

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 087**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2017** **E 21158543 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023** **EP 3892631**

54 Título: **Proteína de fusión para la utilización en el tratamiento de la enfermedad EHIC**

30 Prioridad:

30.06.2016 EP 16177208

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

18.06.2024

73 Titular/es:

MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(50.0%)

Carl-Neuberg-Strasse 1

30625 Hannover, DE y

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG
(50.0%)

72 Inventor/es:

JÄCKEL, ELMAR, DR.;

NOYAN, FATIH, DR. y

HUST, MICHAEL, PROF. DR.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 973 087 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

Proteína de fusión para la utilización en el tratamiento de la enfermedad EHIC

5 La presente invención se refiere a una célula T_{reg} humana que expresa una proteína de fusión para la utilización en el tratamiento de la enfermedad del huésped contra el injerto (EHIC) en un paciente que ha recibido un trasplante, para la utilización en la supresión de la respuesta inmunitaria del hospedador dirigida contra el trasplante. La proteína de fusión está adaptada para la utilización en la supresión del rechazo inmunitario de un trasplante que contiene o expresa una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH-I), que es la proteína HLA-A*02 humana en un paciente receptor que es negativo para HLA-A*02, es decir, el paciente antes del trasplante no expresaba HLA-A*02. La proteína de fusión es un receptor de antígeno quimérico (CAR-A*02), que al expresarse en células T reguladoras (T_{reg}) causa una actividad supresora específica de las células T reguladoras en la presencia de HLA-A*02. Es una ventaja del CAR-A*02 de la invención que la actividad supresora está limitada al trasplante y resulta en la supresión de las células T citotóxicas dentro del trasplante, incluyendo las células T citotóxicas dirigidas contra un trasplante que expresa HLA-A*02. El trasplante es un tejido sólido.

La proteína de fusión comprende o consiste en un dominio de anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés), una bisagra hCD8 modificada, un dominio transmembranal hCD8, un dominio de señalización de hCD28 intracelular y un dominio de señalización hCD3ζ (hCD3 zeta) intracelular, que preferentemente están unidos entre sí de extremo N-terminal a extremo C-terminal, más preferentemente directamente unidos entre sí de extremo N-terminal a extremo C-terminal.

La proteína de fusión puede contener un dominio hΔFc de IgG alternativamente a una bisagra hCD8 modificada, y/o una fusión de dominio transmembranal hCD28-dominio hCD28/CD3-zeta alternativamente a un dominio transmembranal hCD8, un dominio de señalización hCD28 intracelular y un dominio de señalización hCD3ζ (hCD3 zeta) intracelular.

Además, la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de fusión CAR, preferentemente contenida en un vector vírico, p. ej., entre un 5'LTR y un 3'LTR, en donde la secuencia de ácidos nucleicos más preferentemente está contenida en una partícula vírica adecuada para transducir células T_{reg}. En él, la secuencia de ácidos nucleicos y un vector vírico, preferentemente contenido en una partícula vírica, están destinados al uso en el tratamiento de la enfermedad del huésped contra el injerto (EHIC). Según la invención, el tratamiento de la enfermedad EHIC generalmente es la supresión de la actividad de las células T citotóxicas dirigidas contra el injerto trasplantado.

Además, la invención se refiere a un método *in vitro* para introducir actividad supresora específica de HLA-A*02 en las células T_{reg}, mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de fusión CAR-A*02 en células T_{reg}, en donde las células T_{reg} generalmente no contienen o expresan HLA-A*02, y expresar la proteína de fusión y además manipular genéticamente dichas células para que expresen constitutivamente FOXP3. Preferentemente, las células T_{reg} son autólogas del paciente, p. ej., obtenidas y aisladas a partir de una biopsia del paciente.

Técnica anterior

45 MacDonald et al., The Journal of Clinical Investigation 1-12 (22 de marzo de 2016) describen un CAR genérico que presenta un dominio scFv específico para HLA-A2 y células T reguladoras transducidas para expresar el CAR para la supresión específica de HLA-A2. El dominio scFv contenía las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal BB7.2. Además del scFv, el CAR contenía un dominio transmembranal CD28, un dominio de señalización CD28 y un dominio de señalización CD3ζ.

50 Inaguma et al., Gene Therapy 575-584 (2014) describen la construcción de un receptor de células T útil para dirigir los linfocitos T contra células tumorales que expresan una proteína específica, que comprende el aislamiento de un scFv de anticuerpo que presenta especificidad para la proteína específica tumoral cuando se encuentra unida en un complejo de HLA-A2, y la utilización de scFv como un dominio en el receptor de células T sintético.

55 Noyan et al., Cancer Gene Therapy 19, 352-357 (2012) describen la expresión inducida de un transgén en células madre y progenitoras hematopoyéticas mediante transducción lentivírica para la utilización en el tratamiento de tumores sólidos.

60 Galla et al., Nuc. Ac. Res. 39, 1721-1731 (2009) describen los efectos citotóxicos de una transposasa utilizada en la transducción de células por partículas retrovíricas.

65 DiStasi et al., N. Engl. J. Med. 1673-1683 (2011) describen la manipulación genética mediante introducción de secuencias codificantes de dimerizador de caspasa-9 para generar un sistema para la apoptosis inducible en las células.

Long et al., Diabetes, 407-415 (2010) describen un ensayo para medir la fosforilación de STATS en la ruta de señalización de IL-2R.

5 Hombach et al., Gene Therapy 1206-1213 (2010) describen un CAR para el uso en el direccionamiento de células T contra un antígeno específico, en donde el CAR contiene un dominio espaciador Fc de IgG1 modificado entre un scFv y el dominio transmembranal, a cuyo dominio transmembranal se une un dominio de señalización (CD28-CD3ζ).

10 MacDonald et al., The Journal of Clinical Investigation 126, 1413-1424 (2016) describen la modificación de células T_{reg} naturales con un CAR específico de HLA-A2 para generar T_{reg} humanas específicas de un aloantígeno.

Objetivo de la invención

15 El objetivo de la invención es la provisión de una T_{reg} humana, que expresa una proteína de fusión que es un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés), con actividad supresora de HLA-A*02 que es suficientemente fuerte para suprimir el rechazo citotóxico de un trasplante que expresa HLA-A*02, especialmente en un paciente receptor que es negativo para HLA-A*02, para la utilización en el tratamiento de la enfermedad EHCI.

Descripción de la invención

20 La invención consigue el objetivo mediante las características de las reivindicaciones, especialmente mediante la provisión de una célula T_{reg} humana expresante de una proteína de fusión que es un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un dominio scFv que es específico para HLA-A*02 humano (CAR-A*02), y donde dicha célula T_{reg} ha sido manipulada genéticamente para expresar constitutivamente FOXP3 para el uso en el tratamiento de la enfermedad EHCI, p. ej., para el uso en el tratamiento de las reacciones de rechazo citotóxico en pacientes receptores de trasplante. CAR-A*02 proporciona la supresión de las células T citotóxicas al expresarse CAR-A*02 en las células T_{reg} humanas en la presencia de HLA-A*02 humano. CAR-A*02 al expresarse en una célula T_{reg} humana, y la célula T_{reg} humana expresante de CAR-A*02 correspondiente, es un compuesto farmacéutico para el tratamiento de la enfermedad EHCI.

30 La célula T_{reg} que expresa CAR-A*02 se manipula genéticamente para expresar también FOXP3 de manera constitutiva, p. ej., mediante la introducción de un casete de expresión codificante de FOXP3 humano, concurrentemente con la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02 en una célula T_{reg}. Opcionalmente, además de la manipulación genética de una célula T_{reg} para expresar FOXP3, puede manipularse genéticamente una célula T_{reg} además de para expresar CAR-A*02, para expresar un sistema dimerizado de caspasa-9 (p. ej., tal como se describe en DiStasi et al., N. Engl. J. Med. 1673-1683 (2011)) para el agotamiento de las células T_{reg} tras la transferencia en un paciente.

40 La expresión constitutiva de FOXP3 con la proteína de fusión CAR-A*02 puede ser mediante expresión de una fusión de P2A con FOXP3 fusionado en el extremo C-terminal en una proteína de fusión unificada, p. ej., directamente fusionada con el extremo C-terminal de CAR-A*02. Dicha fusión, p. ej., codificada por un casete de expresión adaptado para generar un ARNm unificado codificante de la proteína de fusión CAR-P2A-FOXP3 rendiría FOXP3 libre mediante su hidrólisis respecto del dominio P2A. Una fusión ejemplar de P2A-FOXP3 es SEC ID n.º 22, que puede fusionarse directamente con el extremo C-terminal del dominio hCD3ζ de la proteína de fusión.

45 CAR-A*02 es una proteína de fusión que comprende o consiste en un dominio de anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla (scFv), una bisagra, un dominio transmembranal, un dominio de señalización hCD28 intracelular y un dominio de señalización CD3 intracelular, también denominado hCD3ζ (hCD3 zeta), los cuales preferentemente se unen directamente entre sí de extremo N-terminal a extremo C-terminal. En el dominio scFv, una cadena ligera variable de un anticuerpo está conectada mediante una región bisagra a una cadena pesada variable de un anticuerpo. CAR-A*02 puede comprender un dominio scFv seleccionado de las secuencias de aminoácidos de uno de SEC ID n.º 1 a SEC ID n.º 12; la bisagra CD8 y el dominio transmembranal CD8 preferentemente presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 13, el dominio de señalización CD28 preferentemente presenta una secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 14, y el dominio de señalización CD3 presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 15. Debido a que los dominios de señalización según la invención presentan una secuencia de aminoácidos humana o humanizada, en la presente memoria también se indica como «h». La bisagra puede estar formada por el dominio de IgG hΔFc, preferentemente de SEC ID n.º 20. El dominio transmembranal CD8, el dominio de señalización hCD28 y el dominio de señalización hCD3ζ pueden intercambiarse por una fusión de un dominio transmembranal hCD28, un dominio de señalización hCD28 y el dominio de señalización hCD3ζ, preferentemente de SEC ID n.º 21.

60 La proteína de fusión CAR-A*02 presenta la ventaja de que es altamente específica para HLA-A*02. Su expresión en T_{reg} conduce a un incremento de la proliferación de las T_{reg} en la presencia de HLA-A*02 y resulta en una actividad supresora incrementada de las T_{ef} (células T efectoras).

65 La proteína de fusión CAR-A*02 puede expresarse en una T_{reg} a partir de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de fusión en un casete de expresión. El casete de expresión codificante de la proteína de

fusión CAR-A*02 puede estar contenido en un vector vírico para la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos, p. ej., mediante transducción, utilizando una partícula vírica que contenga el vector vírico.

- 5 Para la producción *in vitro* de células T_{reg} que expresan CAR-A*02, preferentemente se utilizan células T_{reg} originadas en el receptor del trasplante, quien puede ser un futuro receptor o un receptor que ha recibido un trasplante. Las células T_{reg} son CD4⁺, CD25^{high} y CD127^{low} y deben aislarse a partir de pacientes negativos para HLA-A*02, p. ej., de una muestra de sangre mediante separación celular, p. ej., utilizando FACS o microesferas magnéticas con anticuerpos específicos.
- 10 Es una ventaja que las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 previamente a la introducción en el paciente y tras la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02 respectivamente, no resulta necesaria ninguna expansión *in vitro* previamente a la introducción de estas células T_{reg} en el paciente. Por ejemplo, no se lleva a cabo ninguna expansión *in vitro* que comprenda el cultivo de dichas células T_{reg} en la presencia de agentes estimulantes en el medio de cultivo, durante el procedimiento de producción de estas células T_{reg}. Preferentemente,
- 15 tras la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02, las células T_{reg} se mantienen en cultivo durante aproximadamente 24 h para permitir la expresión de CAR-A*02, seguido de la separación celular para aislar las células T_{reg} que expresan CAR-A*02. En este cultivo, no se encuentra presente ningún agente estimulante de la expansión en el medio de cultivo, p. ej., ningún anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28. En dicho cultivo, el medio contiene una dosis baja de IL-2, p. ej., a 50 U/ml de medio, con el fin de evitar la muerte de las células T_{reg}. Se ha encontrado que las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 resultan eficaces en la migración al trasplante y eficaces en la supresión de la respuesta citotóxica dirigida contra el trasplante y que las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 presentan una actividad de supresión estable.
- 20 El dominio scFv de CAR-A*02 es muy específico para HLA-A*02 y hasta la fecha no se ha observado reactividad cruzada o toxicidad. Además, no se ha observado actividad intrínseca de CAR-A*02, excluyendo actividad supresora independiente de la presencia de HLA-A*02. La actividad supresora de las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 se ha encontrado que es drásticamente superior que la actividad supresora de las células T_{reg} no previamente expuestas (nT_{reg}).
- 25 Las células T_{reg} que presentan actividad supresora en la presencia de HAL-A*02 pueden producirse mediante la introducción de una secuencia codificante de CAR-A*02 en las células T_{reg} originadas del donante previamente al contacto del mismo con HLA-A*02 o en células T_{reg} originadas a partir del donante tras el contacto del mismo con HLA-A*02, p. ej., del receptor del trasplante tras el trasplante.
- 30 Resulta generalmente preferente que la proteína de fusión en su extremo N-terminal comprenda un péptido líder para la secreción de la proteína de fusión a fin de facilitar el transporte transmembranal de los dominios scFv y la disposición del dominio transmembrana (TM) a través de la membrana celular. Una secuencia líder de ejemplo es SEC ID n.º 24, preferente para CAR-A*02.
- 35 La proteína de fusión preferentemente comprende una bisagra y un dominio transmembranal que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 13, un dominio de señalización hCD28 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 14 y un dominio de señalización hCD3ζ (hCD3 zeta) que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 15. Dicha proteína de fusión alternativamente puede comprender una bisagra que es un dominio hΔFc de IgG que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 20. Dicha proteína de fusión puede comprender una bisagra
- 40 y un dominio transmembranal, que es un dominio transmembranal CD8, que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 13, un dominio de señalización hCD28 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 14, y un dominio hCD3 ζ que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 15, o el dominio de señalización hCD28 que incluye el dominio de señalización hCD3ζ que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 21. Dicha proteína de fusión puede caracterizarse adicionalmente porque se expresa en una célula T reguladora (T_{reg}) humana
- 45 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} negativa para HLA-A*02. Dicha proteína de fusión puede caracterizarse adicionalmente porque el paciente es negativo para HLA-A*02 y porque el paciente contiene o se pretende que contenga un trasplante de tejido sólido que es positivo para HLA-A*02. Dicha proteína de fusión puede comprender o consistir en, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, un dominio scFv que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n.º 1 y SEC ID n.º 12, una bisagra y un dominio transmembranal que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 13, un dominio de señalización hCD28 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID
- 50 n.º 14 y un dominio de señalización hCD3ζ (hCD3 zeta) que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 15. Dicha proteína de fusión puede expresarse a partir de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de fusión con opcionalmente un péptido líder secretorio N-terminal adicional. Dicha proteína de fusión puede expresarse a partir de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de fusión con un péptido líder secretorio N-terminal adicional y un P2A-hFOXP3 C-terminal adicional que presenta la secuencia de aminoácidos SEC
- 55 ID n.º 22. Dicha proteína de fusión puede comprender un péptido líder que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID n.º 24 y SEC ID n.º 25. Dicha proteína de fusión puede proporcionar actividad supresora de una célula T reguladora (T_{reg}) humana CD4⁺CD25⁺CD127^{low} negativa para HLA-A*02 en la presencia de tejido sólido positivo para HLA-A*02. Dicha proteína de fusión puede proporcionar, además, capacidad de orientación a
- 60 órganos linfoides secundarios a una célula T reguladora (T_{reg}) humana CD4⁺CD25⁺CD127^{low} negativa para HLA-A*02.
- 65

El procedimiento para proporcionar una célula T reguladora (T_{reg}) humana con actividad supresora en la presencia de tejido sólido positivo para HLA-A*02 puede comprender las etapas de:

- 5 a. aislar a partir de una muestra de sangre, células T reguladoras (T_{reg}) humanas $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ para producir células T_{reg} aisladas,
 b. introducir una secuencia de ácidos nucleicos codificante y expresante de una proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 15 en las células T_{reg} aisladas para producir células T_{reg} que expresan la proteína de fusión,
 10 en donde las células T_{reg} que expresan la proteína de fusión no se expanden en cultivo *in vitro*.

El aislamiento de las células T reguladoras humanas puede ser el aislamiento de células T reguladoras humanas negativas para HLA-A*02.

- 15 El procedimiento puede comprender, además, la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos, que está comprendida en un vector retroviral que está empaquetado en una partícula retroviral, en las células T_{reg} aisladas mediante transducción. Tras la etapa b., las células T_{reg} pueden mantenerse en cultivo durante 24 h, seguido del aislamiento de las células T_{reg} que expresan la proteína de fusión. Las células T_{reg} pueden mantenerse en cultivo en un medio que contiene una dosis baja de IL-2, cuyo medio no contiene un agente estimulante de expansión de las
 20 células T_{reg} .

A continuación, se describe la invención en mayor detalle mediante ejemplos en referencia a las figuras, en las que:

- la fig. 1a muestra esquemáticamente un constructo de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02 según la invención adecuado para la transducción retroviral de células T_{reg} .
- 25 • La fig. 1b muestra un modelo esquemático de CAR-A*02 dispuesto en una membrana celular.
- La fig. 1c muestra los resultados de FACS que indican la expresión de CAR-A*02 y de un CAR de control comparativo sobre la superficie de las células.
- La fig. 1d muestra los resultados de FACS que indican que las T_{reg} transducidas expresan CAR-A*02 y se unen específicamente a HLA-A*02.
- 30 • La fig. 1e muestra los resultados de FACS que indican que las T_{reg} transducidas con CAR-A*02 no se unen a HLA-A*01.
- La fig. 1f muestra los resultados de FACS para la expresión en superficie y la especificidad de CAR de control para PE.
- 35 • La fig. 2a muestra los resultados de FACS para CCR7, CD39, CD45RO, CD45RA y CTLA-4 para células T_{reg} no transducidas y para células T_{reg} que expresan CAR-A*02.
- La fig. 2b muestra los resultados de FACS para fosforilación de STATS en células T_{reg} expresantes de CAR-A*02 y para células T_{reg} no transducidas.
- La fig. 2c muestra un gráfico que representa la fosforilación de STATS en respuesta a la concentración de IL-2.
- 40 • La fig. 3a muestra los resultados de FACS para la actividad de células T_{reg} que expresan CAR-A*02 en respuesta a células estimuladoras.
- La fig. 3b muestra los resultados de FACS para la proliferación y la expresión de CD39 en células T_{reg} que expresan CAR-A*02 o un CAR de control en respuesta a la estimulación específica.
- 45 • La fig. 3c muestra un gráfico de la supresión de las células T efectoras por células T_{reg} que expresan CAR-A*02 en diferentes proporciones celulares, *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.
- La fig. 4a muestra los resultados de la actividad supresora en una reacción linfocitaria mixta (MLR, por sus siglas en inglés) *in vivo*.
- La fig. 4b muestra un gráfico del análisis de un experimento de trasplante de un animal utilizando la expresión de CAR-A*02 en células T_{reg} , y la
 50 • fig. 4c muestra los resultados de FACS de un experimento de trasplante de un animal utilizando la expresión de CAR-A*02 en células T_{reg} .

Generalmente, los resultados de FACS que se muestran son representativos de tres experimentos independientes.

55 *Ejemplo 1: vector retroviral codificante de CAR-A*02 y células que expresan CAR-A*02*

Se generaron los dominios scFv para CAR-A*02 mediante selección por afinidad para HLA-A*02 utilizando una biblioteca de exposición fágica expresante de un anticuerpo anti-HLA-A*02. Se clonó el anticuerpo anti-HLA-A*02 (secuencias de nucleótidos accesibles de EBI para la cadena pesada: AF163303; cadena ligera: AF163304) a partir
 60 de un paciente que había desarrollado anticuerpos reactivos a A*02 después de la transfusión de sangre.

Como resultado, pudieron aislarse anticuerpos que presentaban una afinidad significativamente incrementada para HLA-A*02 en comparación con el anticuerpo anti-HLA-A*02 clonado originalmente.

Las secuencias codificantes para los dominios scFv se clonaron para generar una secuencia codificante para una proteína de fusión, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, que contenían la cadena ligera variable, un conector, la cadena pesada variable, el dominio bisagra hCD8, el dominio transmembranal hCD6, el dominio de señalización intracelular hCD28 y el dominio de señalización intracelular hCD3 ζ . Se clonó la secuencia codificante entre un 5-LTR y un 3-LTR de un vector retrovítico, que entre esta secuencia codificante de CAR-A*02 y el 3-LTR contenía adicionalmente la secuencia codificante de la molécula de superficie no señalizadora Δ LNGFR (factor de crecimiento nervioso de baja afinidad truncado) como proteína informadora bajo el control de un elemento IRES (por sus siglas en inglés, sitio interno de entrada ribosómica) que actúa como promotor. Además de su función como informador de la expresión de CAR-A*02, dicho informador puede utilizarse para el aislamiento de células transducidas, p. ej., mediante aislamiento de afinidad utilizando un anticuerpo específico para el informador y acoplado a un portador, p. ej., a perlas magnéticas.

Para la transducción, la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02 se clonó en un vector de expresión controlado por LTR (por sus siglas en inglés, repetición terminal larga) de retrovirus gamma.

Se detectó el informador Δ LNGFR mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti-CD271 (C40-1457, Becton Dickinson).

Para la introducción de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de CAR-A*02, un informador, p. ej., Δ LNGFR, estaba contenido en un vector retrovítico, produciendo partículas víricas que contenían el vector tal como se describe en Galla et al., Nuc. Ac. Res. 39, 1721-1731 (2009). Tras el aislamiento de las células T_{reg}, que se consideran células nT_{reg}, estas se estimularon con anticuerpo anti-CD3 unido a placa (OKT-3, 5 μ g/ml) y anticuerpo anti-CD28 soluble (CD28.2, obtenido de BioLegend, 5 μ g/ml) en medio completo durante 48 h. Antes de la transducción, se añadió sulfato de protamina (4 μ g/ml, obtenido de Sigma) a los cultivos de T_{reg}. Las células T_{reg} se infectaron mediante centrifugación con partículas retrovíricas codificantes de CAR-A*02 o CAR de control específico para PE a 31 °C y 700 x g durante 1,5 h.

Tras la transducción con el vector de expresión para CAR de control, las células SC-1 pudieron teñirse inmunológicamente para Δ LNGFR mediante anticuerpo anti-CD271 y se tiñeron para scFv utilizando Fab anti-IgG (obtenido de Jackson Lab.), demostrando la expresión en superficie de CAR de control y el reconocimiento de PE por CAR de control. Aunque las células SC-1 no expresan ni FOXP3 ni B220, muestra tinción positiva con un anticuerpo conjugado con PE.

Se aislaron células T_{reg} humanas procedentes de PBMC humanas utilizando FACS con las combinaciones de anticuerpos siguientes: anti-CD8 (HIT8a, obtenido de BioLegend), anti-CD4 (RPA-T4, obtenido de Becton Dickinson), anti-CD25 (M-A251, obtenido de Becton Dickinson), anti-CD1237 (hIL-7R-M21, obtenido de Becton Dickinson), resultando en el aislamiento de células T_{reg} CD8⁻ CD4⁺ C25^{high}, CD8⁻ CD4⁺ C25^{high} CD127^{low} con una pureza mínima de 90 %. La preparación de PBMC se produjo mediante centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque Plus (obtenido de GE Healthcare) a partir de diferentes donantes sanos con tipado de HLA tras la aprobación ética y obtener el consentimiento informado por escrito de cada uno.

Las células T_{reg} se transdujeron tal como se describe en Gall et al., Nuc. Ac. Res. 39, 1721-1731 (2009). Generalmente, todos los cultivos de células T y todos los ensayos relacionados con células T se llevaron a cabo en medio completo (RPMI 1640, GlutaMax-1 (obtenido de Gibco), suplementado con suero de feto bovino al 10 % (FBS, por sus siglas en inglés) (obtenido de Gibco), penicilina y estreptomina al 1 % (obtenidos de Biochrom), β -mercaptoetanol 0,05 mM (obtenido de Gibco), HEPES 20 mM (obtenido de Gibco), piruvato sódico al 1 % (obtenido de Gibco) y 500 UI/ml de IL-2 (Proleukin, obtenida de Novartis) en incubadores humidificados a 37 °C con 5 % de CO₂. Todas las líneas celulares dieron resultado negativo en pruebas para micoplasma.

La fig. 1a muestra la organización del constructo de ácidos nucleicos de CAR-A*02, incluyendo la secuencia codificante para el informador Δ LNGFR bajo el control de un elemento IRES flanqueado por una 5-LTR y una 3-LTR del vector retrovirus gamma. Generalmente, la expresión de una proteína unida a membrana en una célula T_{reg}, p. ej., bajo el control de un IRES unido a la secuencia codificante de CAR-A*02, preferentemente en un vector vírico, puede utilizarse para el aislamiento de células T_{reg} manipuladas genéticamente mediante aislamiento por afinidad centrado en la proteína unida a membrana. Un ejemplo de dicha proteína unida a membrana es Δ LNGFR.

La fig. 1b muestra un modelo de CAR-A*02 con su dominio transmembranal que cruza la membrana celular y el scFv dispuesto en la superficie celular externa y los dominios de señalización intracelulares dispuestos en el citoplasma.

La expresión anclada a membrana de la proteína de fusión sobre la superficie de las células se sometió a ensayo utilizando la transducción de células de hibridoma. Brevemente, se transdujeron células de hibridoma con los vectores retrovíricos codificantes de CAR-A*02 o la proteína de fusión de control negativo. La estimulación de las células de hibridoma transducidas fue por contacto con diversas PBMC (por sus siglas en inglés, células mononucleares de sangre periférica) humanas positivas para HLA-A*02 o negativas para HLA-A*02. El cocultivo se llevó a cabo durante 20 h con las células de hibridoma transducidas y se irradió (30 Gy). Para la tinción específica de Δ LNGFR, se utilizó

un anticuerpo anti-CD271, C40-1457 (obtenido de Becton Dickinson); para la tinción específica de CAR-A*02, se utilizó el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IgG-F(ab) (obtenido de Jackson Labs). El análisis se llevó a cabo generalmente mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACSalibur (Becton Dickinson) o un LSRII (Becton Dickinson) utilizando el software FACSDiva y el software FlowJo (Tree Star Inc.). Para el análisis estadístico, se utilizó GraphPad Prism, versión 5.0.

La fig. 1c muestra la expresión y localización del informador Δ LNFR sobre la superficie de las células de hibridoma transducidas en células de hibridoma originales (no transducidas), la tinción para Δ LNFR (CAR de control) solo y la tinción para CAR-A*02 (A2-CAR). Los resultados muestran que tanto el informador Δ LNFR como CAR-A*02 se habían expresado sobre la superficie de las células de hibridoma transducidas.

Las células Treg (CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}) aisladas a partir de una persona negativa para HLA-A2* (donante negativo para HLA-A*02) se transdujeron con el vector retrovírico para expresar CAR-A*02 y el informador Δ LNFR. Para la tinción, se utilizaron tetrámeros de HLA I que muestran un péptido del virus de la hepatitis C (pentámero HLA-A1 del CMV, obtenido como pp65 de Prolimmune).

Los resultados de FACS de la fig. 1d muestran que las células transducidas se tiñeron con tetrámeros de HLA-A*0201 (A*0201, obtenido de Beckman Coulter Immunomics, San Diego, EE. UU.).

Los resultados de FACS de la fig. 1e muestran que las células T_{reg} procedentes de una persona positiva para HLA-A* (donante positivo para HLA-A*02), transducidas para expresar CAR-A*02 y el informador Δ LNFR, no se tiñeron con los tetrámeros A*01.

Los resultados de la fig. 1 muestran que CAR-A*02 se expresa sobre la superficie de las células T_{reg} transducidas, y que reconoce específicamente los tetrámeros de HLA-A*02, p. ej., no reconociendo los tetrámeros de HLA-A*01. Además, se encontró que la tinción específica por los tetrámeros de A*02 era independiente del péptido unido al tetrámero de A*02.

Como CAR de control negativo, la proteína de fusión que contenía un scFv específico para ficoeritina (PE) en lugar del scFv específico para HLA-A*02, aunque de otro modo idéntica, estaba codificada en el mismo vector de expresión. Para determinar la expresión en superficie y la especificidad del CAR de control, las células SC-1, células embrionarias de ratón fetal que carecen de restricciones de rango de hospedador para los virus de la leucemia murina (ATCC n.º CRL-1404) se transdujeron de acuerdo con Noyan et al., Cancer Gene Therapy 19, 352-357 (2012). Se evaluó la especificidad del CAR de control para la ficoeritina (PE) mediante la utilización de varias proteínas conjugadas con PE y anticuerpos conjugados con PE: B220-PE murino (RA3-6B2, obtenido de Caltag), Foxp3-PE murino y Foxp3-PacBlue murino (FJK-16s, obtenido de eBioscience), utilizando el kit Fix/Perm de eBioscience para la tinción de Foxp3 intracelular de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados de FACS de la fig. 1f muestran que el CAR de control negativo se expresa sobre la superficie de las células y reconoce PE.

El fenotipo de las células T_{reg} que expresa CAR-A*02 se analizó utilizando células T_{reg} obtenidas de donantes negativos para HLA-A*02 con el fin de evitar la activación de CAR-A*02 por las células T_{reg} mismas tras la transducción. Esta situación se aproxima a la situación en un receptor negativo para HLA-A*02. Se encontró que la transducción no afectó esencialmente al fenotipo nT_{reg}, con niveles similares de moléculas efectoras CTLA-4 y CD39 mostrados en las células T_{reg} transducidas con CAR-A*02 y en células nT_{reg} no transducidas, y se requirieron porcentajes similares de células T_{reg} no expuestas previamente CD45RA⁺ y una expresión similar de CCR7 para orientar las células hacia los órganos linfoides secundarios. Para la tinción, se utilizaron los anticuerpos anti-CD39 (A1, obtenidos de BioLegend), anti-CD45RA (HI100, obtenidos de Becton Dickinson), antiCD45RO (UCHL1, obtenidos de BioLegend), anti-CCR7 (3D12, obtenidos de Becton Dickinson), anti-CTLA-4 (BNI3, obtenidos de Becton Dickinson) y anti-FoxP3 (PCH101, obtenidos de eBioscience). La fig. 2a muestra estos resultados de FACS. Se observó el mismo fenotipo para las células T_{reg} transducidas con CAR de control específico para PE.

Se midió la fosforilación de STATS mediante FACS (método descrito en Long et al., Diabetes, 407-415 (2010) utilizando el anticuerpo anti-pSTAT5 (pY694, 47/SAT obtenido de Becton Dickinson) a diferentes dosis de IL-2 para células T_{reg} transducidas con CAR-A*02 y nT_{reg} no transducidas del mismo experimento. Los resultados de FACS se muestran en la fig. 2b, en donde muestran que ambas células T_{reg} mostraban niveles elevados de fosforilación de STATS ya bajo las dosis bajas de IL-2 necesarias para la supervivencia de las nT_{reg} en cultivo. Las células T_{reg} transducidas con CAR-A*02 mostraron un nivel basal más alto y un nivel de fosforilación de STATS máximo ligeramente más alto que las células no transducidas. El gráfico de la fig. 2c compara los niveles de fosforilación de STATS en función de las dosis de IL-2. No se observaron defectos en la señalización de IL-2. Estos resultados muestran que la transducción de las células T_{reg} para expresar CAR-A*02 no afectó significativamente la fosforilación de STATS, indicando que no había disminuido la capacidad de orientación de estas células transducidas.

Para el análisis de la función de las células transducidas con CAR-A*02, hibridomas de células T que expresaban establemente un constructo informador que contenía un promotor de IL-2 sensible a NFAT para controlar la expresión

de GFP se transdujeron con CAR-A*02. Para la detección de la expresión de CAR en el análisis de FACS, se detectó el informador ΔLNGFR; la estimulación de NFAT se detectó como expresión de GFP (proteína fluorescente verde, por sus siglas en inglés).

5 Tal como se muestra en la fig. 3a, se encontró que las células transducidas con CAR-A*02 (A2-CAR) no mostraban ninguna activación de NFAT ni la expresión asociada de GFP tras la transducción, aunque la activación de NFAT y la expresión de GFP se resultaron fuertemente reguladas en positivo por el cocultivo con las células PBMC HLA-A*02⁺ que actuaban como células estimuladoras, aunque no en respuesta a PBMC HLA-A*02⁻. Los hibridomas de células T no transducidos y las células que fueron transducidas con ΔLNGFR (CAR de control) no mostraron una reacción a las células estimuladoras PBMC, ni a las positivas ni a las negativas para HLA-A*02. Este resultado muestra que CAR-A*02 según la invención es capaz de transducir las señales necesarias para activar NFAT. Debido a que los hibridomas no expresaban ningún receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) endógeno, la señal de transducción que se observó está causada completamente por la señalización de CAR-A*02.

15 La diferenciación entre señalización por CAR o por TCR será más difícil al transducir células T_{reg} donantes negativas para HLA-A*02 que con CAR-A*02, debido a que 8 % a 12 % de estas células nT_{reg} presentarán un TCR que también reconoce HLA-A*02. Por lo tanto, se sometió a ensayo CAR-A*02 frente a un amplio panel de PBMC humanas que presentaban diversos alelos de CMH I y CMH II, utilizando la expresión en los hibridomas de células T que contenían el constructo informador. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo de la expresión de GFP. Los resultados mostraron que CAR-A*02 (CAR HLA-A2) al expresarse en los hibridomas reconocía las muestras de donante positivo para HLA-A*02 sin ninguna reactividad cruzada con las muestras de sangre negativas para HLA-A*02. A modo de comparación, se utilizó CAR de control específico para PE (CAR irrelevante). Los resultados se resumen en la tabla a continuación, en la que se indican los HLA-A y HLA-B individuales en cada fila para las muestras numeradas (PBMC humanas) y X designa la expresión de GFP:

25

PBCM humanas	HLA-A		HLAB		CAR HLA-A2	CAR irrelevante
1	2	23	44		X	-
2	3	24	7	13	-	-
3	1	24	8	40	-	-
4	1		a	57	-	-
5	3	24	7	13	-	-
6	2	24	35	37	X	-
7	24	31	13	51	-	-
a	2		51	62	X	-
9	2		60	61	X	-
10	2	3	38	44	X	-
11	3	25	7	18	-	-
12	1	25	35	44	X	-
13	11	23	27	44	-	-
14	2	31	62	27	X	-
15	3		7	62	-	-
16	3	30	7	13	-	-
17	2	24	7	62	X	-
18	3		35		-	-
19	2	3	13	18	X	-
20	1	a	27	60	X	-

Las células de hibridoma que expresan CAR de control tras el cocultivo con las muestras de sangre no expresaron GFP (-) para ninguno de los HLA. Ello demuestra la elevada especificidad de CAR-A*02 según la invención para HLA-A*02, mostrando una actividad inespecífica o fuera de diana baja o nula.

30

El efecto de activar CAR-A*02 según la invención al expresarlo en células T_{reg} humanas negativas para HLA-A*02 se sometió a ensayo utilizando PBMC positivas para HLA-A*02 como células estimuladoras. La proliferación de las células T_{reg} expresantes de CAR-A*02 se analizó basándose en un ensayo de dilución de CFSE, para el que se marcaron las células T_{reg} con CFSE (5 mM, obtenido de Invitrogen). Para las células T_{reg} negativas para HLA-A*02 que expresaban CAR-A*02 se utilizó la estimulación policlinal mediante cocultivo con PBMC positivas para HLA-A*02 (células estimuladoras) irradiadas (30 Gy), que también se pusieron en contacto con el pigmento de proliferación celular APC, 5 mM (eFluor 670, obtenido de eBioscience) en una proporción 1:4. Para las células T_{reg} humanas negativas para HLA-A*02 transducidas para expresar CAR de control (específico para PE), la estimulación fue con anti-CD3/anti-CD28 dirigido al TCR. La detección de CD39 utilizando el anticuerpo anti-CD39 (A1, BioLegend) se midió para la activación de T_{reg}, y se detectó CFSE para la proliferación. Para la comparación, se llevó a cabo un análisis de FACS de la dilución de CFSE en células proliferantes. Los resultados de FACS se ilustran en la fig. 3b, que muestra que CAR-A*02 resultó fuertemente activado por las PBMC positivas para HLA-A*02, resultando en una fuerte proliferación y la regulación positiva de la molécula efectora CD39. Este efecto fue mucho más fuerte que en las células

40

T_{reg} activadas que expresaban el CAR de control. Las células T_{reg} que expresan el CAR de control probablemente son activadas mediante su TCR aloespecífico, ya que este se encuentra hasta en 12 % de todas las células nT_{reg} . También se observó la regulación positiva de CD39 con la activación, utilizando la combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, que actúan sobre el TCR. Estos indican que las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 según la invención pueden activarse igualmente bien mediante CAR-A*02 que mediante el TCR.

Se supone que la elevada capacidad de proliferación de las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 según la invención tras la transferencia a un paciente apoya su efecto, es decir, su capacidad de ocupación de nicho.

Ejemplo 2: actividad supresora de CAR-A*02 *in vitro*

La actividad supresora de las células T_{reg} que expresan CAR-A*02 del Ejemplo 1 se sometió a ensayo analizando la supresión de una reacción linfocitaria mixta (MLR, por sus siglas en inglés) alogénica dirigida contra las células estimuladoras CD1c positivas para HLA-A*02. Las células respondedoras eran células T efectoras $CD4^+ CD25^+$ marcadas con CFSE (5 mM) que habían sido cocultivadas con células $CD1c1^+ HLA-A*02$ aisladas en la presencia de diversas proporciones de células T_{reg} HLA-A1 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$ singénicas (nT_{reg}) o células T_{reg} singénicas que expresaban CAR-A*02 durante cinco días. Se calculó la supresión de la proliferación de las células T efectoras singénicas basándose en las proporciones T_{reg}/T_{ef} mediante un ensayo de dilución de CFSE. Para la comparación, se utilizaron células nT_{reg} no transducidas del mismo experimento de transducción.

El resultado se ilustra en la fig. 3c, que muestra que las células T_{reg} que expresaban CAR-A*02 (T_{reg} A2-CAR) inhibieron con mucha mayor potencia la proliferación de células T efectoras aloespecíficas que las células T_{reg} no transducidas (nT_{reg}). Las células T_{reg} que expresaban CAR-A*02 eran supresores más potentes a prácticamente todas las proporciones sometidas a ensayo de T_{reg} /células T efectoras expresantes de CAR-A*02. Incluso a una proporción de 1:64 de células T_{reg} /células T efectoras expresantes de CAR-A*02 (proporción T_{reg}/T_{ef}), se observó una inhibición superior a 60 %, demostrando la fuerte actividad supresora que confiere la proteína de fusión de CAR-A*02.

Para el análisis de las consecuencias de la señalización en células T_{reg} por CAR-A*02, se llevó a cabo un análisis del transcriptoma que comprendía 1149 genes, mediante secuenciación profunda en células T_{reg} no activadas y expresantes de CAR-A*02 y se compararon los resultados con los obtenidos con células T_{reg} no transducidas. Las células T_{reg} expresantes de CAR-A*02 ($CD4^+ CD25^{high} CD127^{low}$) se activaron con PBMC HLA-A*02⁺ irradiadas (30 Gy) como células estimuladoras mediante cocultivo durante 36 h. Como control, se dejaron sin tratar células T_{reg} no transducidas o se estimularon mediante sus TCR mediante los anticuerpos combinados anti-CD3/anti-CD28, durante 48 h. Tras la estimulación, se aisló el ARN utilizando el kit MicroRNeasy (obtenido de Qiagen), y se midió la calidad e integridad del ARN total en un aparato Bioanalyser 2100 de Agilent Technologies. Se generó una biblioteca de secuenciación de ARN a partir de 100 ng de ARN total utilizando kits de prep. de muestras de ARN TruSeq (obtenido de Illumina) para la purificación del ARNm seguido por el kit de preparación de bibliotecas de secuencias de ARN ScriptSeq v2 (obtenido de Epicentre) siguiendo los protocolos del fabricante. Las bibliotecas se secuenciaron en un dispositivo Illumina HiSeq2500 utilizando el kit TruSeq SBS v3-HS (50 ciclos, carrera de un solo extremo) con una media de 3×10^7 lecturas por muestra de ARN. Las lecturas se alinearon con el genoma de referencia hg19 utilizando el alineador de secuencias cortas de código abierto STAR con los parámetros por defecto. Las lecturas por gen tras la alineación se realizaron con la función feature.count del paquete R denominado Rsubread. Para la transformación de log2 de los datos de recuentos en bruto seguido de la normalización de los datos y determinación estadística de los genes expresados diferencialmente, se utilizó el paquete R llamado edgeR.

Se encontró que las células T_{reg} transducidas con CAR-A*02 y las células T_{reg} no transducidas presentaban un patrón muy similar de transcritos activados y regulados negativamente, apoyando la idea de que la señalización mediante CAR-A*02 conduce a perfiles de transcripción en las células T_{reg} comparables a los obtenidos con la señalización mediante TCR. La activación de CAR-A*02 o de los TCR, respectivamente, resultó en cambios drásticos de los perfiles transcripcionales en comparación con el estado no activado, aunque los perfiles transcripcionales de ambos estados activados eran similares entre sí. Un análisis de los genes específicos que participan en la función de las células T_{reg} y su orientación hacia diferentes tejidos reveló diferencias sutiles. Las células T_{reg} activadas por CAR-A*02 expresaban cantidades más altas de IL-4, IL-5 e IL-10, aunque un número de transcritos ligeramente inferior de CTLA4 e IL-2R. Estos niveles reducidos de transcritos aparentemente no presentaron consecuencias evidentes sobre la expresión de proteína CTLA4 (fig. 2a) ni sobre la señalización de IL-2 (figs. 2b y 2c).

Ejemplo 3: actividad supresora de CAR-A*02 *in vivo*

Como ejemplo de la actividad supresora *in vivo*, ratones diabéticos no obesos (NOD)-RAG1^{null}IL2 γ ^{null} (NRG) humanizados recibieron 5×10^4 células T_{reg} $CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$ humanas no reconstituidas procedentes de donantes negativos para HLA-A*02, las cuales se transdujeron con el vector retroviral codificante de CAR-A*02 según el Ejemplo 1, o las mismas células T_{reg} transducidas con CAR de control (específico para PE) del Ejemplo 1, o las células T_{reg} no transducidas. Como ejemplo de tejido trasplantado, se inyectaron 5×10^5 PBMC HLA-A*01 singénicas irradiadas, mezcladas con PBMC HLA-A*02 alogénicas irradiadas como MLR *in vivo* en cada pabellón auditivo de ratones.

Estos experimentos se llevaron a cabo con enmascaramiento. Para determinar la actividad supresora, se midió la hinchazón de las orejas utilizando un medidor de grosor digital con resorte. La fig. 4a muestra los resultados de hinchazón de las orejas, calculada como la diferencia entre el grosor de oreja antes de la inyección y 24 h después de la inyección, en donde cada valor se relaciona con la hinchazón de oreja observado en la otra oreja del animal que no había recibido inyección de células T_{reg} , a modo de control interno.

El resultado se ilustra en la fig. 4a, que muestra una inhibición significativamente más fuerte de la reacción linfocitaria mixta alogénica para las células T_{reg} que expresaban CAR-A*02 (T_{reg} A2-CAR) que las células T_{reg} que expresaban CAR de control (T_{reg} CAR de control) y en comparación con las T_{reg} no transducidas (T_{reg} $CD4^+ CD25^{high}$).

En otro experimento se analizó la actividad supresora en ratones NRG inmunorreconstituidos. Actualmente, el ensayo del rechazo del trasplante en dichos ratones resulta difícil, ya que, en ratones inmunocomprometidos, un trasplante de piel alogénico se rechazó dentro de los 10 días, mientras que un rechazo similar en ratones NRG humanizados no ocurre antes del día 30 después del trasplante. En este punto tardó en el tiempo, las respuestas de injerto contra el hospedador xenoespecíficos ya se han vuelto patentes tras la reconstitución inmunitaria. Con el fin de evitar otros efectos aparte de la reacción EHCI, se utilizó un modelo de rechazo estricto en el que las células trasplantadas alogénicas se rechazan totalmente llegado el día 5 después del trasplante mediante inyección. La utilización de células de trasplante alogénico inyectadas presenta la ventaja adicional de que la orientación de las células T_{reg} a los tejidos trasplantados no debería desempeñar un papel importante, ya que la respuesta inmunitaria se inicia en el bazo, por lo que se evitan posibles efectos de la orientación perturbada en ratones humanizados.

Como células T_{reg} , se utilizaron células T_{reg} humanas $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ transducidas con CAR-A*02 según el Ejemplo 1, o las mismas células T_{reg} transducidas con CAR de control (específico para PE) del Ejemplo 1, o células T_{reg} no transducidas. Se realizó un seguimiento de la inmunorreconstitución mediante FACS, 14 días después de la reconstitución mediante expresión de CD8 humano y CD4 humano en muestras de sangre periférica procedente de la vena mandibular. Los animales sin reconstitución perceptible de las células T CD8 y CD4 fueron excluidos de los experimentos. El día 14 después de la inmunorreconstitución, los ratones recibieron inyecciones i.v. de 5×10^5 PBMC singénicas marcadas con CFSE y 5×10^5 PBMC HLA-A*02 como células diana positivas alogénicas que se marcaron con el pigmento de proliferación APC. Simultáneamente, diferentes animales recibieron diferentes células T_{reg} a razón de 5×10^4 , que eran T_{reg} expresantes de CAR-A*02 (T_{reg} A2-CAR⁺) o CAR de control (T_{reg} positivas para CAR de control) o no transducidas (nT_{reg} positivas). Cinco días después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se analizó la sangre y células esplénicas para dianas alogénicas y células donantes singénicas, y se compararon con los obtenidos en animales que no habían recibido células T_{reg} (T_{reg} sin adición). El marcaje de las células singénicas y alogénicas permitió evaluar la eliminación relativa de células diana alogénicas en los animales ya que ambas poblaciones celulares se inyectaron en una proporción celular de 1:1.

Se ilustran resultados de FACS representativos en la fig. 4c, que muestra que, en ratones inmunocompetentes, las células diana alogénicas ya no eran detectables 120 h después del trasplante, correspondiente al rechazo rápido del tejido alogénico en los ratones no humanizados. La inyección de T_{reg} que expresaban CAR de control o de T_{reg} no transducidas presentó un efecto pequeño en de bloqueo de la eliminación de las células diana alogénicas, la transferencia de las células T_{reg} expresantes de CAR-A*02 evitó por completo el rechazo de las células diana alogénicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células T_{reg} humana que expresa una proteína de fusión que es un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un dominio scFv específico para HLA-A*02 humano (CAR-A*02) y cuya célula T_{reg} ha sido manipulada genéticamente para expresar constitutivamente FOXP3, para la utilización en el tratamiento de la enfermedad EHCI.
- 10 2. Célula T_{reg} humana para la utilización según la reivindicación 1, en la que se introduce un casete de expresión codificante de FOXP3 humana concurrentemente con una secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02 en la célula T_{reg}.
- 15 3. Célula T_{reg} humana para la utilización según la reivindicación 1, en la que la expresión de FOXP3 con la proteína de fusión CAR-A*02 se realiza mediante la expresión de una fusión de P2A con FOXP3 fusionado en el extremo C-terminal en una proteína de fusión unificada.
- 20 4. Célula T_{reg} humana para la utilización según la reivindicación 3, en la que la fusión de P2A con FOXP3 presenta la secuencia mostrada en SEC ID n.º 22.
- 25 5. Célula T_{reg} humana para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha célula ha sido adicionalmente manipulada genéticamente para expresar un sistema de dimerización de caspasa-9.
- 30 6. Célula T_{reg} humana para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que CAR-A*02 comprende o consiste en un dominio de fragmento variable de cadena sencilla (scFv), una bisagra, un dominio transmembranal, un dominio de señalización hCD28 intracelular y un dominio de señalización CD3 intracelular.
- 35 7. Célula T_{reg} humana para la utilización según la reivindicación 6, en la que la bisagra es una bisagra hCD8 modificada y en la que el dominio transmembranal es un dominio transmembranal hCD8.
- 40 8. Método *in vitro* para introducir actividad supresora específica para HLA-A*02 en células T_{reg}, mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de fusión CAR-A*02 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 o 7 en células T_{reg}, en la que dichas células no contienen o expresan HLA-A*02 y expresan la proteína de fusión y adicionalmente la manipulación genética de dichas células para expresar constitutivamente FOXP3.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, en el que un casete de expresión codificante de FOXP3 humana se introduce concurrentemente con dicha secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR-A*02 en la célula T_{reg}.
- 50 10. Método según la reivindicación 8, en el que la expresión de FOXP3 con las proteínas de fusión CAR-A*02 se realiza mediante expresión de una fusión de P2A con FOXP3 fusionado en el extremo C-terminal en una proteína de fusión unificada.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la fusión de P2A con FOXP3 presenta la secuencia indicada en SEC ID n.º 22.
12. Secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de fusión que es un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un dominio scFv específico para HLA-A*02 humano (CAR-A*02), P2A y FOXP3 fusionado en el extremo C-terminal, en una proteína de fusión unificada.
13. Vector vírico que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 12.

Figura 1A

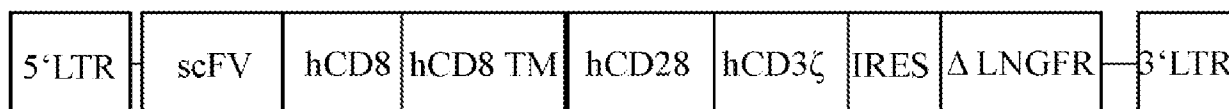


Figura 1B

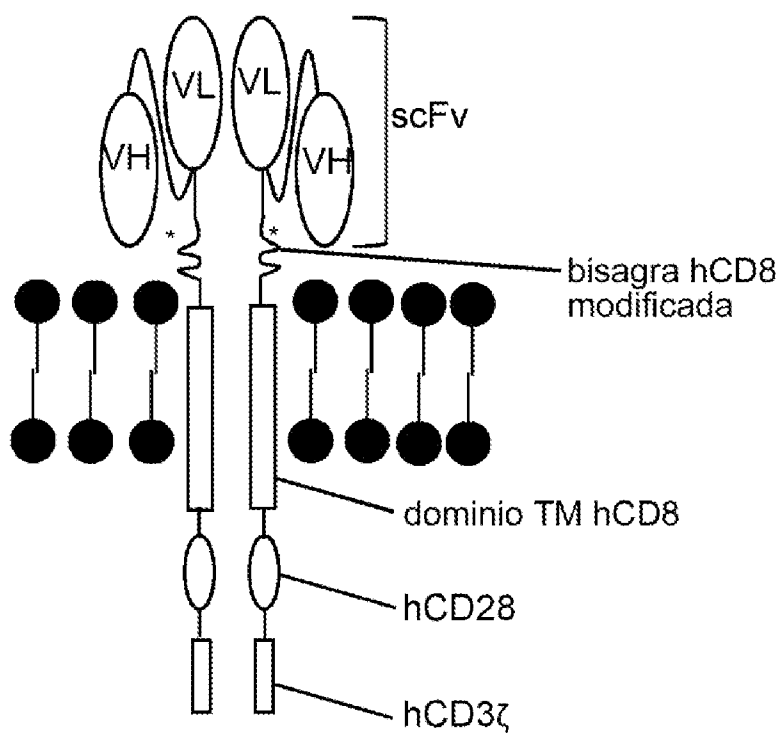


Figura 1C

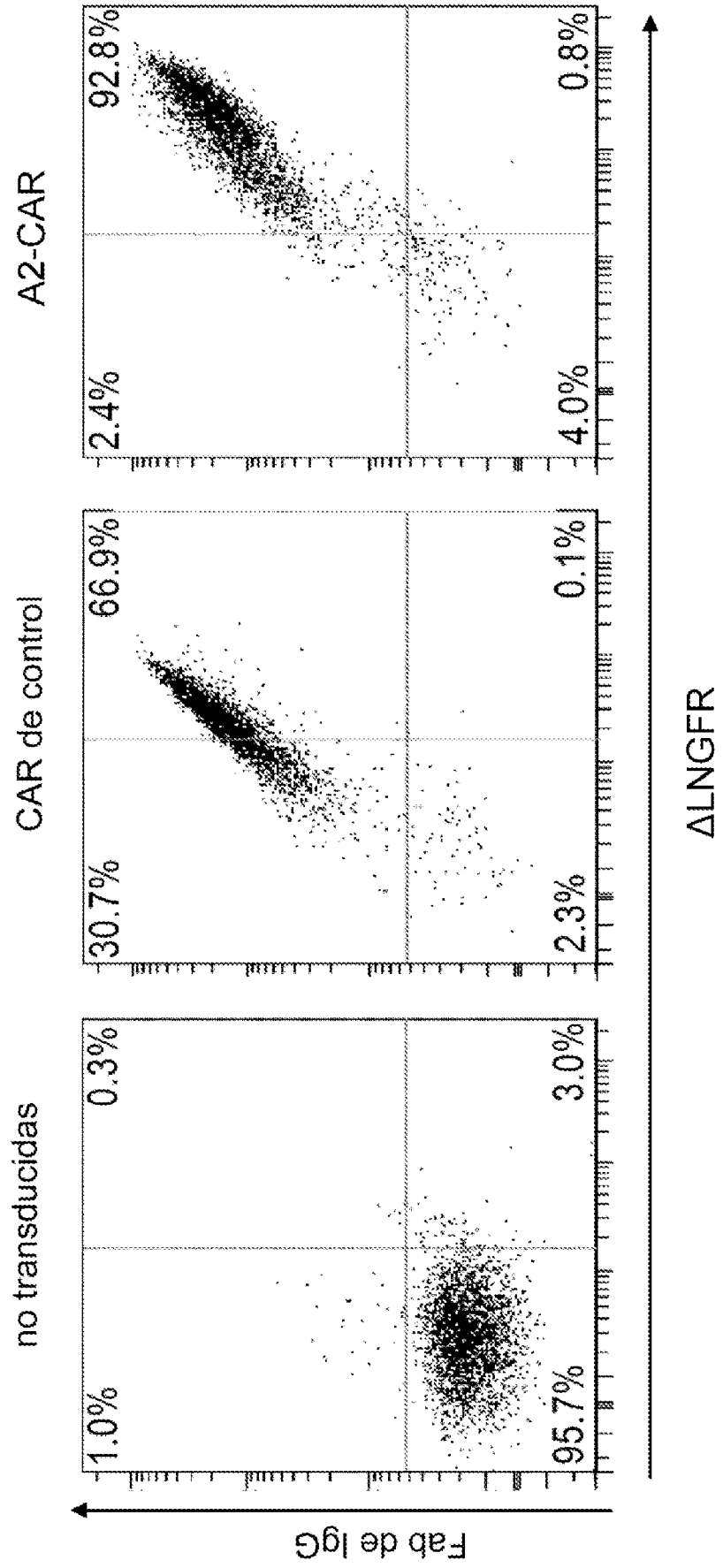


Figura 1D T_{reg} A2-CAR (donante neg. para HLA-A*02)

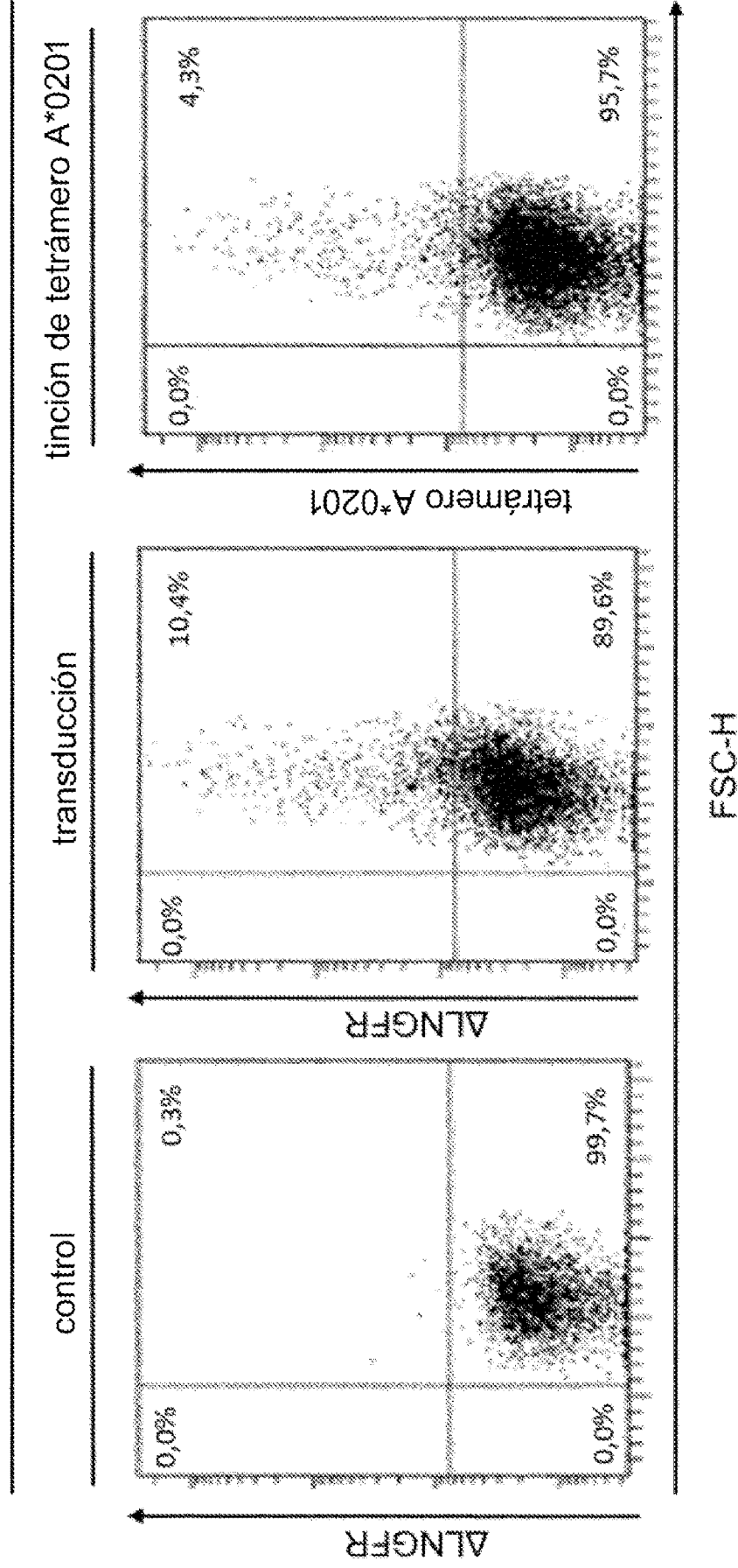


Figura 1E

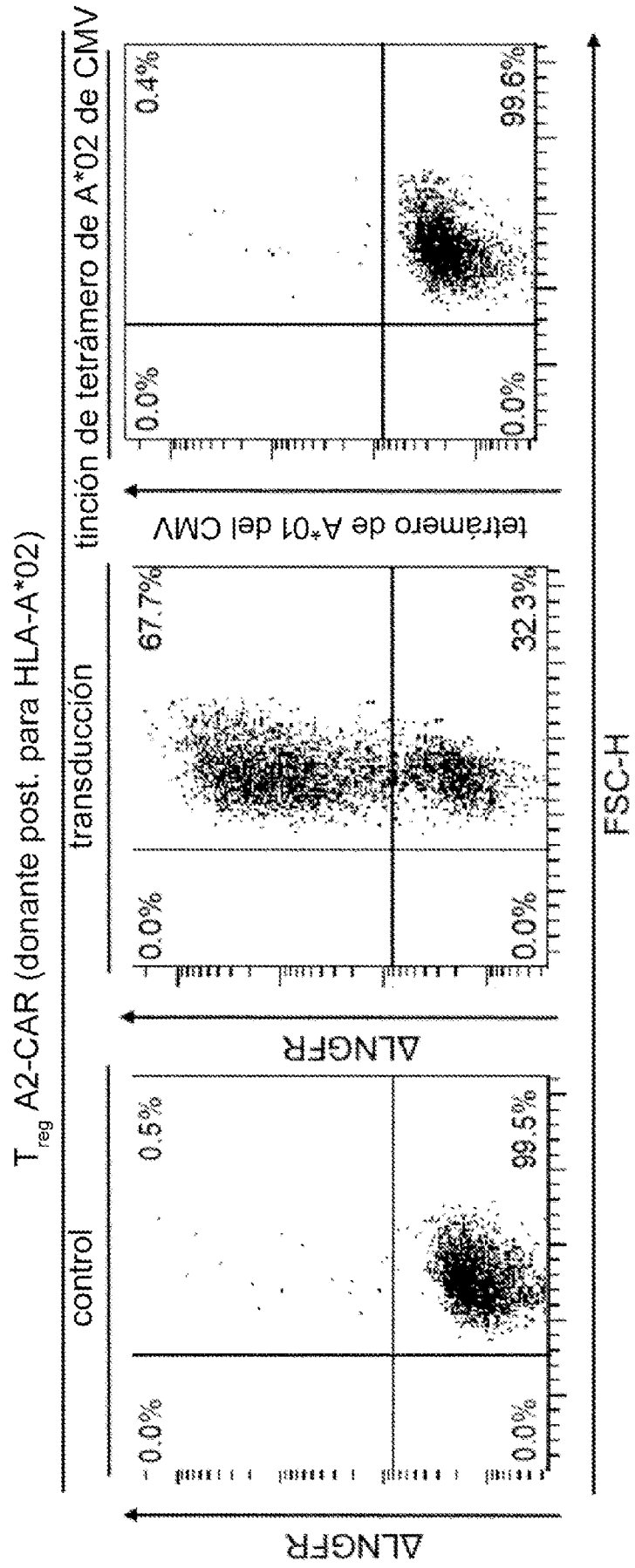


Figura 1F

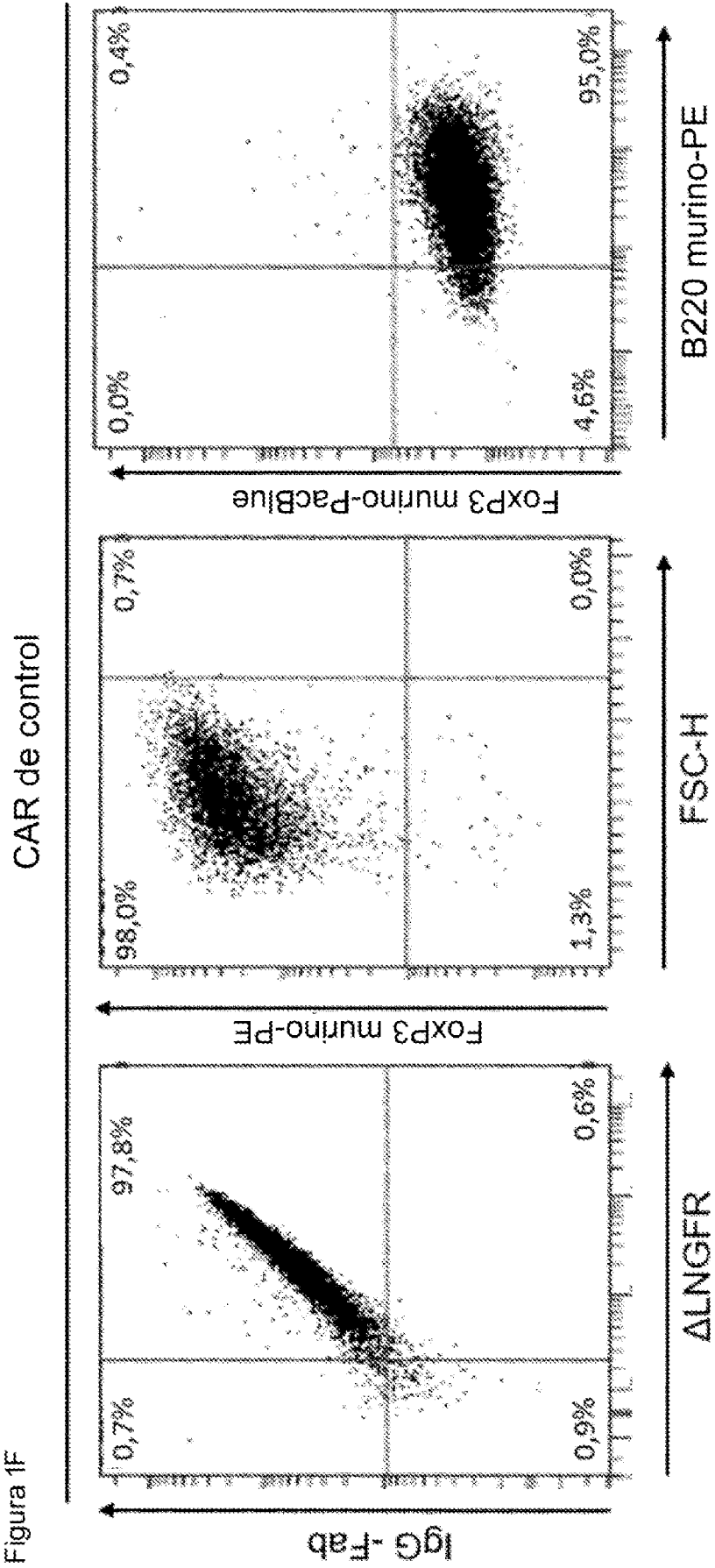


Figura 2A

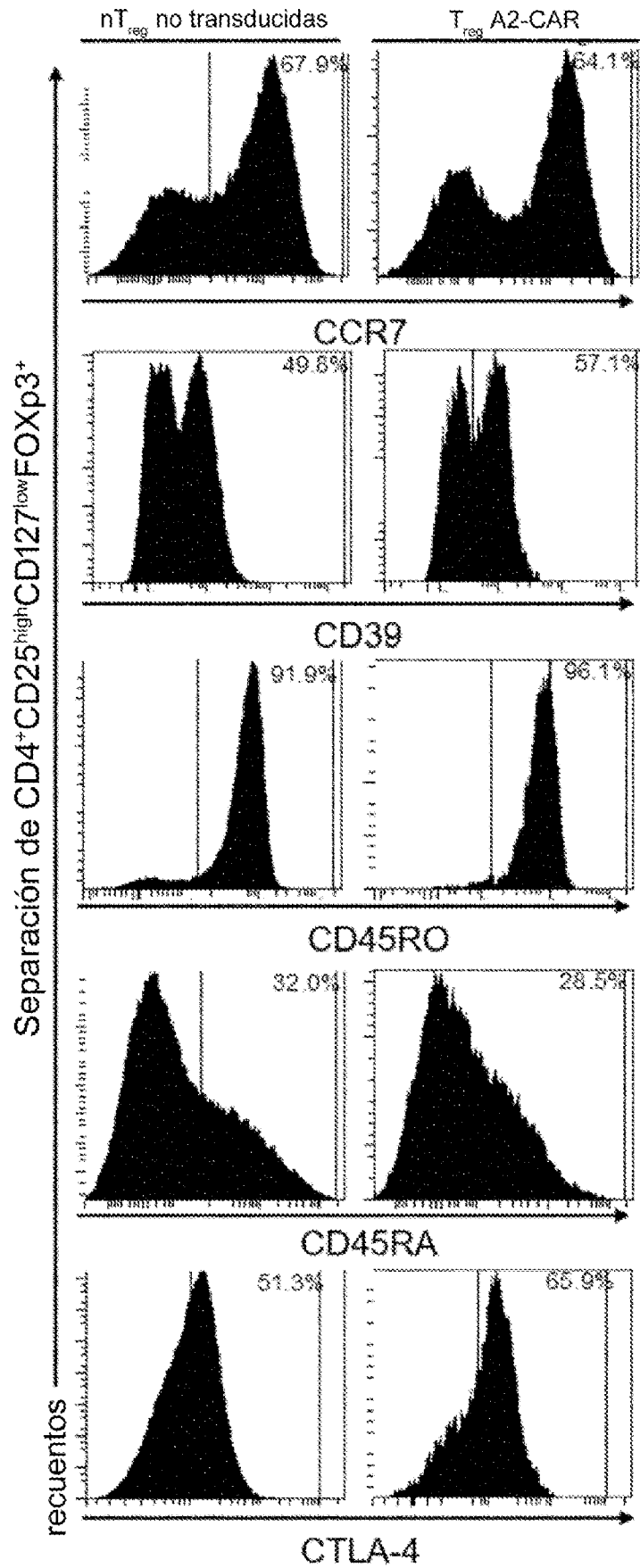


Figura 2B

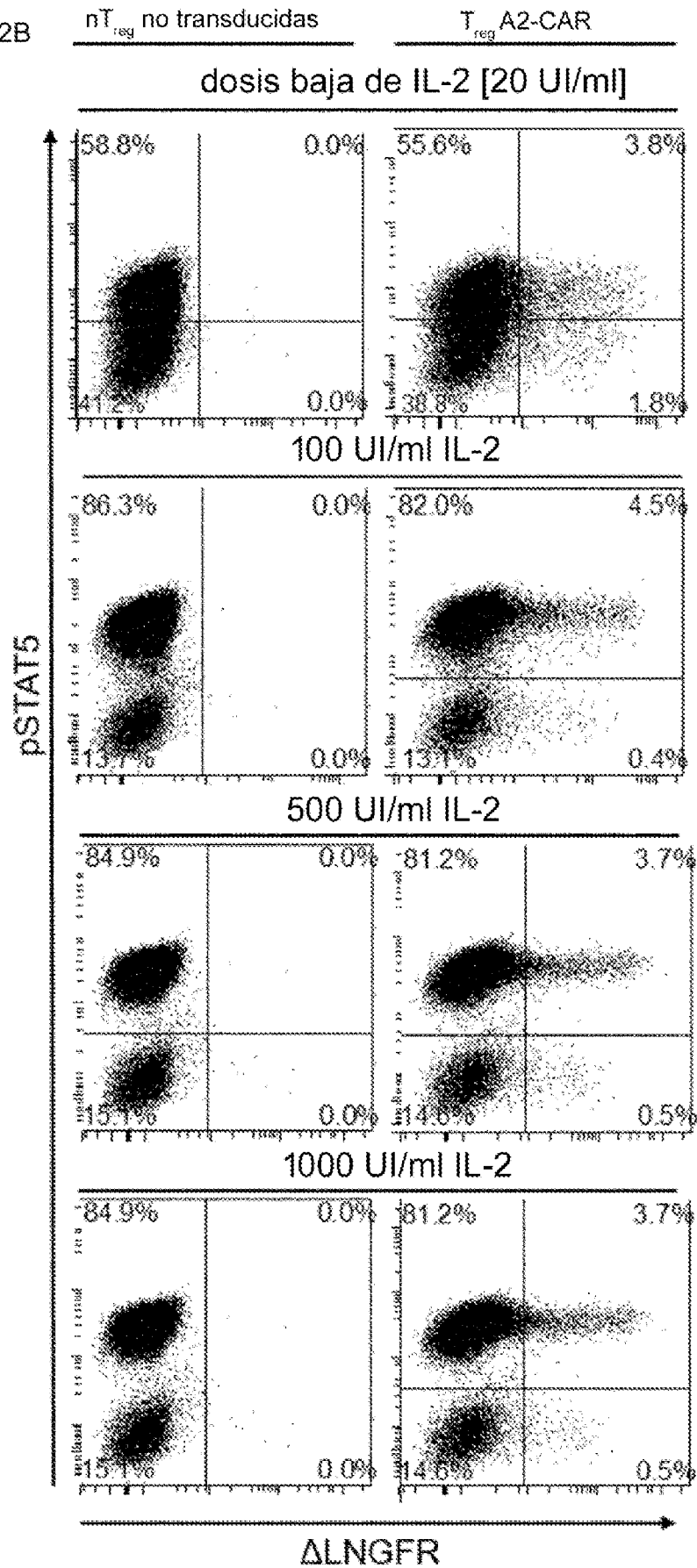


Figura 2C

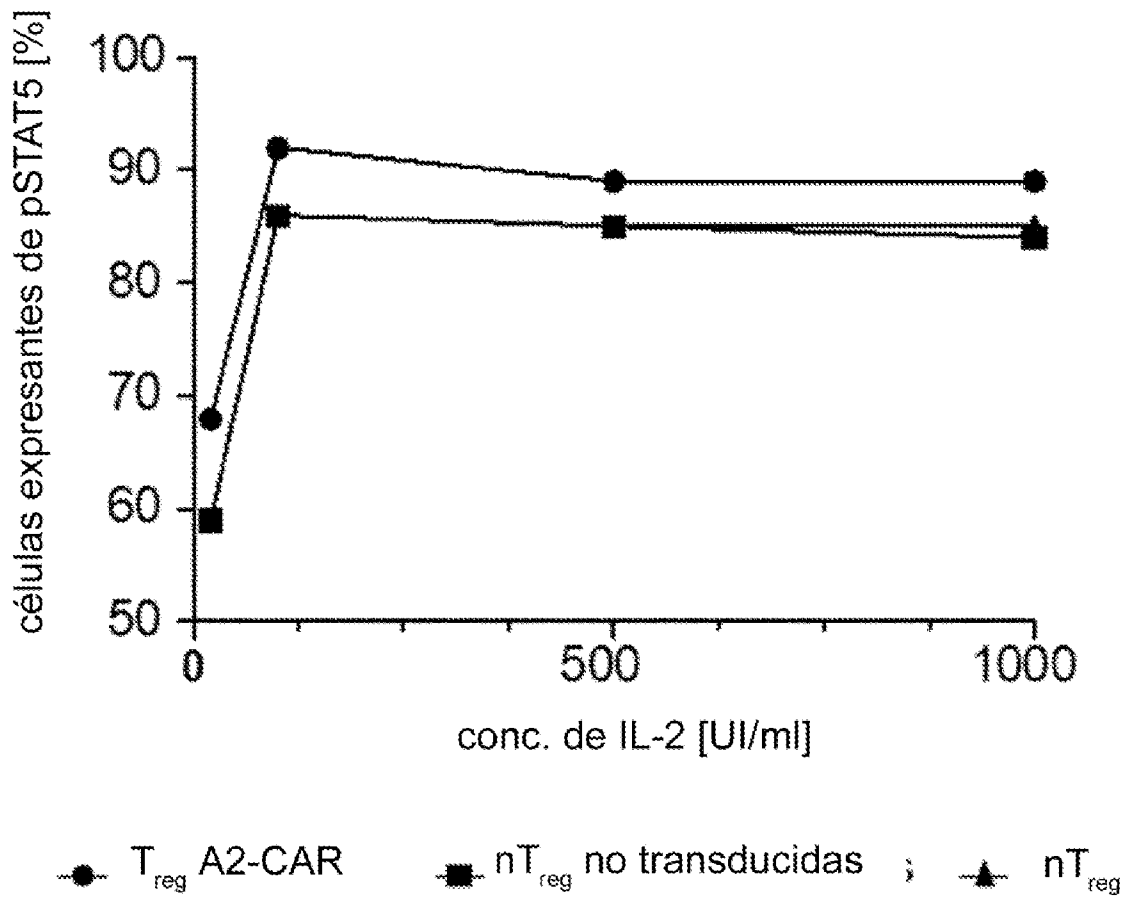


Figura 3A células estimuladoras pos. para HLA-A*02

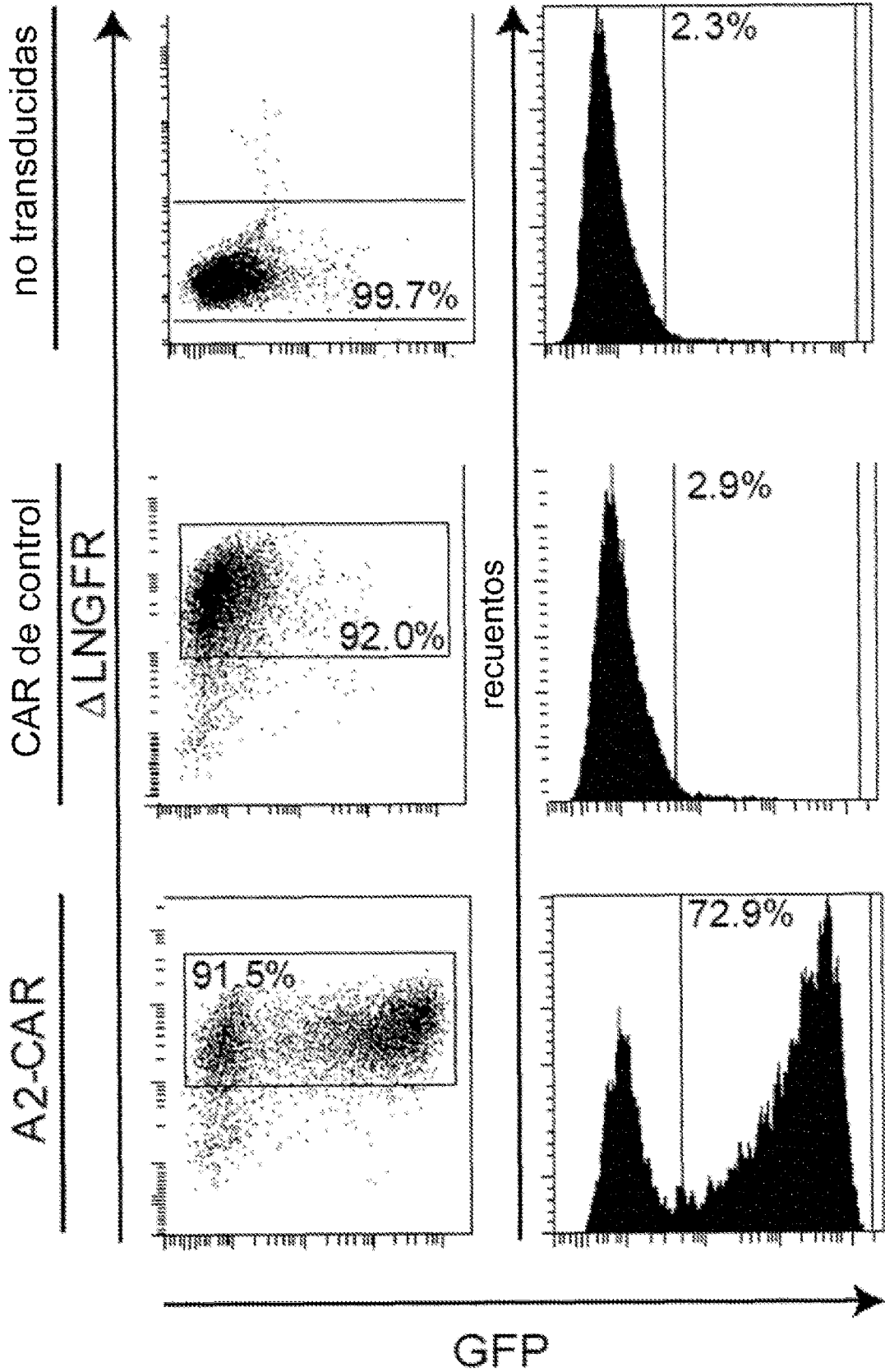


Figura 3B células estimuladoras neg. para HLA-A*02

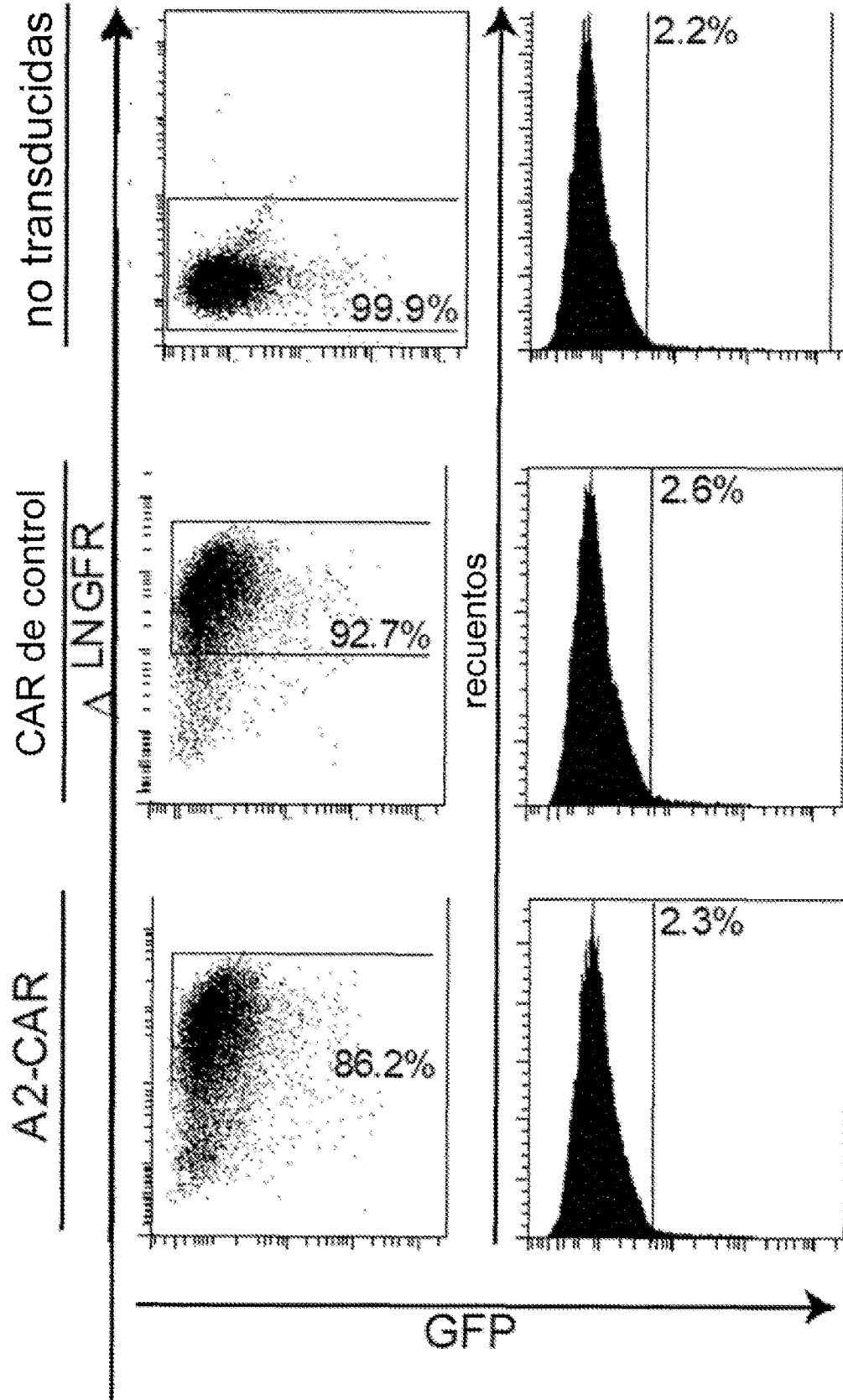


Figura 3C

T_{reg} A2-CAR

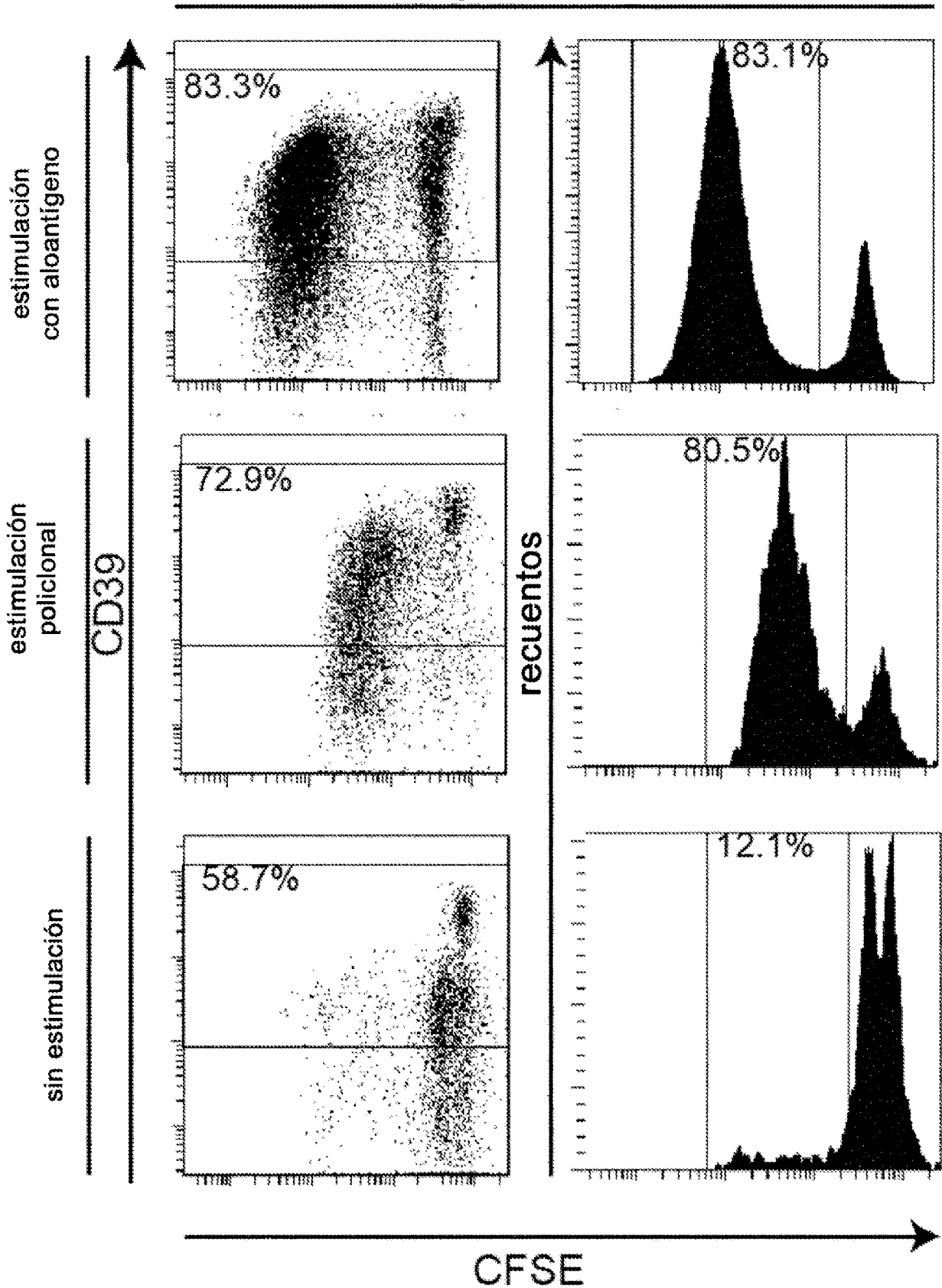


Figura 3D

CAR de control

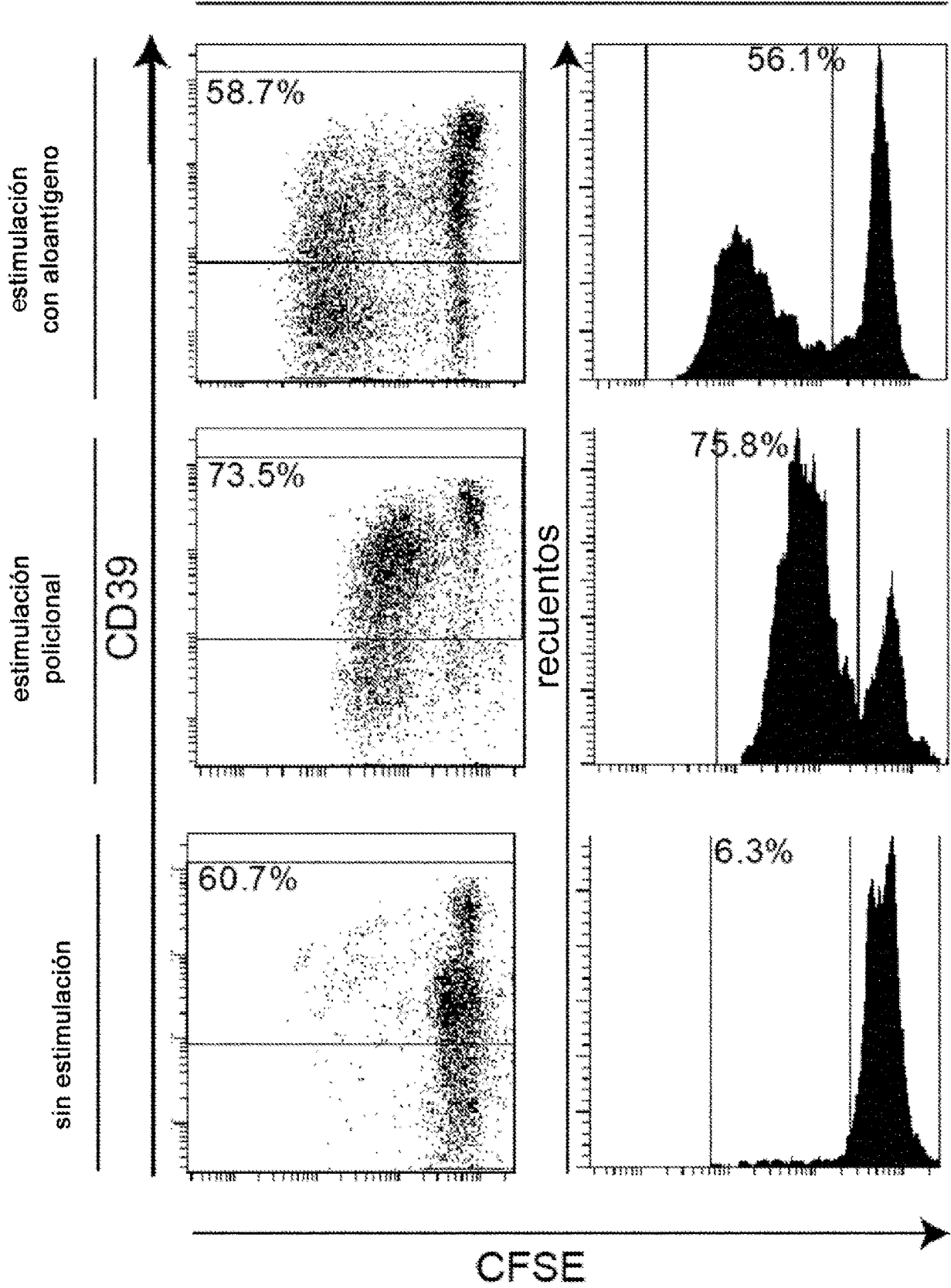


Figura 3E

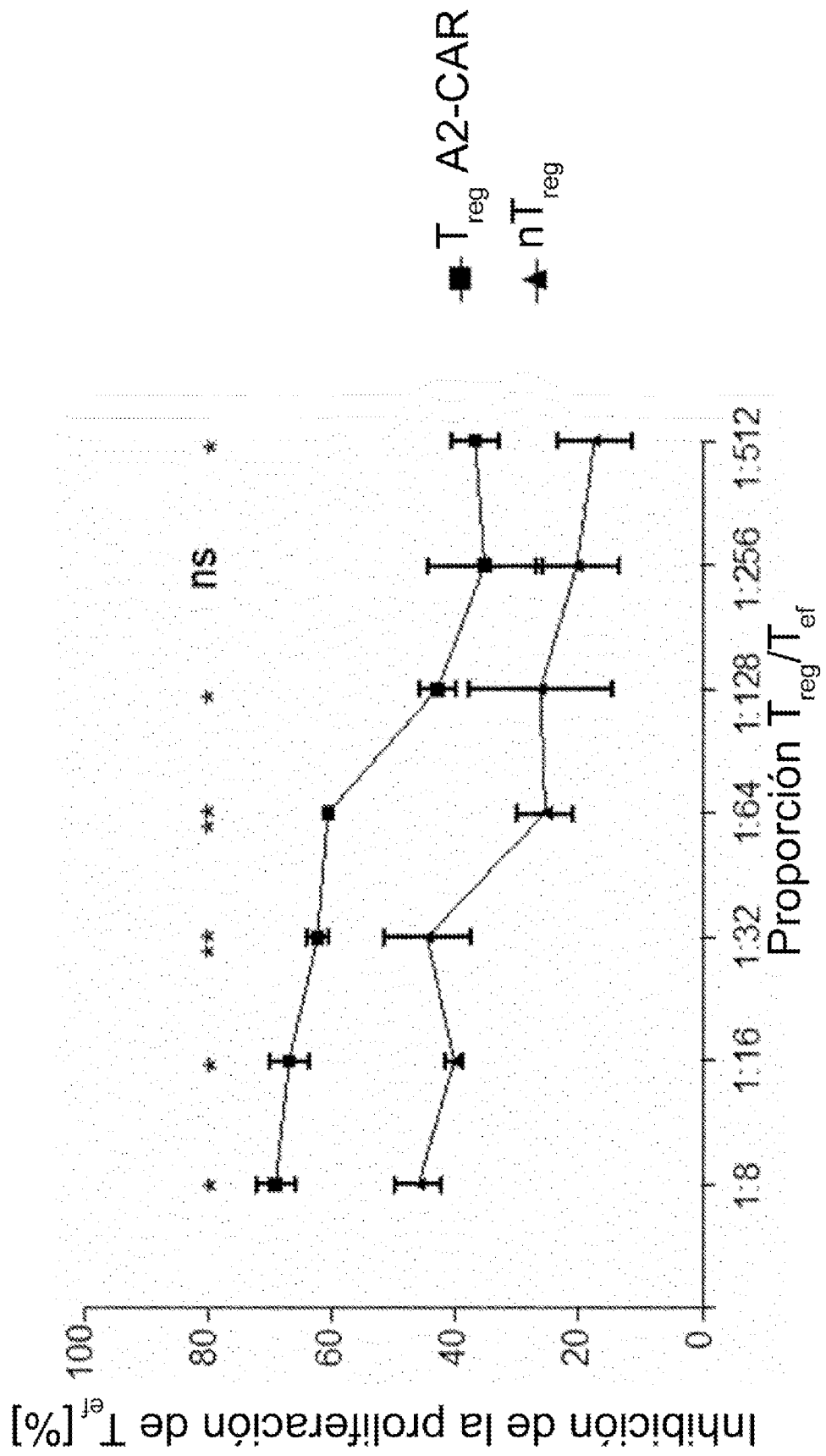


Figura 4B

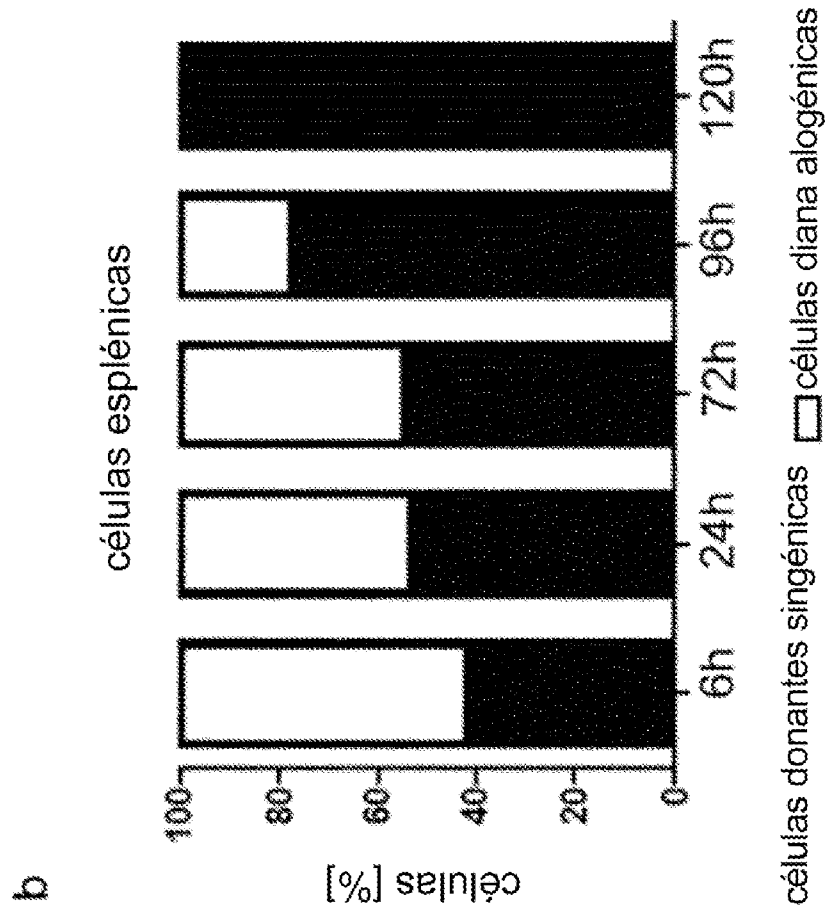


Figura 4A

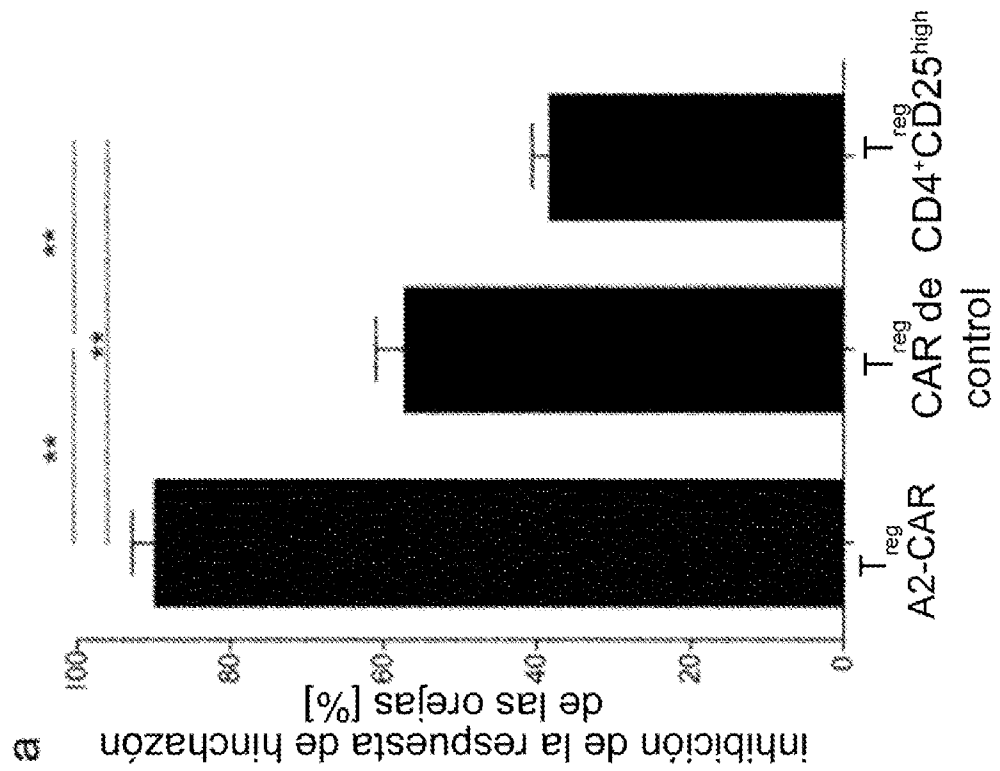


Figura 4C

eliminación *in vivo* de células diana alogénicas

