1500	3657 \pm 324	9638 \pm 63
L-DR1-LFA-3	2315 \pm 183	19403 \pm 975	6402 \pm 272	914 \pm 322
B-EBV DR1+	< 40	16005 \pm 123	174 \pm 59	4930 \pm 685

En otra serie de experimentos, las células T CD4⁺ aisladas a partir de PBMC de un donante DR1+ se mezclan, como se ha descrito anteriormente, con células de presentación de antígeno que expresan la molécula DR1 y la molécula LFA-3.

A la mezcla de células se le añade un antígeno inductor (péptido HA 307-319, que corresponde a un fragmento del antígeno de la cápsida del virus *Haemophilus influenzae*), a razón de 50 μ g/ml.

Después de la incubación durante 3 días, las células CD4⁺CD25⁺ se seleccionan mediante citofluorometría de flujo y se clonan como se ha descrito anteriormente.

Después de la expansión de los clones, se estimulan de nuevo los diferentes clones mediante células linfoblastoides B-EBV cargadas con el péptido HA (10 μ M). 48 horas después de la estimulación, se recupera el sobrenadante celular y se determina el perfil de producción de citoquinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ en respuesta a esta estimulación, mediante dosificación de estas citoquinas mediante ELISA de acuerdo con el protocolo descrito por ABRAMS y colaboradores.

La mayor parte (aproximadamente el 70%) de los clones CD4⁺CD25⁺ aislados presentan el perfil de producción de citoquinas de las células Tr1.

ES 2 282 425 T3

Los perfiles de producción de citoquinas de 9 de estos clones Tr1 se ilustran mediante la tabla II a continuación.

TABLA II

Clon	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
HA-1A12	< 20	< 40	12358	521
HA-1B6	< 20	< 40	11897	497
HA-1C9	< 20	< 40	14598	1369
HA-1E5	< 20	< 40	13549	314
HA-1E7	40	< 40	11697	876
HA-1F2	< 20	< 40	10597	1057
HA-2B6	< 20	< 40	17891	697
HA-2D5	32	< 40	16589	503
HA-2F2	< 20	< 40	17803	873

También se han obtenido clones de células Tr1 que poseen el mismo perfil de producción de citoquinas, utilizando como células de presentación de antígeno las células P815-DR1-LFA-3, lo que demuestra que la obtención de células Tr1 no está unida a las propiedades de la línea celular a partir de la que se obtienen las células de presentación de antígeno.

Ejemplo 2

Propiedades inmunoregulatoras de los linfocitos tr1 obtenidos mediante el procedimiento de acuerdo con la invención

Las propiedades inmunoregulatoras de las células Tr1 específicas de antígeno se han ensayado de la siguiente manera:

Se estimulan células T CD4⁺ humanas obtenidas de un donante DR1⁺ (1×10^6 /ml) mediante monocitos singénicos (1×10^6 /ml) irradiados (60 Gy), en presencia del péptido HA 307-319 (50 μ M) y de anatoxina tetánica (TT: 50 μ g/ml).

Paralelamente, se realiza el mismo experimento añadiendo células (2×10^5 /ml) de un clon Tr1 específico para HA obtenido como se ha descrito anteriormente, en solitario o en presencia de un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-10 (anti-IL-10R, 10 μ g/ml), de un anticuerpo anti-TGF- β (20 μ g/ml), o de una mezcla de estos 2 anticuerpos.

La proliferación de las células T CD4⁺ se determina después de 5 días, midiendo la incorporación de timidina tritiada.

Los resultados obtenidos para 3 clones Tr1 específicos para HA se ilustran mediante la figura 1. Leyenda de la figura 1:

En ordenadas: proliferación (timidina tritiada incorporada, en cpm).

En abscisas:

Medio: células T CD4⁺ sin estimular;

TT + péptido HA: células T CD4⁺ estimuladas mediante péptido HA 307- 319 y anatoxina tetánica;

+Tr1 específicas para HA: células T CD4⁺ estimuladas mediante péptido HA 307-319 y anatoxina tetánica, en presencia de células Tr1 específicas para el antígeno HA;

+ anti IL-10R: células T CD4⁺ estimuladas mediante péptido HA 307-319 y anatoxina tetánica, en presencia de células Tr1 específicas para el antígeno HA, y para anticuerpos anti-IL-10R;

ES 2 282 425 T3

+ anti-TGF- β : células T CD4+ estimuladas mediante péptido HA 307-319 y anatoxina tetánica, en presencia de células Tr1 específicas para el antígeno HA, y para anticuerpos anti-TGF- β ;

5 + anti-IL-10R + anti-TGF- β : células T CD4+ estimuladas mediante péptido HA 307-319 y anatoxina tetánica, en presencia de células Tr1 específicas para el antígeno HA, y para una mezcla de anticuerpos anti-IL-10R y anticuerpos anti-TGF- β .

10 Estos resultados demuestran que los linfocitos Tr1 obtenidos mediante el procedimiento de acuerdo con la invención disminuyen de forma considerable la proliferación específica de antígeno de células T CD4+. Este efecto inhibidor sólo se atenúa muy débilmente por anticuerpos anti-IL-10R o anti-TGF- β por separado, y se anula parcialmente por una mezcla de los 2 anticuerpos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de células de presentación de antígeno artificiales, que expresan una molécula del sistema HLA de clase II y una molécula de LFA-3 humano y que no expresan ninguna de las moléculas de co-estimulación B7-1, B7-2, B7-H1, CD40, CD23 o ICAM-1, para la obtención de linfocitos reguladores Tr1 específicos de antígeno.

2. Procedimiento de preparación de linfocitos reguladores Tr1 específicos de antígeno a partir de linfocitos de un paciente, **caracterizado** porque comprende:

- la activación *in vitro* de dichos linfocitos en presencia del antígeno seleccionado, presentado por células de presentación de antígeno artificiales como se han definido en la reivindicación 1;

- la recuperación, a partir de dichos linfocitos, de una población de linfocitos T CD4+ activados, que comprende al menos el 10% de linfocitos Tr1 específicos del antígeno seleccionado.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque las células de presentación de antígeno artificiales utilizadas se obtienen mediante co-transfección de células de mamífero seleccionadas entre fibroblastos, queratinocitos, células de los túbulos renales, células de Schwann, mioblastos, células endoteliales, con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena α de una molécula HLA de clase II, una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena β de una molécula HLA de clase II y una secuencia de ácido nucleico que codifica LFA-3 humano.

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado** porque la activación *in vitro* de dichos linfocitos se realiza mediante co-cultivo de dichos linfocitos y de dichas células de presentación de antígeno en presencia del antígeno seleccionado.

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado** porque comprende la repetición de la etapa de activación *in vitro* de los linfocitos T CD4+ en presencia del antígeno seleccionado y la recuperación de una población de células que comprende al menos el 30% de linfocitos Tr1 específicos de dicho antígeno.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque comprende además el aislamiento y la expansión de clones de linfocitos Tr1, a partir de la población de células recuperada.

7. Procedimiento de preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, **caracterizado** porque comprende la preparación de linfocitos Tr1 específicos de antígeno mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 y el envasado de dichos linfocitos en una formulación adecuada para su administración a un paciente.

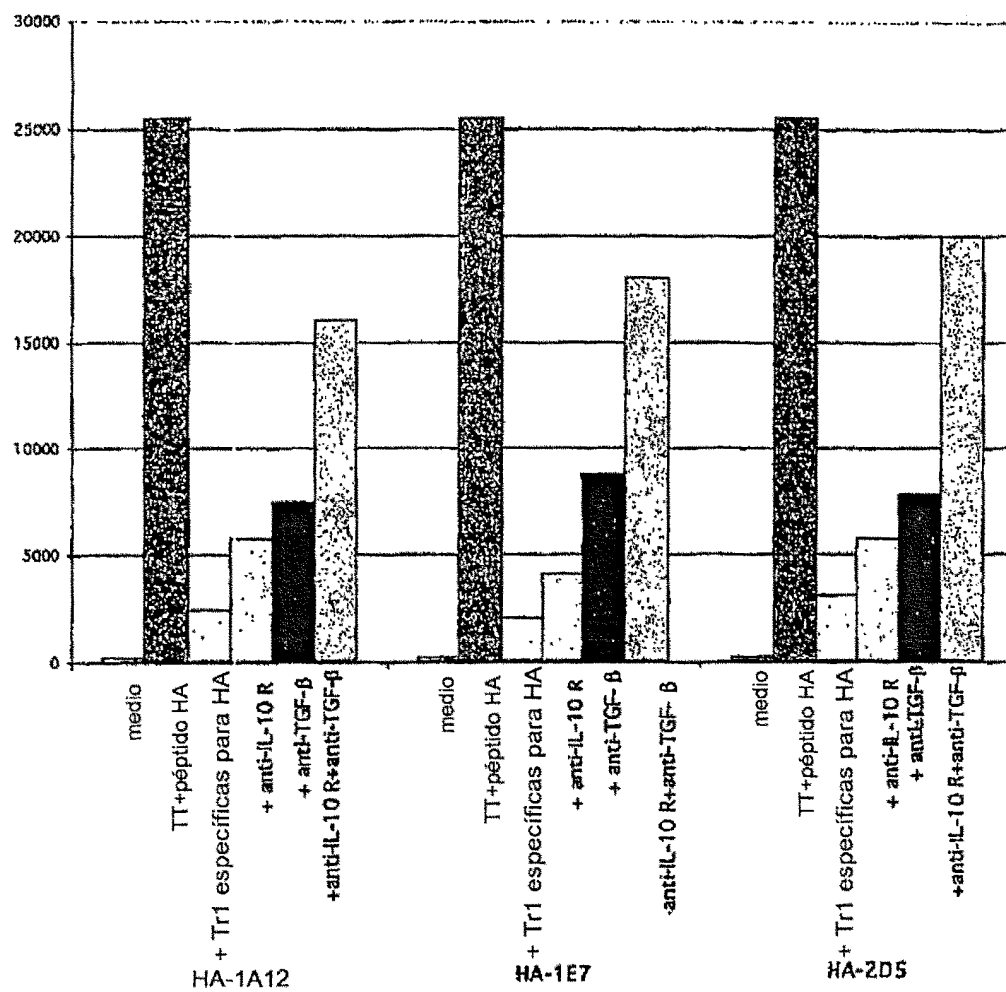


Figura 1