

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Potencial terapéutico de linfocitos T reguladores de timo  
(thyTreg): vías de generación alternativas y modificación  
genética con un Receptor de Antígeno Quimérico Universal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jorge Gallego Valle**

Directora

**Marjorie Pion**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

Potencial terapéutico de linfocitos T reguladores de timo (thyTreg): Vías de generación alternativas y modificación genética con un Receptor de Antígeno Quimérico Universal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jorge Gallego Valle

DIRECTORA

Dra. Marjorie Pion





UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

Doctorado en Investigación Biomédica

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

**TESIS DOCTORAL**

Potencial terapéutico de linfocitos T reguladores de timo (thyTreg): Vías de  
generación alternativas y modificación genética con un Receptor de  
Antígeno Quimérico Universal

Memoria para optar al grado de Doctor

presentada por:

Jorge Gallego Valle

Directora:

Dra. Marjorie Pion

Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

Madrid, 2022





# Agradecimientos



Nunca pensé que llegaría,  
nunca creí en ese momento,  
te cambia la vida,  
sin que tengas nada para seguirla.

Te cambia y no piensas  
en lo que te olvidas.

(Melocos et al., 2009. Cuando me vaya)

En algún momento u otro, todos pasamos por personas y momentos que nos marcan, que nos enseñan y nos hacen evolucionar mientras, a la vez, procuramos no olvidar de dónde venimos. Habrá alguien que piense que el momento más especial de una tesis, de conseguir ser doctor, es el final, cuando defiendes delante de un tribunal y consigues un título. No dudo que cuando llegue ese día, cada vez más cercano, no lo vaya a disfrutar. Sin embargo, el final, aunque importante, no deja de ser un paso más. Únicamente un necio sería capaz de embarcarse sólo en una aventura de esa magnitud. Y es que no existe un solo momento especial, ni solo una persona a la que dar gracias en estos casi 6 años que ha durado todo este proceso de aprendizaje científico, profesional y personal. Para hacer honor a la justicia en estos agradecimientos, debería nombrar a muchas personas que me han ayudado y apoyado para llegar a este momento, por eso, si eres de esos de los que probablemente me deje sin agradecer, te digo de antemano que lo siento y gracias.

Creo que no existen las palabras adecuadas que reflejen todo lo que siento escribiendo estas líneas, porque al escribir “gracias”, probablemente tu solo estés leyendo un cliché, lo típico que se debe de decir en el apartado de Agradecimientos. La mitad de mis palabras, cambiando los nombres de las personas, imagino que también se podrán encontrar en los apartados de Agradecimientos de otros escritos. Pero me gustaría que los sentimientos que llevo dentro de gratitud infinita, de amistad incondicional y de admiración por todas las personas que me habéis ayudado a llegar hasta aquí, a sacar adelante esta tesis y a enseñarme a disfrutar por el camino, no se tomaran como un cliché.

Empezando por la persona que confió en un niño de 21 años, **Marjorie Pion**, Marjo para los amigos, Jefa para mí. Literalmente no estaría escribiendo estas palabras sin ti, sin tu guía, enseñanza y paciencia. El 1 de febrero de 2017 me abriste las puertas a un mundo que creía que me iba a gustar, pero del que me he acabado enamorando. Desde entonces, esta aventura juntos ha sido todo un reto, un proceso que cada vez nos ha ido exigiendo más, pero del que me siento tremendamente orgulloso de haber pasado juntos. A nivel científico, empezamos induciendo Breg, y hemos acabado en un modelo animal con thyTreg-UniCAR. A nivel laboral, empezamos siendo una IP y un estudiante *naive*, y hemos acabado trabajando espalda con espalda. A nivel personal, empezamos siendo dos desconocidos, y, sin embargo, he acabado considerándote una referente para el resto de mi vida. Espero que este viaje haya sido para ti, al menos, la mitad de la mitad de lo satisfactorio de lo que ha sido para mí. Gracias por todos estos años Marjo, por ser mi guía y por enseñarme a ser el profesional que hoy soy. Let's Groove!

Todo este camino, además, ha ocurrido a medida que el grupo, el LIR, ha ido evolucionando. A su creador, el Dr. Dr. **Rafael Correa-Rocha**, Rafa, darte las gracias por crear y luchar por el LIR, por nosotros. Gracias por tus consejos que me han ayudado a avanzar en esta tesis y gracias por enseñarme a ver todo lo que rodea a la ciencia. Una de las cosas más difíciles de ser científico es trabajar en ciencia sin hacer manos en el laboratorio y nunca pensé que fuese un mundo tan difícil y complejo. Gracias a tu trabajo, a tus jornadas infinitas y a tu dedicación, he podido sacar esta tesis. Me siento muy orgulloso de pertenecer al LIR. **Jacobo, Adri, Elena**, me acogisteis y me hicisteis partícipes de vuestro día a día hasta que la vida, en un momento u otro, nos ha separado, pero es un Hasta Luego, nunca un adiós. Hicisteis que mi inicio fuera de la universidad se hiciera más fácil de lo que nunca pensé. Gracias a los tres, os deseo lo mejor que la vida os pueda deparar. Gracias también a las otras dos personas de aquellos primeros pasos del LIR, pero con las que he compartido mucho más tiempo. **Vero**, no podré nunca agradecerte todo lo que significas para mí, ni lo mucho que esta tesis también te pertenece, que no sea quitando mi nombre de esta tesis y escribiendo el tuyo. Siempre, en todo momento, animándome, ayudándome, apoyándome y

coordinándonos para ser un tándem perfecto, hemos sacado este trabajo juntos. Cualquier elogio, mérito o reconocimiento que se pueda llevar este trabajo, te pertenece. Volviste al LIR en un momento difícil para mí, y juntos hemos desarrollado todo esto. Para siempre quedarán nuestros protocolos infinitos, esas 3 cajas de puntas que gastábamos pipeteando las 90 condiciones y los 500 tipos celulares que hemos aprendido a manejar. Nunca, y digo nunca, podría haber llegado hasta aquí sin tu ayuda. Nunca, y de nuevo digo nunca, podré agradecértelo lo suficiente.

**Esther**, la doctora prometida, gracias por haber sido una red de seguridad para mí durante todos estos años. Hemos compartido magníficos, buenos, normales, malos y pésimos momentos, en los que nos hemos descojonado, sorprendido o, incluso, hemos acabado llorando, pero todos y cada uno de ellos han merecido la pena pasarlos contigo. Recuérdame que vuelva a la cima del Glacier Point y que te pase los cacahuetes, por fa. PD: Gracias madre de Esther, por cocinar esa exquisita comida durante todos estos años. Se veía con mejores ojos coger las pipetas después de esos rabos de toro o carrilleras.

Infinitas gracias también a los “nuevos” miembros del LIR, que han mantenido mi cordura a flote en todo este tiempo: **Sergio**, o Jorge, o Jorgio, que ya no se ni como llamarte. Al principio, compañero de sitio; ahora, compañero de piso, pero siempre, un amigo. La gente nos confunde, pero ya quisiera yo parecerme a la buena persona y al grandísimo profesional que eres. Llegaste en un momento en el que no estaba solo literalmente, pero a nivel laboral sí que me sentía un poco aislado, y tú lo cambiaste todo. Empezamos juntos este proyecto y conseguimos nuestras primeras hazañas juntos. Aunque te mudaras al proyecto del Covid por las circunstancias, este trabajo y estos resultados también son tuyos. A nivel personal, no puedo agradecerte un solo momento de todos estos años, porque han sido todos y cada uno de los días de risas, de ayudas, de miradas y de bromas absurdas los que me han dado fuerzas para continuar y han hecho que te esté dedicando estas palabras. Gracias tío, de todo corazón. Siempre que me necesites, allí estaré. PD: Algún día te ganaré al FIFA.

Gracias a **Roci**, que a pesar de que durante los primeros años en donde nuestros proyectos estaban más separados, tu inocencia y tu emoción cuando te contaba mis primeros

resultados eran como soplos de aire fresco y una fuente de motivación para continuar. Ahora, durante estos últimos meses de agobios, además de toda tu ayuda con los animales, debo darte las gracias por haber sido un bálsamo a nivel personal y un grandísimo apoyo.

Esta tesis no hubiera sido posible tampoco sin la gran Dra. Martínez Bonet, de nombre **Marta**, y de apodo La puta ama. Soy consciente de que empezamos con el pie izquierdo, porque por aquellos meses era un pipiolo perdido que no supo valorar ni tus enseñanzas ni tus consejos. Ante tal lelo, normal que te cansaras. Sin embargo, un día, por fortuna, comencé a escucharte y comencé a aprender de tu sabiduría. A día de hoy, casi 4 años después de esos primeros meses, lo único que puedo decir es gracias. Gracias, porque nunca tiraste la toalla conmigo. Gracias, porque sin tu escucha, sin tu ayuda, sin tus consejos y sin tus geniales ideas y experimentos improvisados, esta tesis no hubiera sido posible. Y gracias, porque si no yo, a nivel personal, seguiría siendo aquel lelo del principio. Me has enseñado mucho mucho más de lo que tú te crees y nunca podré agradecértelo lo suficiente. También dar las gracias al sector de arriba, especialistas en angustias existenciales y quemazones laborales: **Rebe** (lo siento, esta vez no puedo dejar de hablar) gracias por tus videos de cosas chorras que me han dado la vida todas y cada una de las tardes. **Marta** Fernández, gracias por tus idioteces y por tus horas de escucha que me han sacado del pozo más de una vez. Y **Bea**, tengo mucha poca duda de que, sin tu risa contagiosa, todos los días hubiesen sido un poquito más grises.

Finalmente, gracias de todo corazón por todos los momentos juntos al resto de los “nuevos nuevos” integrantes del LIR y a todos aquellos con los que en algún momento he compartido este maravilloso camino: **Diego, Jesús, MA, Juan, Paulina, Sergio Bueno, Rocio, Raquel, Elisa**, etc.

Imposible haber llegado hasta aquí sin **Miguel** o, como a él siempre le gusta siempre recordar, el Dr. Relloso Cereceda. Empezaste siendo para mí el jefe de mi pareja, aquella persona graciosa y exigente con el que pasaba muy buenos ratos cuando estabais con los experimentos (aquellas maravillosas tardes en el citómetro y en el cuarto de cultivos). Lo que no podía imaginar en aquel inicio es que, aunque ella se fuera de tu grupo, tu y yo acabaríamos aún más unidos. Gracias Miguel por todos estos días compartiendo dudas,

experimentos, pensamientos, inquietudes, risas, escaladas y partidos de tenis. Gracias por tu pensamiento crítico, tu maravillosa mente científica y tu absurdo sentido del humor. Como te he dicho, empezaste siendo el jefe de Irene, pero ahora para siempre serás un gran amigo.

Gracias a **Cris** y a la Unidad de Genómica por toda la ayuda que nos prestasteis con las secuenciaciones. No lo sabéis, pero literalmente sin vosotros este proyecto no hubiese sido posible. Gracias a **Sara** y a la Unidad de Farmacogenética, cuantísimas tardes de risas nos dejasteis vuestra cabina para nuestros primeros pinitos trabajando con las bacterias, casi la misma cantidad de tardes en las que vosotros confiabais ciegamente en mí, dejándome las llaves para que cerrara al irme. Gracias también a todos los clínicos y a todo el personal del hospital que han colaborado proporcionándonos los timos, las muestras y todo el material con el que trabajamos.

Gracias a **Maribel**, por todas tus enseñanzas, todos los consejos y por ser nuestra red de seguridad con cualquier imprevisto. Gracias a **Chusa**, a **Nacho**, a **Rafa Ceña** y a **Alba**, por haberme dejado las cabinas de Inmuno 2 y poder crear nuestros primeros lentivirus.

Gracias también al equipo de Miltenyi, en especial a **Alex** (tu primero para que no te pongas celoso), a **Isma** y a **Álvaro**. Me habéis ayudado mucho, a nivel laboral, pero, sobre todo, a nivel personal, y esta tesis no podría haber salido adelante sin vosotros.

Gracias a mi familia elegida, a mis amigos y amigas de toda la vida. A **Amado**, **Miguel**, **Ángela**, **Nico**, **Gonza**, **Carlos**, **Almu**, **Lorena** y **Pati**. En estos años de tesis, habéis sido esa fuente de cordura, de ganas y de risas fuera del laboratorio que despejaban todo el cansancio acumulado después de la semana trabajando. Pero, sobre todo, gracias a todos vosotros por ser las primeras personas fuera de mi familia que confiasteis en mí. Gracias a todos vosotros por todos y cada uno de los momentos juntos. Las tardes de cervezas en los bares, los viajes, las risas y las horas y horas juntos. Gracias por esta

infinidad de años juntos que han hecho que lleve dentro de mí un poquito de cada uno de vosotros. No os vayáis nunca de mi vida.

Gracias también a los amantes de las Tinieblas: **Fran, Myri, Ángela y Javi**. Nunca imaginé que os conocería, pero las vueltas de la vida han hecho que aquí estemos, agradeciéndoos a todos vosotros el apoyo que habéis sido para mí en esta segunda tesis del grupo. Gracias por haber sido un remanso de paz para mí a nivel científico, ayudándome en la distancia con mis experimentos. Sin embargo, sobre todo gracias por haberme hecho reír hasta llorar tras el cansancio de la semana y unos cuantos viajes en coche cuando subo a Pamplona o bajáis vosotros. Celebraremos juntos la siguiente tesis del grupo y sea donde sea que acabemos cada uno, seguiremos más unidos que nunca.

Gracias a mi familia, la no elegida, pero la más cercana. **Papá, Mamá, Bichi**, siempre siempre siempre habéis creído en mí, incluso cuando las fuerzas más me flaqueaban. Siempre habéis celebrado mis éxitos más que si fuesen vuestros y siempre habéis sido un hombro sobre el que apoyarme. Me habéis querido incondicionalmente a pesar de mis muchos defectos y de mis malos momentos. Me habéis animado incansablemente tras todos y cada uno de mis muchos errores. Me habéis aupado inquebrantablemente tras todas mis caídas. Me habéis enseñado a querer, a valorar, a pensar y a divertirme a pesar de las dificultades. Me habéis enseñado todos mis valores y me habéis guiado, de esa forma en la sombra que solo vosotros sabéis, en todos los momentos de mi vida. Aún no se ha inventado el idioma ni las palabras para agradeceros todo lo que significáis para mí y poder deciros lo mucho que os quiero. Os debo mucho más que toda mi vida. **Maite, Sergio, Cristi, Cris, Katy**

y **Ángela**, gracias por haberme apoyado y escuchado en todos estos años, a pesar de que vuestras miradas de estupor me indicaban que os estaba contando un mamotreto muy poco interesante. Sois uno de los pilares más importantes de mi vida y, por supuesto, también de esta tesis. **Yayo**

**Félix, Yaya Tere, Yayo Aurelio y Yaya Angelita**, siento no haber podido acabar antes esta tesis y poder haberla celebrado juntos. Pero sé que, estéis donde estéis, me estáis cuidando y guiando todos los días, porque siento todo vuestro apoyo. Gracias por enseñarme la virtud de saber sonreír incluso en los peores momentos. Gracias por haber sido mis más fieles admiradores

desde que nació. Ojalá pueda llegar a ser la mitad de buena persona que erais cada uno de vosotros. Os echo mucho de menos. Gracias por todos los momentos juntos.

Al resto de mi familia, gracias gracias a todos y cada uno de vosotros (somos muchos) por los momentos compartidos.

Finalmente, gracias **Irene**. Empezamos nuestra vida juntos mucho antes de la maravillosa experiencia de compartir laboratorio, en donde trabajamos literalmente codo con codo durante unos cuantos maravillosos meses. Juntos desde el inicio de la carrera, aún sin saber que te acabarías conquistando (porque seamos sinceros, tú ya me habías conquistado); juntos en el máster y en el inicio del doctorado. Después, todo cambió. Pamplona nos modificó todos nuestros planes, pero ante esas circunstancias, en lugar de rendirnos y separarnos, decidimos luchar a la vez por nosotros y por nuestro futuro y, sobre todo, más unidos que nunca. Al igual que decía con mi familia, no puedo y no existen las palabras para agradecerte todo por lo que has hecho por mí. En la universidad, en el laboratorio, en la cercanía, en la distancia, en nuestra maravillosa vida más personal, en los ratos disfrutando con amigos, en nuestros momentos más increíbles y en nuestros momentos más ocultos, gracias. Gracias por haber sido mi bálsamo, mi brújula, mi guía y mi consuelo. Gracias por ayudarme a salir de mis hoyos más profundos, por enseñarme qué es la confianza más incondicional y cómo es amor más puro. Gracias porque siempre consigues sacarme una sonrisa. Gracias, porque los momentos juntos, incluso las videollamadas, siempre sean increíbles, maravillosos y me llenan de fuerzas. Gracias por quererme y valorarme como solo tú sabes. Gracias por confiar en mí y aguantarme. Gracias, por estos siete años y pico juntos, porque sin ti, no solo esta tesis no hubiese sido posible, sino que tampoco sería el monguer que soy hoy. En definitiva, gracias por todos y cada uno de los detalles, momentos y experiencias de todos estos años. Estoy deseando disfrutar de nuestros próximos pasos juntos. Te quiero Irene, con toda mi alma.

Soy quien soy, y estoy donde estoy gracias, de alguna forma, a todos y a cada uno de vosotros. Gracias eternas e infinitas, de todo corazón. Os deseo lo mejor.

Jorge



# Índice



<b>I.</b>	<b>RESUMEN/ ABSTRACT .....</b>	<b>23</b>
I.1	RESUMEN .....	25
I.2	ABSTRACT .....	26
<b>II.</b>	<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>27</b>
	Abreviaturas.....	29
<b>III.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>33</b>
III.1	EL SISTEMA INMUNE .....	35
III.1.1	Linfocitos T.....	36
III.1.2	Maduración de las células T en el timo .....	38
III.2	DESEQUILIBRIO DE LA HOMEOSTASIS INMUNOLÓGICA Y TRATAMIENTOS CLÁSICOS ASOCIADOS.....	40
III.2.1	Pérdida de tolerancia a antígenos propios .....	41
III.2.2	Reacción inmunológica no deseada tras un trasplante.....	42
III.2.3	Tratamientos convencionales y sus limitaciones.....	43
III.3	PAPEL DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES EN LA HOMEOSTASIS .....	45
III.3.1	Fenotipo y Funcionalidad de las Treg .....	45
III.3.2	Tipos de Treg y su plasticidad .....	48
III.3.3	Terapia celular con Treg obtenidas de diferentes fuentes y sus limitaciones .....	51
III.3.4	Nueva estrategia para la obtención y expansión de Treg proveniente de timo: las thyTreg.....	54
III.4	TREG ANTÍGENO-ESPECÍFICAS .....	55
III.5	RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS.....	57
III.5.1	Origen del CAR: necesidad de nuevos tratamientos frente al cáncer .....	57
III.5.2	Diseño y Estructura del CAR .....	58
III.5.3	Limitaciones de los CAR convencionales .....	62
III.5.4	Nuevos tipos de CAR.....	63
III.5.5	mSA2-Universal CAR.....	65
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>69</b>
IV.1	HIPÓTESIS.....	71
IV.2	OBJETIVOS .....	72
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
V.1	PLÁSMIDOS Y VECTORES LENTIVIRALES .....	75
V.1.1	Plásmido pMSCV-FOXP3 y creación del pMSCV-ΔFOXP3 .....	75
V.1.2	Constructo UniCAR de 3ª generación .....	77
V.1.3	Mutagénesis del UniCAR .....	78
V.1.4	Otros plásmidos y constructos utilizados .....	81
V.1.5	Transformación de bacterias con los plásmidos.....	82
V.1.6	Transfección de células de línea para la producción de vectores lentivirales .....	82
V.2	CULTIVO Y TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS DE LÍNEA.....	83
V.2.1	Cultivos de células de línea.....	83

V.2.2	Protocolo de transducción de células de línea .....	84
V.3	ASLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS PRIMARIAS .....	84
V.3.1	Aislamiento y obtención de células a partir de tejido tímico. ....	84
V.3.2	Aislamiento y obtención de células a partir de sangre periférica. ....	86
V.4	PROTOCOLOS DE CULTIVO, TRANSDUCCIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS DE TIMO Y DE SANGRE PERIFÉRICA.....	87
V.4.1	Cultivo de células CD25 <sup>+</sup> , CD25 <sup>neg</sup> y CD25 <sup>neg</sup> TGF-β procedentes de timo y de periferia.....	87
V.4.2	Cultivo de las células tímicas CD25 <sup>+</sup> , CD25 <sup>neg</sup> CD8 <sup>neg</sup> + TGF-β y transducción con los vectores MSCV-FOXP3 y MSCV-ΔFOXP3.....	88
V.4.3	Activación, transducción y selección de las Tconv con los diferentes UniCAR y CAR19 .....	89
V.4.4	Activación, transducción y selección de las thyTreg con los diferentes UniCAR y CAR19 .....	91
V.5	ANÁLISIS DEL FENOTIPO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....	93
V.5.1	Marcaje de proteínas superficiales.....	93
V.5.2	Marcaje viabilidad .....	94
V.5.3	Marcajes de proteínas intracelulares .....	94
V.6	ACTIVACIÓN MEDIADA POR LOS UNICAR .....	96
V.6.1	Activación de Jurkat mediada por UniCAR .....	96
V.6.2	Activación de células primarias Tconv-UniCAR y Tconv-CAR19.....	96
V.6.3	Activación de thyTreg mediada por los UniCAR y CAR19 .....	98
V.7	ANÁLISIS DE FUNCIÓN SUPRESORA .....	99
V.7.1	Inhibición de la proliferación: Co-cultivo de CMSP con las diferentes fracciones celulares procedentes del timo o de periferia. ....	99
V.7.2	Co-cultivo entre thyTreg-NT o los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR con CMSP totales.....	101
V.7.3	Co-cultivo thyTreg-NT y los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR con las fracciones celulares procedentes de CMSP .....	103
V.8	ESTABILIDAD FENOTÍPICA .....	105
V.8.1	Estabilidad fenotípica bajo ambientes pro-inflamatorios de tipo Th1 o Th17 .....	105
V.8.2	Perfil de producción de citoquinas de los timocitos CD25 <sup>neg</sup> transducidas con MSCV-FOXP3 .....	107
V.9	ANÁLISIS DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVO. ....	107
V.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	108
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
VI.1	LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE FOXP3, EN COMBINACIÓN CON LA ESTIMULACIÓN DE TGF-β1 E IL-2, GENERA UNA LIMITADA CAPACIDAD SUPRESORA EN TIMOCITOS PRIMARIOS HUMANOS ESTIMULADOS <i>EX VIVO</i> . ....	111
VI.1.1	TGF-β1 induce una expresión estable del CD25 y del FOXP3 en las células T procedentes de la sangre periférica.....	112
VI.1.2	TGF-β1 mantiene una alta expresión del CD25 y del FOXP3 en las CD25 <sup>neg</sup> derivadas de timocitos.....	114

VI.1.3	El tratamiento con TGF-β1 no induce una capacidad supresora robusta en las células CD25 <sup>neg</sup> derivadas de timocitos .....	117
VI.1.4	Las CD25 <sup>neg</sup> +TGF-β1 mantienen el fenotipo tras el ensayo de supresión .....	120
VI.1.5	La depleción de las células CD8 <sup>+</sup> y la expresión ectópica del FOXP3 en las células CD25 <sup>neg</sup> +TGF-β1 derivadas del timo no incrementa su capacidad supresora.....	122
VI.1.6	Las CD25 <sup>neg</sup> +TGF-β1 son menos estables en ambientes pro-inflamatorios que la población thyTreg CD25 <sup>+</sup> .....	128
VI.2	<b>GENERACIÓN DE CÉLULAS DE LÍNEA ANTÍGENO-ESPECÍFICAS: DETECCIÓN DEL UNICAR Y SU CAPACIDAD DE ACTIVACIÓN CELULAR .....</b>	<b>133</b>
VI.2.1	El constructo UniCAR de 3 <sup>a</sup> generación se expresa en la superficie de células de línea y activa las células que lo expresan.....	133
VI.2.2	Los medios de cultivo y su suplementación afectan al UniCAR.....	134
VI.2.3	El constructo UniCAR de 3 <sup>a</sup> generación activa a las células de línea que lo expresan.....	137
VI.3	<b>GENERACIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS HUMANAS ESPECÍFICAS DE ANTÍGENO: EXPRESIÓN DEL UNICAR .....</b>	<b>138</b>
VI.3.1	Transducción de células primarias con los UniCAR y selección de las correctamente modificadas .....	139
VI.3.2	Viabilidad y porcentaje de transducción a día 7 de las células primarias .....	141
VI.4	<b>FENOTIPO Y FUNCIONALIDAD DE LAS TCONV-UNICAR .....</b>	<b>143</b>
VI.4.1	Fenotipo a día 7 de las Tconv transducidas .....	143
VI.4.2	Activación de células Tconv mediada por el UniCAR de tercera generación. ....	145
VI.4.3	Activación de las células Tconv mediada por los UniCAR de segunda generación.....	147
VI.4.4	Diferencias en la lisis celular inducida según los UniCAR que porten las Tconv.....	151
VI.5	<b>THYTREG-UNICAR .....</b>	<b>153</b>
VI.5.1	Fenotipo de las células thyTreg modificadas genéticamente.....	153
VI.5.2	Estimulación de las thyTreg mediada por los UniCAR. ....	160
VI.5.3	Viabilidad de las K562-CD19 en los co-cultivos con thyTreg-UniCAR. ....	166
VI.5.4	Las thyTreg modificadas genéticamente reducen la frecuencia y la concentración de las células diana en los co-cultivos con CMSP.....	168
VI.5.5	Las thyTreg-UniCAR reducen específicamente la viabilidad de las células diana CD8 dentro de las CMSP, mientras que las CD4 no se ven afectadas.....	173
VI.5.6	Los dominios de co-estimulación influyen en la capacidad supresora de las thyTreg-UniCAR sobre las células diana.....	177
VI.5.7	Co-cultivos de las thyTreg-UniCAR con las subpoblaciones de las CMSP por separado: Estudio del efecto directo e indirecto .....	185
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>193</b>
VII.1	<b>EXPLORACIÓN DEL USO DE TIMOCITOS COMO FUENTE ALTERNATIVA DE OBTENCIÓN DE THYTREG .....</b>	<b>195</b>
	Papel del microambiente, de la regulación genética y epigenética en la generación de Treg funcionales.....	195
	Regulación postranscripcional de los marcadores clásicos de las Treg .....	197
VII.2	<b>UNICAR EN LAS TCONV .....</b>	<b>198</b>
	Diferencias entre los dominios de co-estimulación en la activación y funcionalidad	

de las Tconv con UniCAR de segunda generación .....	199
UniCAR de tercera generación en las Tconv .....	201
<b>VII.3 DIFERENTE PATRÓN DE ESTIMULACIÓN DE LAS THYTREG MEDIADO POR LOS UNICAR ...</b>	<b>202</b>
Los UniCAR no alteran el fenotipo de las thyTreg.....	202
Diferencias en la activación celular de las thyTreg según los dominios de co-estimulación .....	204
<b>VII.4 POTENCIALES MECANISMOS DE LA ELEVADA CAPACIDAD SUPRESORA DE LAS THYTREG-UNICAR.....</b>	<b>205</b>
Degradación del ATP .....	205
Consumo de la IL-2.....	206
Supresión por contacto célula-célula .....	207
Expresión y liberación de citoquinas anti- y pro-inflamatorias.....	207
Capacidad citolítica de las thyTreg-UniCAR sobre las células diana.....	209
UniCAR41BB no solo no desestabiliza la capacidad supresora de las thyTreg, sino que la potencia.....	212
Relevancia de los dominios <i>Hinge</i> y Transmembrana mediando la activación y funcionalidad de celular .....	213
<b>VII.5 PERSPECTIVAS A FUTURO.....</b>	<b>216</b>
Limitaciones y posibles soluciones de los UniCAR-mSA2.....	216
Estrategias terapéuticas alternativas de las thyTreg-UniCAR .....	218
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>219</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>223</b>
<b>X. ANEXOS .....</b>	<b>249</b>
X.1 ANEXO 1.....	251
X.2 ANEXO 2.....	253

# I. Resumen/ Abstract



## I.1 Resumen

Las células T reguladoras (Treg) son una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> con la capacidad de inhibir la respuesta inmunitaria y de regular la homeostasis. Gracias a estas propiedades, las Treg han cobrado una gran relevancia como posible tratamiento de enfermedades autoinmunes o frente al rechazo de trasplantes. Las estrategias empleadas hasta ahora han utilizado la sangre periférica como fuente de estas células, pero, debido a la escasa cantidad y/o a su fenotipo diferenciado, han demostrado una limitada eficacia. Gracias a un novedoso protocolo de obtención y expansión desarrollado por nuestro grupo, a partir del timo se consigue un producto celular indiferenciado y con una gran capacidad inmunosupresora: las thyTreg. Los objetivos de este estudio han sido: (I) Inducir células con idénticas propiedades a las thyTreg a partir de sus precursores, los timocitos. (II) Incrementar el potencial terapéutico de las thyTreg dotándolas de especificidad antigénica mediante receptores de antígeno quimérico (CAR).

Para el primer objetivo, a los timocitos humanos CD25 negativos (CD25<sup>neg</sup>) se les indujo la expresión de un FOXP3 ectópico y/o fueron tratados con TGF-β1 e IL-2, estrategias que previamente demostraron una alta eficacia induciendo Treg desde células otras T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica. A pesar de que estos elementos consiguieron inducir una alta expresión de los marcadores asociados con las thyTreg, el fenotipo transitorio, la heterogénea funcionalidad y la inestabilidad celular resultantes hacen en que, hasta ahora, no se puedan considerar a los timocitos CD25<sup>neg</sup> como una fuente alternativa de thyTreg. Por otro lado, para lograr el segundo objetivo, se modificaron genéticamente las thyTreg con tres CAR universales basados en una estreptavidina monomérica (UniCAR-mSA2). Los resultados mostraron que la diferente combinación de los dominios de co-estimulación de cada UniCAR modulaban diferentes perfiles de activación y funcionalidad en las thyTreg. Así, las thyTreg-UniCAR41BB redujeron específica y eficazmente la viabilidad, proliferación y estado de activación de las células diana. Además, también mostraron un efecto indirecto inhibiendo la proliferación y el estado de activación de las células no diana, pero sin afectar a su viabilidad. Por lo tanto, hemos generado células con una gran especificidad de antígeno y con un elevado potencial inmunosupresor. De confirmarse su eficacia en modelos *in vivo*, las thyTreg-UniCAR41BB podrían suponer un versátil abordaje terapéutico frente a las enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y para evitar el rechazo de órganos trasplantados.

## I.2 Abstract

Regulatory T cells (Treg) are a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells whose ability is to inhibit the immune response and regulate the homeostasis. Due to these properties, their relevance as a possible treatment against autoimmune diseases or transplant rejection has been raised. Currently, the strategies have used peripheral blood as a source of Treg. Nevertheless, those Treg have shown a limited efficacy because of its low quantity and/or its differentiated phenotype. Using a novel obtaining and expansion protocol developed by our group, a more undifferentiated cell product with a great immunosuppressive capacity is achieved from the thymus: the thyTreg. Based on these extraordinary thyTreg, the aims of this study were: (I) Induce cells with identical properties of thyTreg from their precursors: the thymocytes. (II) Increase their therapeutic potential by providing them with antigenic specificity through chimeric antigen receptors (CAR).

To reach the first objective, CD25 negative (CD25<sup>neg</sup>) human thymocytes were induced to express an ectopic FOXP3 and /or were treated with TGF- $\beta$ 1 and IL-2. Those strategies have previously shown high efficiency inducing Treg from peripheral conventional T cells. These elements managed to induce a high expression of thyTreg-associated markers in CD25<sup>neg</sup> thymocytes. However, the transient phenotype, the heterogeneous functionality and the cellular instability conclude that CD25<sup>neg</sup> thymocytes are not considered as an alternative source of thyTreg. On the other hand, to achieve the second aim, thyTreg were genetically modified with three universal CARs based on a monomeric streptavidin (UniCAR-mSA2). The results showed that the different combination of co-stimulation domains of each UniCAR modulates different activation and functionality profiles in thyTreg. Thus, thyTreg-UniCAR41BB specifically and efficiently reduced the viability, proliferation and cellular activation of the target cells. Furthermore, they also showed an indirect effect by inhibiting the proliferation and activation of non-target cells, without affecting to their viability. Therefore, we have generated cells with great immunosuppressive potential and with an extraordinary antigen specificity. If their efficacy was confirmed, the thyTreg-UniCAR41BB could represent a versatile therapeutic approach in inflammatory or autoimmune diseases, and prevent the rejection of transplanted organs.

## II. Abreviaturas



## Abreviaturas

En la presente tesis, se ha utilizado la nomenclatura castellana para aquellos casos en los que existen las correspondientes abreviaturas. Para el resto de los casos, se ha utilizado la inglesa y se ha indicado el formato de la fuente en *cursiva*. En el caso de los acrónimos, muchos corresponden a términos en inglés.

<b>7-AAD</b>	del inglés <i>7-aminoactinomycin D</i> (Aminoactinomicina D)
<b>AAAAI</b>	Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología
<b>Ac</b>	Anticuerpos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AIH</b>	del inglés <i>Autoimmune Hepatitis</i> (Hepatitis Autoinmune)
<b>ALL</b>	del inglés <i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i> (Leucemia Linfoblástica Aguda)
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>APC</b>	del inglés <i>antigen-presenting cell</i> (Célula presentadora de antígenos)
<b>ATB</b>	Mezcla de antibióticos
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATD</b>	del inglés <i>Autoimmune Thyroid Disease</i> (Enfermedad Tiroidea Autoinmune)
<b>CAR</b>	del inglés <i>Chimeric antigen receptor</i> (Receptor de antígeno quimérico)
<b>CAR19</b>	CAR-T ARI-0001
<b>Casp9</b>	Caspasa 9
<b>CCR</b>	del inglés <i>CC chemokine receptor</i> (Receptor de quimioquinas CC)
<b>CD</b>	Clúster de diferenciación
<b>CeD</b>	del inglés <i>Celiac Disease</i> (Enfermedad Celiaca)
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>cTEC</b>	del inglés <i>cortical thymic epithelial cells</i> (Células epiteliales tímicas de la corteza)
<b>CTVio</b>	del inglés <i>CellTrace Violet</i> (Marcador celular violeta)
<b>CTLA-4</b>	del inglés <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> (Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos)
<b>CXCR</b>	del inglés <i>CXC chemokine receptor</i> (Receptor de quimioquinas CXC)
<b>DC</b>	del inglés, <i>dendritic cell</i> (Células dendríticas)
<b>DMEM</b>	del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DN</b>	Timocitos Dobles Negativos

<b>DP</b>	Timocitos Dobles Positivos
<b>EF1<math>\alpha</math></b>	del inglés <i>archaeal Elongation Factor 1 alpha</i> (Factor 1 de elongación alfa de arqueas)
<b>EGFP</b>	del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Verde Fluorescente mejorada)
<b>EICH</b>	Enfermedad de Injerto contra Huésped
<b>ELISA</b>	del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensayo enzimático de inmuno-absorbancia)
<b>EMA</b>	del inglés <i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea del medicamento)
<b>Fab</b>	del inglés <i>Fragment antigen-binding</i> (Fragmento de unión antigénica)
<b>FBS</b>	del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero Fetal bobino)
<b>FDA</b>	del inglés <i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos)
<b>FITC</b>	del inglés <i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
<b>FMO</b>	Fluorescence Minus One
<b>FOXP</b>	del inglés <i>forkhead box protein</i>
<b>GD</b>	del inglés <i>Graves Disease</i> (Enfermedad de Graves)
<b>GFP</b>	del inglés <i>Green Fluorescent protein</i> (Proteína Verde Fluorescente)
<b>GITR</b>	del inglés <i>Glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i> (Proteína relacionada con el Receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides)
<b>GranzB</b>	Granzima B
<b>H.G.U.</b>	Hospital General Universitario
<b>HLA</b>	del inglés <i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno leucocitario humano)
<b>HSV</b>	del inglés <i>Herpes Simple Virus</i> (Virus Herpes Simple)
<b>IBD</b>	del inglés <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (Enfermedad Intestinal Inflamatoria)
<b>ICOS</b>	del inglés <i>Inducible T-cell costimulator</i> (Proteína co-estimuladora inducible)
<b>ICOSL</b>	del inglés <i>Inducible T-cell costimulator Ligand</i> (Ligando de la proteína co-estimuladora inducible)
<b>IDO</b>	Indoleamina 2,3-dioxygenasa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IPEX</b>	del inglés <i>Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome</i> (Síndrome de inmunodesregulación - poliendocrinopatía - enteropatía ligada a X)

<b>iPSC</b>	del inglés <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> (Células madre pluripotenciales inducidas)
<b>ITAMs</b>	del inglés <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> (Motivos activadores basados en el receptor de tirosina)
<b>iTreg</b>	Treg inducidas en circulación periférica
<b>K562</b>	Línea celular derivada de un paciente con leucemia mielógena crónica en crisis blástica
<b>LAG-3</b>	del inglés <i>Lymphocyte-activation gene 3</i> (Gen 3 de activación linfocitaria)
<b>LAP</b>	del inglés <i>Latency-associated peptide</i> (Péptido latente asociado)
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>LTR</b>	del inglés <i>Long terminal repeat</i> (Repetición terminal larga)
<b>MDSC</b>	del inglés <i>Myeloid-derived Suppressor Cells</i> (Células supresoras derivadas de progenitores mieloides)
<b>MFI</b>	del inglés <i>mean fluorescence intensity</i> (Intensidad media de fluorescencia)
<b>MHC</b>	del inglés <i>major histocompatibility complex</i> (Complejo mayor de histocompatibilidad)
<b>MS</b>	del inglés <i>Multiple Sclerosis</i> (Esclerosis Múltiple)
<b>mSA2</b>	del inglés <i>affinity-enhanced monomeric streptavidin 2</i> (Estreptavidina monomérica de afinidad mejorada 2)
<b>MSC</b>	del inglés <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (Células madre mesenquimales)
<b>MSCV</b>	del inglés <i>Murine Stem Cell Virus</i> (Virus de células madre murinas)
<b>mTEC</b>	del inglés <i>medullar thymic epithelial cells</i> (Células epiteliales tímicas de la médula)
<b>NK</b>	del inglés <i>natural killer</i> (Células asesinas naturales)
<b>NT</b>	No transducido
<b>nTreg</b>	Treg naturales
<b>PHA</b>	del inglés <i>Phytohemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
<b>PBC</b>	del inglés <i>Primary Biliary Cirrhosis</i> (Cirrosis Biliar Primaria)
<b>PBS</b>	del inglés <i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampón fosfato salino)
<b>PCR</b>	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PD-1</b>	del inglés <i>Programmed cell death protein 1</i> (Receptor de muerte programada 1)
<b>PD-L1</b>	del inglés <i>Programmed Death-ligand 1</i> (Ligando 1 del receptor de muerte programada)
<b>PD-L2</b>	del inglés <i>Programmed Death-ligand 2</i> (Ligando 2 del receptor de muerte programada)

<b>PMA</b>	del inglés <i>Phorbol myristate acetate</i> (Forbol 12-miristato 13-acetato)
<b>PSC</b>	del inglés <i>Primary Sclerosing Cholangitis</i> (Colangitis Esclerosante Primaria)
<b>pTreg</b>	Treg extraídas y purificadas a partir de sangre periférica
<b>RA</b>	del inglés <i>Rheumatoid Arthritis</i> (Artritis Reumatoide)
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SAB</b>	Suero AB humano
<b>ScFv</b>	del inglés <i>Single-chain variable fragment</i> (Fragmento variable de cadena única)
<b>SEM</b>	del inglés <i>Standard error of the mean</i> (Error estándar de la media)
<b>SI</b>	Sistema Inmune
<b>SLE</b>	del inglés <i>Systemic Lupus Erythematosus</i> (Lupus Eritematoso Sistémico)
<b>S.O.C</b>	del inglés <i>Super Optimal broth + Catabolic repressor</i> (Medio súper óptimo con represión catabólica)
<b>SP</b>	Timocitos Simple Positivos
<b>SS</b>	Síndrome de Sjogren
<b>T1D</b>	del inglés <i>Type 1 Diabetes</i> (Diabetes tipo 1)
<b>Tc</b>	Células o linfocitos T citotóxicos
<b>Tconv</b>	Células o linfocitos T convencionales
<b>TCR</b>	del inglés <i>T-cell receptor</i> (Receptor de células T)
<b>Tfh</b>	del inglés <i>follicular T helper</i> (Células T colaboradoras foliculares)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	del inglés <i>Transforming growth factor beta</i> (Factor de crecimiento transformante beta)
<b>Th</b>	del inglés <i>T helper</i> (Células T colaboradoras)
<b>THP-1</b>	Línea celular derivada de monocitos de sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda
<b>thyTreg</b>	Timocitos CD25 <sup>+</sup> extraídos de timo y expandidos <i>in vitro</i> con capacidades y funciones inmunosupresoras
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	del inglés <i>tumor necrosis factor alpha</i> (Factor de necrosis tumoral alfa)
<b>Treg</b>	Células o linfocitos T reguladores
<b>TSDR</b>	del inglés <i>Treg-specific de-methylated region</i> (Región de demetilación específica de Treg)
<b>tTreg</b>	Treg originadas en el timo
<b>UniCAR</b>	del inglés <i>Universal CAR</i> (CAR Universal)
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia humana

# III. Introducción



### III.1 El sistema inmune

Los seres humanos están constantemente expuestos a microorganismos presentes en el medio ambiente que pueden acceder al organismo a través de la piel o las mucosas (1). El que desarrollemos una enfermedad tras la penetración de un microorganismo dependerá de la patogenicidad de este y de los mecanismos de defensa del individuo hospedador. El sistema inmune (SI), formado por una compleja red de células, órganos linfoides, citoquinas y otras sustancias presentes en la sangre, la linfa y en los órganos del cuerpo, se encarga de esa defensa (2). Para ello, el SI humano está organizado en dos grandes subgrupos, determinados por la velocidad y la especificidad de la reacción celular ante un patógeno. Estas dos grandes ramas comúnmente se las conoce como SI Innato y SI Adaptativo, aunque los últimos descubrimientos están desdibujando un poco las diferencias entre ambos.

El **SI Innato** está compuesto por una multitud de elementos, como las barreras físicas (piel), químicas (sustancias antimicrobianas, sistema del complemento, citoquinas) y celulares, como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, algunos tipos de células *natural killer* (NK), células dendríticas (DC), etc. Ampliamente conservado en la naturaleza a nivel filogenético, el SI innato proporciona una reacción defensiva rápida e inmediata, pero no específica, frente a los patógenos (3). Por el contrario, el **SI Adaptativo** proporciona una respuesta específica frente al patógeno, pero se requieren varios días para que se desarrolle. Esta respuesta específica se caracteriza por la exposición de los antígenos (Ag, pequeños fragmentos de proteínas o de azúcares complejos) del patógeno por parte de las células presentadoras de Ag (APC, por sus siglas en inglés). La exposición de los Ag por las APC induce una cascada de reconocimiento, activación y posterior acción de los linfocitos T y B efectores, que son las células que principalmente desarrollan la respuesta inmune específica para dicho patógeno. Además de los linfocitos T y B efectores, el SI adaptativo también genera linfocitos T y B memoria, capaces de desencadenar respuestas más rápidas y eficaces ante una reinfección por el mismo patógeno tras el primer contacto (4). A continuación, nos centraremos solo en algunas

células del SI adaptativo, aunque esto no implica que el resto de las células del SI no sean de importancia.

### III.1.1 Linfocitos T

Los linfocitos T son uno de los principales grupos de subpoblaciones de células del SI adaptativo. La especificidad de los linfocitos T hacia los Ag es restringida, pues para reconocerlos dependen del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; también conocido como antígeno leucocitario humano o HLA, por sus siglas en inglés) de clase I o II, presente en la superficie de las células nucleadas (MHC de clase I) o en la superficie celular de las APC (MHC de clase II). Además, para que se desencadene la participación de los linfocitos T frente a un patógeno necesitan que otras células, como las APC, les presenten los antígenos frente a los que serán dirigidos (5).

Los progenitores de los linfocitos T se generan en la médula ósea, pero migran hacia el timo para completar su maduración, en un proceso en el que nos centraremos más adelante. En este órgano, todos los linfocitos T adquieren el complejo formado por las subunidades del clúster de diferenciación (CD) 3 y el receptor de células T (TCR), además de otras proteínas y características necesarias que determinarán su fenotipo y su funcionalidad (5). Este fenotipo y función son variables y, dentro de las células T convencionales (Tconv), subpoblación cuyo TCR es un heterodímero conformado por las subunidades/cadenas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), se pueden distinguir dos principales grupos de células T:

- Células T colaboradoras (*T helper* o Th). Células que expresan el marcador CD4 en su superficie y que reconocen los Ag presentados por las MHC de clase II de las APC. Este reconocimiento antigénico, junto con otras señales de co-estimulación, activa a estas células para que proliferen y se diferencien en células efectoras específicas del antígeno presentado por la APC. En función del tipo de patógeno y, por consiguiente, del ambiente de citoquinas liberadas por las APC y otras células del SI innato, las células Th CD4 se pueden diferenciar en varias subpoblaciones con propiedades diferentes. En términos generales, si el patógeno es intracelular, al ambiente

se liberará la interleuquina 12 (IL-12). En presencia de esta tercera señal de co-estímulo (las MHC clase II, las proteínas de membrana co-estimuladoras y la IL-12), las células CD4 se polarizarán al subtipo Th1, productoras del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF) - $\alpha$ . Las Th2 son CD4 que se han diferenciado en presencia de la IL-4, como respuesta frente a helmintos y parásitos extracelulares. Estas Th2 producen más IL-4, IL-5 o IL-13. Las Th17, diferenciadas en presencia de la IL-6, IL-23 y el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), es una subpoblación de células CD4 que secretan IL-17 e IL-22, y que están implicadas en la defensa frente bacterias extracelulares y hongos, principalmente presentes en las mucosas. También se han identificado otros tipos de células Th CD4, como las células T colaboradoras foliculares (Tfh), las Th9, las Th22 y otras subpoblaciones cuyo fenotipo y función aún están siendo estudiados (6) (7). A pesar de que no es la función principal de estas células, también se han descrito otras células Th CD4 no convencionales con capacidad citotóxica (8). Finalmente, dentro de las células Th CD4 también se encuentra una subpoblación celular con propiedades únicas, los linfocitos T reguladores (Treg). Las Treg participan en los mecanismos de tolerancia periférica gracias a su capacidad de suprimir la respuesta inflamatoria e inhibir la activación del resto de componentes tanto del SI innato como del adaptativo. Además del CD4, las Treg se caracterizan por expresar constitutivamente la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2, también conocido como CD25; el factor de transcripción FOXP (del inglés *forkhead box protein*) 3 y unos bajos niveles de expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-7, el CD127 (9). Las Treg serán descritas en profundidad más adelante.

- Células T citotóxicas (Tc). Células que expresan el marcador CD8 en su superficie y que reconocen Ag presentados mediante las MHC de clase I, fisiológicamente expresada en todas las células del organismo. Para que los linfocitos Tc CD8 puedan desarrollar su función y su especificidad antigénica, se requieren las señales de co-estímulo proporcionadas por las células Th CD4 (principalmente) o por algunos tipos de DC (bajo circunstancias concretas) y por el microambiente donde se encuentren. Una vez estimuladas, las células CD8 viajan por el organismo identificando a células que presenten el Ag del

patógeno en su MHC de clase I. Tras el reconocimiento del Ag, inducen la muerte de la célula que lo porta mediante la liberación de gránulos citotóxicos (perforinas y granzimas), el contacto célula-célula (el complejo Fas-Fas ligando, entre otros) o la liberación de citoquinas inflamatorias (10). Aunque hasta ahora se han descrito menos subpoblaciones de linfocitos Tc CD8, destacan algunas, como las células Tc CD8 reguladoras (11).

Por otro lado, atendiendo a otros marcadores fenotípicos, de diferenciación y de funcionalidad, se han clasificado diferentes subpoblaciones dentro de las células Th CD4 y Tc CD8. Las células Th CD4 y Tc CD8 vírgenes o *naive* son todas aquellas células T maduras que aún no han sido inducidas a reconocer ningún Ag. Cuando les presentan el Ag adecuado, las células Th CD4 y Tc CD8 *naive* se activan y diferencian a células Th CD4 y Tc CD8 efectoras, que ejercerán su función según corresponda. Una vez acabado su cometido, la mayoría de estas células efectoras sufrirán un proceso de muerte celular programada para restaurar el equilibrio y la homeostasis inmunológica. Solamente algunas células sobrevivirán y estas se convertirán en células Th CD4 y Tc CD8 memoria, capaces de generar respuestas más rápidas y eficaces ante una posterior reexposición a los Ag del mismo patógeno (6).

### III.1.2 Maduración de las células T en el timo

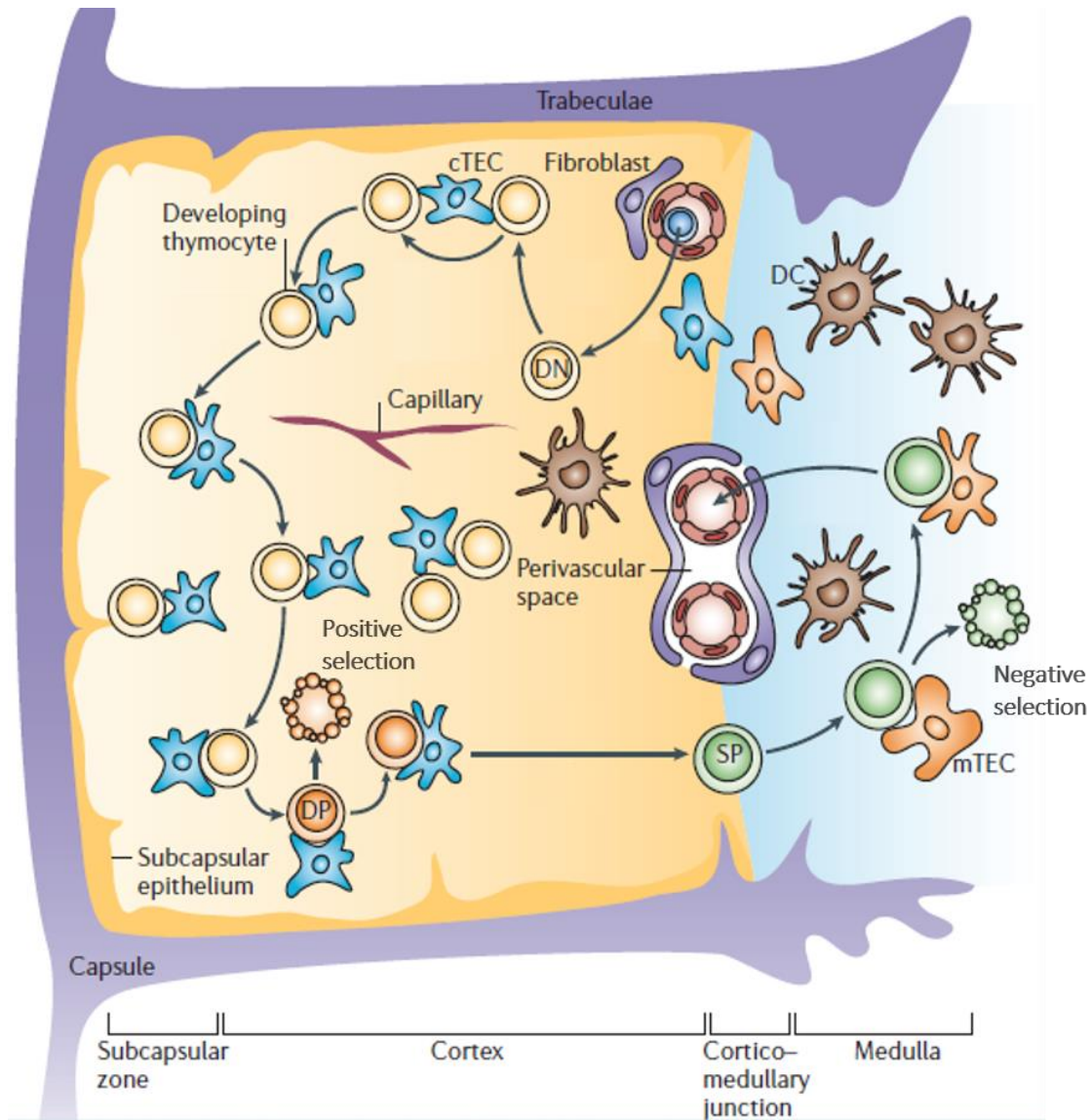
El timo es un órgano linfoide primario situado en la caja torácica, anterior al corazón. Principalmente activo durante la infancia, es en este órgano donde maduran y se diferencian los progenitores de las células T. Para ello, las células progenitoras hematopoyéticas migran desde la médula ósea a la corteza del timo, donde madurarán a medida que avanzan desde la corteza hacia la médula de este órgano.

Una vez entran en el timo, a los progenitores inmaduros de células T se les denomina timocitos. En la corteza del timo, los timocitos no expresan en su superficie ni el TCR, ni el CD3, ni el CD4, ni el CD8, denominándose timocitos Dobles Negativos (DN). A medida que avanzan estos timocitos DN CD4<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> por la corteza, se produce en estas células el reordenamiento genético que acaba dando lugar a dos tipos de TCR, el formado por las subunidades  $\alpha\beta$  o el formado por las cadenas gamma y delta ( $\gamma\delta$ ). En este

paso, las células también comienzan a expresar las cadenas que forman el CD3. Centrándonos en las células que expresan el complejo TCR $\alpha\beta$ -CD3 convencional, los timocitos posteriormente sintetizan simultáneamente las proteínas CD4 y CD8 (pasando a denominarse células Dobles Positivas, DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). A continuación, estas células DP interactúan con las células epiteliales tímicas de la corteza (cTEC, por sus siglas en inglés). La interacción entre estos timocitos DP con las moléculas MHC clase I y II de las cTEC, y junto con el microambiente de citoquinas, consigue que se eliminen todos aquellos timocitos cuyo complejo TCR-CD3 no sea capaz de reconocer esas MHC con la intensidad correcta. Este proceso de selección se denomina “selección positiva”, y asegura que las futuras células T reconozcan las MHC propias con la intensidad y avidéz adecuadas (12).

A continuación, los timocitos DP que reconocen las MHC propias migran a la médula tímica. Aquí, los timocitos interactúan con las células epiteliales tímicas de la médula (mTEC, por sus siglas en inglés), con DC y con macrófagos que presentan a los timocitos los Ag propios de nuestro organismo (auto-Ag). Los timocitos que reconozcan e interactúen demasiado fuerte con los auto-Ag serán eliminados. Este proceso se realiza en un microambiente en el que se pueden encontrar, además, muchas citoquinas, como el TGF- $\beta$  (13, 14). Gracias a este paso, denominado “selección negativa”, se evita la maduración de linfocitos T auto-reactivos que puedan dañar al propio organismo mediante el ataque a las células propias que presenten los auto-Ag, aunque este mecanismo no es perfecto y algunos linfocitos T auto-reactivos pueden salir a la circulación periférica y, bajo determinadas circunstancias, desencadenar procesos patológicos (15). La gran mayoría de los timocitos son eliminados en los procesos de selección positiva y negativa.

Al migrar a la médula tímica, en paralelo a la selección negativa, los timocitos comienzan a disminuir la expresión de uno de sus co-receptores, dando lugar a las poblaciones Simples Positivas (SP) Th CD4 y Tc CD8. Una vez han finalizado todas las etapas de maduración, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T maduros *naive* salen del timo hacia el torrente sanguíneo (12) (Ilustración 1).



**Ilustración 1.** Esquema del desarrollo y diferenciación de los diferentes tipos de linfocitos T desde sus progenitores hematopoyéticos en los compartimentos del timo. Adaptado de Takahama, 2006 (16).

### III.2 Desequilibrio de la homeostasis inmunológica y tratamientos clásicos asociados

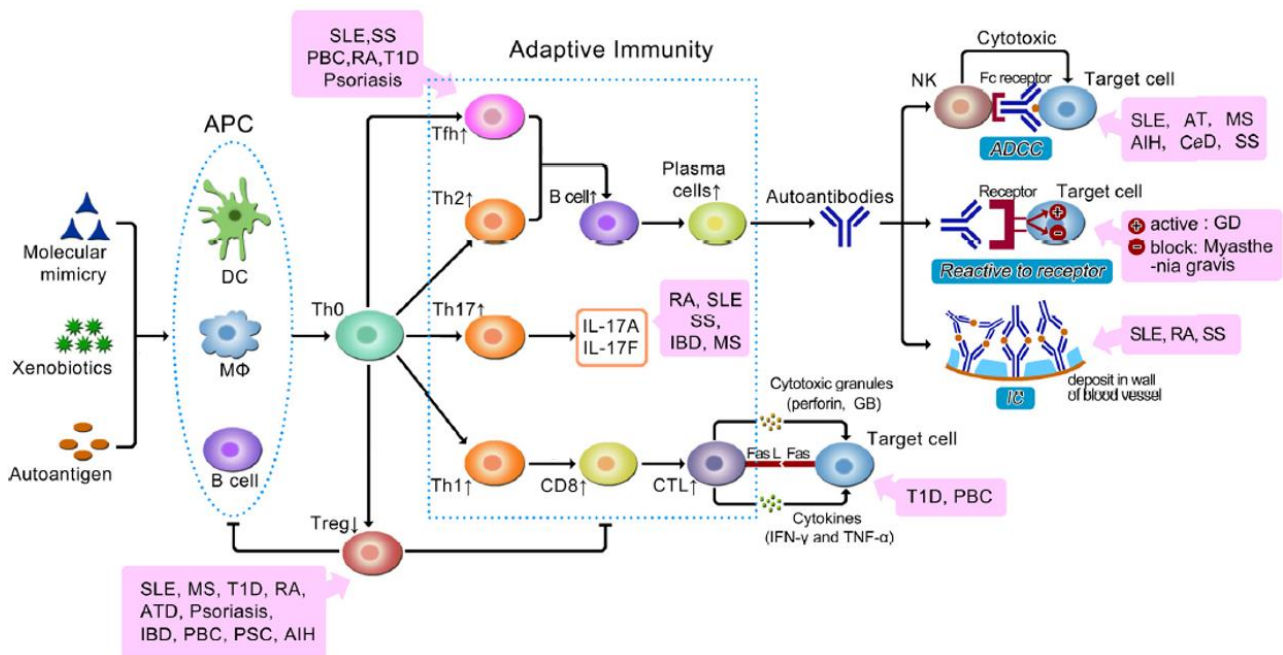
Un desequilibrio en la homeostasis de los componentes del SI puede acabar desencadenando enfermedades con una etiopatogenia muy dispar. Así, si se produce una disminución en los mecanismos de tolerancia inmunológica, se pueden desarrollar las enfermedades autoinmunes o alergias contra elementos inocuos. Por el contrario, un aumento en la tolerancia puede dar lugar al desarrollo de tumores o a infecciones severas. Además, una

disfunción de alguno de los elementos del SI también puede desarrollar inmunodeficiencias (17).

### III.2.1 Pérdida de tolerancia a antígenos propios

Las enfermedades autoinmunes afectan a entre el 3% y el 5% de la población mundial, con más de 100 tipos diferentes de enfermedades, siendo la diabetes tipo 1 y la enfermedad autoinmune tiroidea las más comunes (18). Algunas son órgano-específicas, como la cirrosis biliar primaria; y otras afectan a múltiples órganos, como el lupus eritematoso sistémico. El origen o la causa de estas enfermedades autoinmunes es muy diverso, pues algunas son provocadas por I) mutaciones en los principales genes que controlan las células inmunitarias; II) liberación de auto-Ag de células apoptóticas en contextos pro-inflamatorios; III) moléculas liberadas por microorganismos, agentes químicos (tabaco, alcohol) o físicos (rayos ultravioleta) que generan un mimetismo con auto-Ag; IV) eventos relacionados con la nutrición, como el déficit de vitamina D (18); o por la combinación de alguna de las anteriores causas.

A pesar de esta compleja y extensa lista de causas, la patogenia de las enfermedades autoinmunes es similar. Cuando los mecanismos de tolerancia central (por ejemplo, los mecanismos de la selección positiva y negativa en el timo) y tolerancia periférica (controlados por las células reguladoras, como las Treg) ven alterada su funcionalidad, las APC comienzan a presentar auto-Ag e inducen una cascada de citoquinas inflamatorias que activan, a su vez, a otras células del SI innato y que estimulan a las células T auto-reactivas. Una vez son estimuladas, las células T auto-reactivas, que hasta entonces estaban inhibidas o manteniendo la homeostasis eliminando auto-Ag liberados por células apoptóticas (18), pueden ser polarizadas a fenotipos de Th1 o Th17, que a su vez estimulan a las células Tc, cuyo efecto citotóxico puede dañar a los propios tejidos. Por otro lado, las células T también pueden ser polarizados hacia fenotipos Th2 o Tfh, que facilitan la producción de auto-anticuerpos (Ac) por parte de las células B auto-reactivas que también dañarán los tejidos, desencadenándose, así, los múltiples tipos de enfermedades autoinmunes (Ilustración 2) (18).



**Ilustración 2. Desarrollo de la patogenia de la mayoría de las enfermedades autoinmunes y células que las desencadenan (18).** Cuando los mecanismos de tolerancia central o periférica fallan, las APC pueden comenzar a presentar auto-Ag, o moléculas similares. Esta presentación puede estimular a las células T auto-reactivas que, a su vez, estimularán a otras células, como las células B auto-reactivas. En función del tipo de respuesta celular que se desarrolle, se pueden desencadenar numerosas y muy variadas enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Síndrome de Sjogren (SS), Cirrosis Biliar Primaria (PBC), Artritis Reumatoide (RA), Diabetes tipo 1 (T1D), Enfermedad Intestinal Inflamatoria (IBD, que engloba a la Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn), Esclerosis Múltiple (MS), Hepatitis Autoinmune (AIH), Enfermedad Celiaca (CeD), Enfermedad de Graves (GD), Miastenia grave, Enfermedad Tiroidea Autoinmune (ATD), Psoriasis, Colangitis Esclerosante Primaria (PSC), entre otras. Todas las abreviaturas anteriores corresponden a las siglas en inglés de las enfermedades.

### III.2.2 Reacción inmunológica no deseada tras un trasplante

En el caso de los trasplantes, el SI actúa correctamente, reconociendo como extraños los Ag del órgano trasplantado y reaccionando frente a ellos. Sin embargo, esta reacción inmunológica va en contra de la supervivencia del órgano trasplantado y de la salud del paciente. Como en las enfermedades autoinmunes, en el rechazo de los trasplantes se puede desencadenar tanto un rechazo celular (mediado por las células Tc y ayudado por las Th), como un rechazo humoral (mediado por los Ac producidos por las células B). Para que estas células lleven a cabo ese rechazo, deben ser estimuladas por las APC. En este contexto, existen tres vías diferentes: I) La vía directa es aquella en la que

las APC del órgano trasplantado migran a los ganglios linfáticos del individuo receptor en donde presentarán los Ag alogénicos del órgano y estimularán a las células T y B del receptor, que viajarán hasta el órgano e inducirán el rechazo (19). II) La vía indirecta es aquella en la que las APC del receptor captan los Ag alogénicos de las células del órgano trasplantado para, posteriormente, estimular el SI del receptor (20). Y III) La vía semidirecta es aquella en la que las APC del receptor captan, por contacto directo de las membranas con las APC del donante o mediante vesículas extracelulares, como los exosomas, las MHC junto con los Ag del donante. Finalmente, estas APC del receptor con MHC y Ag del donante desencadenan el rechazo inmunológico (19, 21).

### III.2.3 Tratamientos convencionales y sus limitaciones

Existe una gran variedad de fármacos inmunosupresores que se utilizan para reducir la respuesta inmunitaria frente a los propios tejidos o frente al órgano trasplantado. Según la Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología (AAAAI, 2020), los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar en diferentes grupos:

- Inmunosupresores generales: Suprimen el SI de una forma generalizada mediante la neutralización de enzimas o células que sintetizan elementos pro-inflamatorios, y, por tanto, afectando a más de una población celular o mecanismo inflamatorio. Por ejemplo, los corticoesteroides (22, 23), el micofenolato (24) o el metotrexato (25).
- Bloqueantes de citoquinas: Neutralizan citoquinas e interleuquinas esenciales para una correcta comunicación entre las células del SI. Algunos ejemplos de estos fármacos son los bloqueantes de IL-1 (Anakinra, Canakinumab), del TNF (Infliximab o Adalimumab), de la IL-6 (Tocilizumab) o de la IL-17 (Secukinumab) (26-28).
- Inhibidores de la calcineurina. La calcineurina es una enzima calcio-dependiente que es responsable de la síntesis de la IL-2 y de otras citoquinas pro-inflamatorias. Los fármacos inhibidores de esta proteína, como la ciclosporina o el tacrolimus, inhiben la activación y proliferación de los

linfocitos T, así como su producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (29)

- Anticuerpos biológicos específicos de marcadores celulares: Dirigidos frente a proteínas presentes en las células que se desean eliminar, por ejemplo, el anti ( $\alpha$ )-CD20 (Rituximab) o el anti-factor de crecimiento de células B (Belimumab) (28).

Aunque estas múltiples terapias inmunosupresoras han permitido mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades autoinmunes y aumentar la longevidad del órgano trasplantado en pacientes que han recibido un trasplante, su eficacia no es completa y es necesario administrarlos a lo largo de toda la vida. Otro inconveniente de estos fármacos es el daño que pueden provocar a nivel cardiovascular, la toxicidad hepato-biliar y la nefrotoxicidad. Además, debido a su efecto pleiotrópico, actúan inespecíficamente frente a otras células no patogénicas o bloqueando a los intermediarios de la cascada inflamatoria. Por lo tanto, estos fármacos pueden tener como efecto secundario una excesiva depresión del SI, aumentando la probabilidad de infecciones o procesos tumorales (30-32).

Todo ello hace necesario investigar nuevas estrategias que reduzcan esos efectos secundarios adversos en los tratamientos inmunosupresores convencionales de las enfermedades autoinmunes y en el rechazo de trasplantes, logrando, además, la supervivencia indefinida del órgano para mejorar la calidad de vida del paciente. Actualmente, las nuevas aproximaciones terapéuticas para superar estas limitaciones están basadas en células reguladoras que puedan sustituirlos. Existen muchos tipos celulares con una alta capacidad inmuno-moduladora y supresora, como las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) (33), las DC tolerogénicas (34), células supresoras derivadas de progenitores mieloides (MDSC, por sus siglas en inglés) (35), los linfocitos B reguladores secretores de IL-10 (36, 37) y las Treg.

### III.3 Papel de los linfocitos T reguladores en la homeostasis

Como fue mencionado, las células o linfocitos Treg son una subpoblación de células T que, a pesar de pertenecer al grupo de las Th CD4, son capaces de suprimir la respuesta inflamatoria del resto de componentes del SI. Este hecho las convierte en un componente celular indispensable para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y de la tolerancia periférica a Ag propios (38). Se ha demostrado que una reducción de su número absoluto, su frecuencia o su capacidad de acción puede desencadenar enfermedades autoinmunes, infecciones y eventos alérgicos (39).

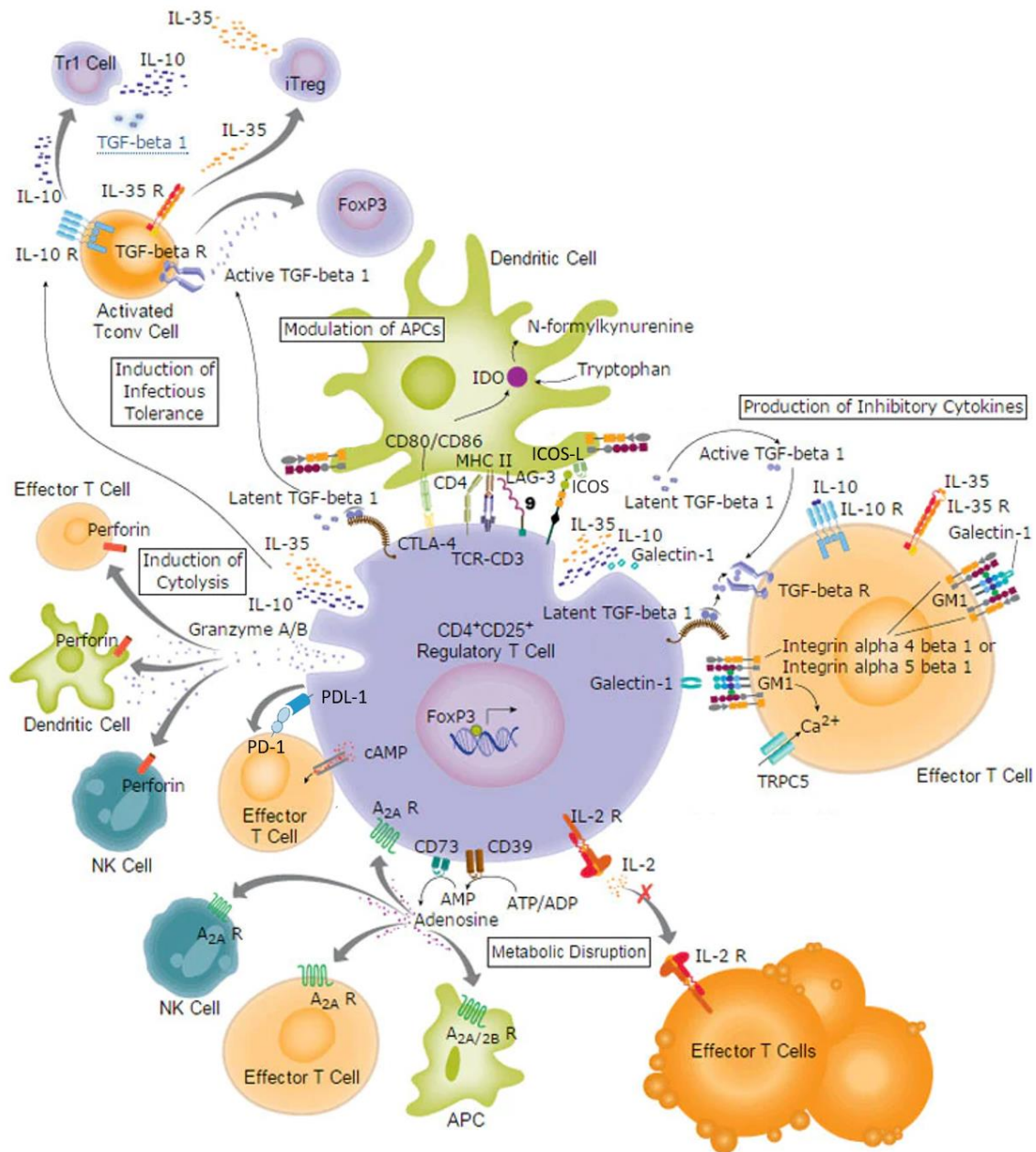
#### III.3.1 Fenotipo y Funcionalidad de las Treg

Las Treg se caracterizan por su capacidad inmunosupresora e inmunoreguladora. Esta supresión puede ser llevada a cabo mediante diferentes mecanismos que afectan a una amplia gama de células tanto del SI innato (macrófagos, DC, neutrófilos, células NK, osteoclastos, etc.) como del SI adaptativo (células Th CD4, Tc CD8 y células B) (40). Estos mecanismos pueden ser directos, cuando son las propias Treg las que inhiben a la célula diana, o indirectos, cuando las Treg usan una molécula u otra célula intermediaria para ejercer su función (41).

Dentro de los **mecanismos de supresión directos**, las Treg expresan en su superficie moléculas como el PD-L1 y PD-L2 (ligandos 1 y 2, respectivamente, del receptor de muerte programada, por sus siglas en inglés), que actúan reconociendo y uniéndose al PD-1 (receptor 1 de muerte programada, por sus siglas en inglés) e induciendo la muerte de otras células. El CTLA-4 (antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos, por sus siglas en inglés) y LAG-3 (gen 3 de activación linfocitaria, por sus siglas en inglés) se unen respectivamente a las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 y MHC de clase II de las APC. Esta unión impide que estas APC puedan seguir activando a otras Tconv, ya que la proteína co-estimuladora CD28 o el TCR de estos linfocitos no se pueden unir a sus ligandos correspondientes (42). Otro mecanismo directo es el ejercido a través de la proteína co-estimuladora inducible (ICOS, por sus siglas en inglés) cuando se une a su ligando, ICOSL, que está presente en la

mayoría de las células APC, inhibiendo la función de estas APC (43) (Ilustración 3).

Entre los **mecanismos de supresión indirectos** se encuentran la **producción de citoquinas anti-inflamatorias**, como la IL-10, IL-35, TGF- $\beta$  activa o TGF- $\beta$  latente anclado a la membrana (LAP, por sus siglas en ingles) que suprimen a las células efectoras. Otro mecanismo es la secreción de galectina, que controla la activación y la supervivencia de otros linfocitos gracias a la vía de señalización Fas/FasL y la acción de caspasas, teniendo un efecto inmunosupresor. Además, las Treg inducen la expresión de IDO (Indoleamina 2,3-dioxygenasa) en las DC. Este IDO transforma el triptófano del medio en quinurenina, con capacidad anti-inflamatoria (Ilustración 3). Otros mecanismos de supresión indirectos relevantes son los basados en la **disrupción metabólica** de las células efectoras. Gracias a la alta expresión del CD25, las Treg disminuyen la cantidad de IL-2 disponible en el medio, reduciendo la activación y supervivencia de los linfocitos efectoras que dependen de dicha citoquina. De una manera similar, las proteínas CD39 y CD73 degradan el ATP disponible en ADP, AMP y adenosina, respectivamente, reduciendo la activación y proliferación de las células efectoras, efecto también potenciado por las propiedades anti-inflamatorias de la adenosina (44). Además, las Treg también suprimen indirectamente la proliferación **induciendo la lisis** de las células efectoras mediante la secreción granzimas y perforinas que crean poros y dañan la integridad de la membrana celular (Ilustración 3). Finalmente, otro mecanismo de supresión indirecto de las Treg es **polarizar el fenotipo** de los monocitos hacia un perfil de macrófago M2, participante activo de la tolerancia y supresión del SI, y reducen la polarización hacia macrófagos M1, considerados pro-inflamatorios (45). Además, inducen en los neutrófilos y en los linfocitos **un perfil más tolerogénico** y aumentan su producción de citoquinas y quimioquinas anti-inflamatorias (42, 46, 47) (Ilustración 3).



**Ilustración 3. Mecanismos de supresión directos e indirectos de los linfocitos Treg sobre otras células efectoras.** Adaptado de Bio-Techne. Principales mecanismos de supresión de las Treg englobados en mecanismos de supresión directos, mediante el uso de proteínas que actúan ante el contacto célula-célula, y mecanismos de supresión indirectos, como la producción de citoquinas inhibitorias, disrupción metabólica, inducción de citólisis o la polarización de células efectoras hacia un perfil tolerogénico.

Además de la expresión de las anteriores proteínas que participan en la funcionalidad de las Treg, estas células también expresan integrinas de membrana que facilitan su adhesión al endotelio vascular, como CD49b y CD62L; y receptores implicados en la migración a través de los tejidos

periféricos, como el CD103, CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7 (48), pudiéndose encontrar Treg en numerosos tejidos y mucosas.

### III.3.2 Tipos de Treg y su plasticidad

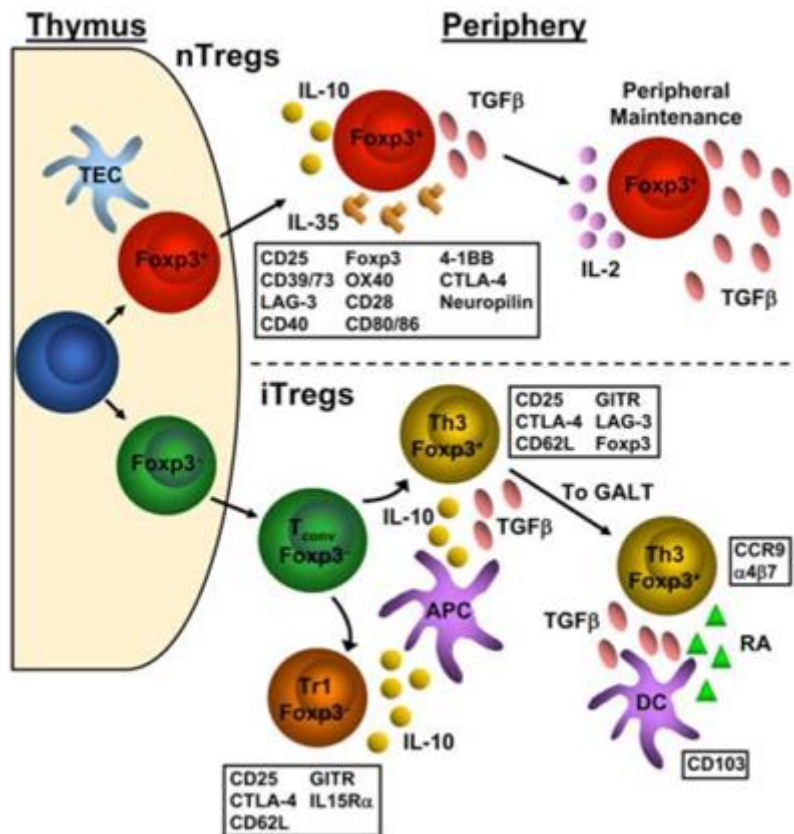
En función de donde se originen, se pueden distinguir diferentes tipos de Treg:

- Treg “naturales” derivadas del timo (tTreg o nTreg): Equivalen al 5-10% de todas las células Th CD4 en sangre periférica y son las únicas Treg que se desarrollan, maduran y diferencian íntegramente en el timo, gracias a los procesos de Selección Positiva y Negativa. Como fue mencionado anteriormente, en la Selección Negativa, aquellos timocitos DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> que no reconocen auto-Ag, acaban dando lugar a los linfocitos Tconv. Por el contrario, aquellos que reconocen los auto-Ag con una alta afinidad son eliminados por apoptosis. Sin embargo, una co-estimulación intermedia del TCR/CD28, asociada a una afinidad parcial por los auto-Ag (49, 50), induce, por un lado, la expresión del CD25 y, por otro lado, una baja expresión del FOXP3, dando lugar a las dos subpoblaciones conocidas de progenitores de tTreg, las subpoblaciones CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>neg</sup> y CD25<sup>neg</sup>FOXP3<sup>bajo</sup> (5, 51). Para que ambas poblaciones acaben dando lugar a las tTreg en un complejo mecanismo de diferenciación y selección, es necesaria la acción de las mTEC, la presencia de citoquinas, como la IL-2 (esencial), TGF- $\beta$ , IL-15 e IL-17 (52); la expresión de proteínas co-estimuladoras, como GITR o OX40; y una reducción en la ruta de activación de la PI3K-mTOR, entre otras señales (42, 53, 54). Una vez han madurado, las tTreg *naive* salen del timo hacia la periferia.

Estas tTreg maduras se caracterizan por mostrar el complejo TCR $\alpha\beta$ -CD3 y el CD4, además de una alta y estable expresión del CD25 y del FOXP3. El FOXP3 es un factor de transcripción esencial para el desarrollo y el mantenimiento del fenotipo y la funcionalidad de las Treg (55). De hecho, se demostró que pacientes con mutaciones en el gen *FOXP3* desarrollaban el síndrome IPEX (proveniente del inglés *Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*), caracterizado por presentar autoinmunidades sistémicas. Sin embargo, la caracterización de las Treg en humanos no se puede hacer únicamente en base a estos marcadores ya que,

tras una estimulación, cualquier célula T aumenta su expresión del CD25 y del FOXP3 de forma transitoria (56), pero sin presentar una función supresora asociada. Por lo tanto, además de estos marcadores, las tTreg se caracterizan por tener un bajo grado de metilación de la región de demetilación específica de Treg (*TSDR*, por sus siglas en inglés). Esta región no codificante es un promotor que, cuando está demetilado, se mantiene activo y promueve la expresión constitutiva del gen *FOXP3* (57). Por el contrario, esta región está totalmente metilada y, por tanto, silenciando la expresión del *FOXP3* en las células Tconv (58). Finalmente, la expresión del factor de transcripción HELIOS y la neuropilina-1 en membrana, además del estado de baja metilación del *TSDR*, se consideran marcadores de estabilidad de las tTreg que no están expresados en otros tipos de Treg (59, 60) (Ilustración 4).

- Treg inducidas en la periferia (iTreg): Células Treg generadas fuera del timo a partir de linfocitos Th CD4 *naive* FOXP3<sup>neg</sup> de circulación periférica, tras el reconocimiento de determinados Ag bajo condiciones ambientales tolerogénicas inducidas por la acción de las tTreg y otras poblaciones inmunosupresoras (61) (Ilustración 3). Estas condiciones se caracterizan por una alta concentración de IL-2 y TGF- $\beta$ ; una potente activación del TCR junto con señales de co-estimulación (62) y la presencia de otros componentes, como el ácido retinoico (63). Estas condiciones dan lugar a un aumento de la expresión del FOXP3 y a la adquisición de la capacidad de suprimir una respuesta inflamatoria. Dentro de estas iTreg se han conseguido diferenciar algunas subpoblaciones con características funcionales propias, como las Tr1, con una alta capacidad de producción de IL-10 (64), las Tr35, productoras de IL-35 (65) o las Th3, productoras de TGF- $\beta$  (66), entre otras (43). Sin embargo, a pesar de su capacidad supresora, parece que estas iTreg solo pueden expresar el FOXP3 de forma transitoria (67), probablemente debido al grado de metilación intermedio de su *TSDR*, a diferencia de las tTreg y de las Tconv (57, 58) (Ilustración 4).

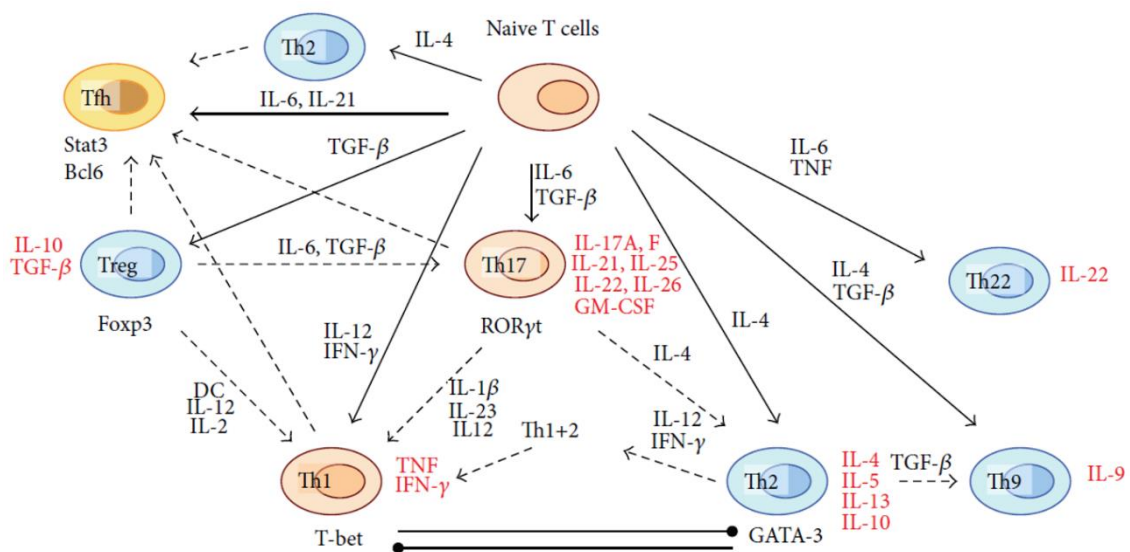


**Ilustración 4. Tipos de Treg *in vivo* con sus principales marcadores y mecanismos de funcionalidad.** (66). Las tTreg (o nTreg) son generadas en el timo y disponen de los mecanismos de supresión directos e indirectos para ejercer su función supresora. Las iTreg son generadas fuera del timo a partir de las Tconv FOXP3<sup>neg</sup> de circulación periférica. Se pueden distinguir varios tipos de subpoblaciones en función del mecanismo de supresión principal que utilicen.

Al igual que ocurre *in vivo*, se han conseguido generar iTreg *in vitro*. Mediante la estimulación del TCR y del CD28, y en presencia del TGF-β y/o de la IL-15, se ha conseguido inducir la expresión estable del FOXP3 en células Tconv CD4 de sangre periférica, preferentemente en su estado *naive* (62, 68-70). Además, también se han conseguido inducir iTreg mediante la modificación genética de las Tconv CD4 con vectores codificantes del gen *FOXP3*, induciendo la expresión estable de un FOXP3 exógeno independiente del control o del estado de metilación del *TSDR* o de otras regiones promotoras endógenas que, de forma natural en estas células, se encontrarían silenciadas (57, 71-75).

Se ha descrito que algunos tipos de Treg, sobre todo las iTreg inducidas a partir de Tconv *naive*, poseen una gran plasticidad en su fenotipo, pudiendo cambiar su expresión proteica y capacidades funcionales según el ambiente

en el que se encuentren (76). Se ha demostrado que en un ambiente con abundante TGF- $\beta$  e IL-6, las Treg de sangre periférica pueden cambiar a Th17 al aumentar la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$  $\tau$ , a pesar de que el TGF- $\beta$  favorezca la inducción de iTreg. Las iTreg también pueden transicionar a un fenotipo similar a las Th1 en presencia de IL-12 e IL-2, ya que, a pesar de mantener la expresión del FOXP3, se aumentan la expresión del factor de transcripción T-bet y del IFN- $\gamma$ , característicos de las Th1 (76). Por el contrario, las tTreg han demostrado ser son una subpoblación mucho más estable a nivel genético, epigenético, fenotípico y funcional (76, 77) (Ilustración 5).



**Ilustración 5. Diferenciación y plasticidad de las subpoblaciones de linfocitos T en función del ambiente de citoquinas y quimioquinas (76).**

Además de esta clasificación, atendiendo a la expresión del CD45RA y del FOXP3, como el resto de linfocitos T, las Treg también se pueden clasificar en Treg *naive* (CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), Treg activadas (CD45RA<sup>neg</sup>FOXP3<sup>alto</sup>) y Treg efectoras (CD45RA<sup>neg</sup>FOXP3<sup>+</sup>), con la capacidad de suprimir a pesar de producir citoquinas pro-inflamatorias (78, 79).

### III.3.3 Terapia celular con Treg obtenidas de diferentes fuentes y sus limitaciones

Numerosos ensayos preclínicos llevados a cabo en diferentes modelos animales han validado la funcionalidad de Treg extraídas de sangre periférica (denominadas en la presente tesis como pTreg) de adultos. Algunos estudios

sugirieron que, para conseguir un efecto terapéutico, era necesario infundir el mismo número de pTreg como de Tconv para proteger de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (80). Sin embargo, debido al bajo número de pTreg presentes en la sangre, era necesario expandirlas *ex vivo* para conseguir el suficiente número de células para alcanzar una dosis terapéutica. En este contexto, las pTreg policlonales que habían sido expandidas *ex vivo* eran capaces de inhibir a las células T del donante, reduciendo el desarrollo en modelos animales de EICH (81). Además, estas pTreg expandidas *ex vivo* también han demostrado ser eficaces prolongando la supervivencia y previniendo el rechazo de órganos trasplantados en modelos animales (82-84), incluso en ausencia total de fármacos inmunosupresores convencionales (85). Además, en modelos animales inmunodeficientes humanizados con la capacidad de albergar células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas, las pTreg aumentaban la supervivencia de trasplantes de piel humana (86) o de los islotes pancreáticos (87), al inhibir la reacción citotóxica de las CMSP frente a esos tejidos.

Gracias al enorme potencial de las pTreg en los modelos animales, se comenzaron los primeros ensayos clínicos en humanos. La estrategia que se ha llevado a cabo en la mayoría de ensayos con las pTreg ha consistido en: I) Extracción de sangre del paciente adulto; II) Purificación de las pTreg de esa sangre; III) Expansión de las pTreg *ex vivo*, hasta tener un número apropiado de células; y IV) Infusión de las mismas en el paciente de forma autóloga (88-93). Los principales resultados y conclusiones que se han alcanzado en estos ensayos clínicos han sido que la terapia con Treg es segura, incluso a altas dosis, ya que no se han visto efectos adversos ni mayores riesgos de toxicidades, infecciones, recaídas, neoplasias malignas asociadas a la infusión o mortalidad precoz, pero sí un aumento de las Treg circulantes en sangre periférica (88, 89, 92, 93) (94) (95). Estudiando su funcionalidad, por un lado, se ha visto que estas células reducen los síntomas de EICH crónica (95) y la incidencia de EICH aguda (94), todo ello previniendo, además, la aparición de enfermedades por patógenos oportunistas en ausencia de inmunosupresores convencionales (96). Por otro lado, en el caso de los ensayos clínicos de trasplantes de órgano sólido, a pesar de que la terapia

basada en pTreg autólogas de sangre periférica expandidas *ex vivo* era segura, los resultados de eficacia no fueron del todo alentadores, ya que la tasa de rechazo agudo de trasplantes confirmados por biopsia fue muy similar entre el grupo con inmunosupresores convencionales (12%) vs la terapia celular con pTreg (16%) (89).

Varias hipótesis podrían explicar ese limitado efecto terapéutico observado en humanos. Por ejemplo, podría deberse a la baja calidad de las pTreg infundidas. El aislamiento de las pTreg desde periferia se suele realizar mediante la selección de las células CD25<sup>+</sup>. Sin embargo, este marcador también lo expresan los linfocitos efectores activados, y, por tanto, la limitada eficacia se podría deber de una contaminación con otros tipos celulares, como monocitos, Tconv, DC, NK o células B (90). Por otro lado, al partir de células provenientes de adultos, las pTreg presentan un fenotipo diferenciado y envejecido. Se ha demostrado que las pTreg envejecidas de sangre de adulto presentan una menor supervivencia y estabilidad funcional que las pTreg con fenotipo *naive* (97). De hecho, se ha visto que pTreg de adulto con fenotipo de célula memoria pueden llegar hasta perder la expresión del FOXP3 cuando se estimulan y expanden *ex vivo* (98, 99). Además, debido a la escasa cantidad de pTreg que se pueden obtener de sangre, la expansión *ex vivo* se antoja obligatoria, promoviendo aún más su deterioro y agotamiento. Por el contrario, las pTreg con fenotipo *naive* CD45RA<sup>+</sup> fueron capaces de mantener la expresión del FOXP3 y su función supresora tras la estimulación y expansión *in vitro* (98).

Con la intención de solventar la limitación del estado de envejecimiento y agotamiento celular, las estrategias terapéuticas más recientes buscan aislar células pTreg *naive* a partir de sangre de adultos o a partir de la sangre de niños o del cordón umbilical de neonatos (100). A pesar de que las Treg *naive* en niños suponen más del 50% de todas las células Treg, alcanzando incluso el 80% en niños menores de un año, esta población de células pTreg *naive* suponen menos del 5% del total de linfocitos (101-103). Este hecho, junto el bajo volumen de sangre periférica que se puede obtener de los niños (9, 104, 105) o del cordón umbilical (106), obliga a que, en ambos casos, las pTreg *naive*

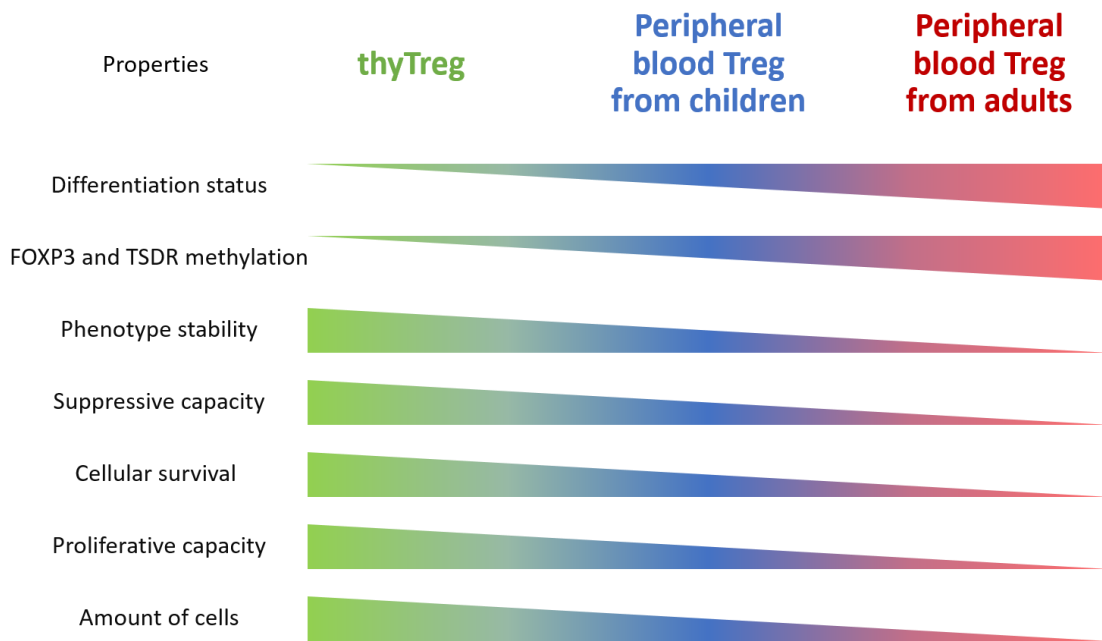
deban someterse a múltiples rondas de expansión para poder alcanzar el suficiente número de células para tratar un paciente (107). Por ejemplo, se tuvo que expandir una media de 27.000 veces unas pTreg de sangre de cordón umbilical para poder obtener una sola dosis terapéutica (106). Esta exhaustiva expansión empeora la calidad celular y reduce la eficiencia de su capacidad supresora, además de inducir un agotamiento celular mucho más acelerado (68, 106, 108). Por lo tanto, aunque estas pTreg presentaban al comienzo un fenotipo *naive* y un excelente rendimiento celular, se sigue sin superar completamente la necesidad de la expansión celular.

Para superar las limitaciones encontradas al trabajar con las pTreg envejecidas de sangre de adulto, o la escasa cantidad y la necesaria sobre-expansión de pTreg de sangre de niños o del cordón umbilical, ha sido esencial continuar con la búsqueda de fuentes alternativas de Treg con un fenotipo *naive*. Algunos estudios han centrado su búsqueda en la reprogramación de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés). Así, a partir de estas células, consiguen generar células Treg con un fenotipo estable y una alta funcionalidad que han demostrado en modelos *in vivo*, pero con las desventajas de que esta compleja aproximación requiere de mucho tiempo y solo generan Treg específicas de Ag, no policlonales (109, 110). Por otro lado, otros estudios se han centrado en la posibilidad de aislamiento de las células Treg *naive* a partir de su fuente primaria, el timo (77, 111).

#### **III.3.4 Nueva estrategia para la obtención y expansión de Treg proveniente de timo: las thyTreg.**

En nuestro laboratorio, se ha desarrollado un protocolo de obtención de Treg a partir de tejido tímico y de expansión *ex vivo* que da lugar a grandes cantidades de células que hemos denominado thyTreg. Estas células poseen unas propiedades de altísima pureza, fenotipo más inmaduro, altísima capacidad supresora y estabilidad fenotípica tras su expansión *in vitro* (112) (Ilustración 6). Estos resultados han permitido solventar las limitaciones del bajo número de células y elevado estado de agotamiento características de los abordajes terapéuticos anteriores, y han permitido iniciar un ensayo clínico (NCT04924491) en el que se están tratando con thyTreg autólogas a pacientes

pediátricos a los que se les ha realizado un trasplante cardiaco, con prometedores resultados.



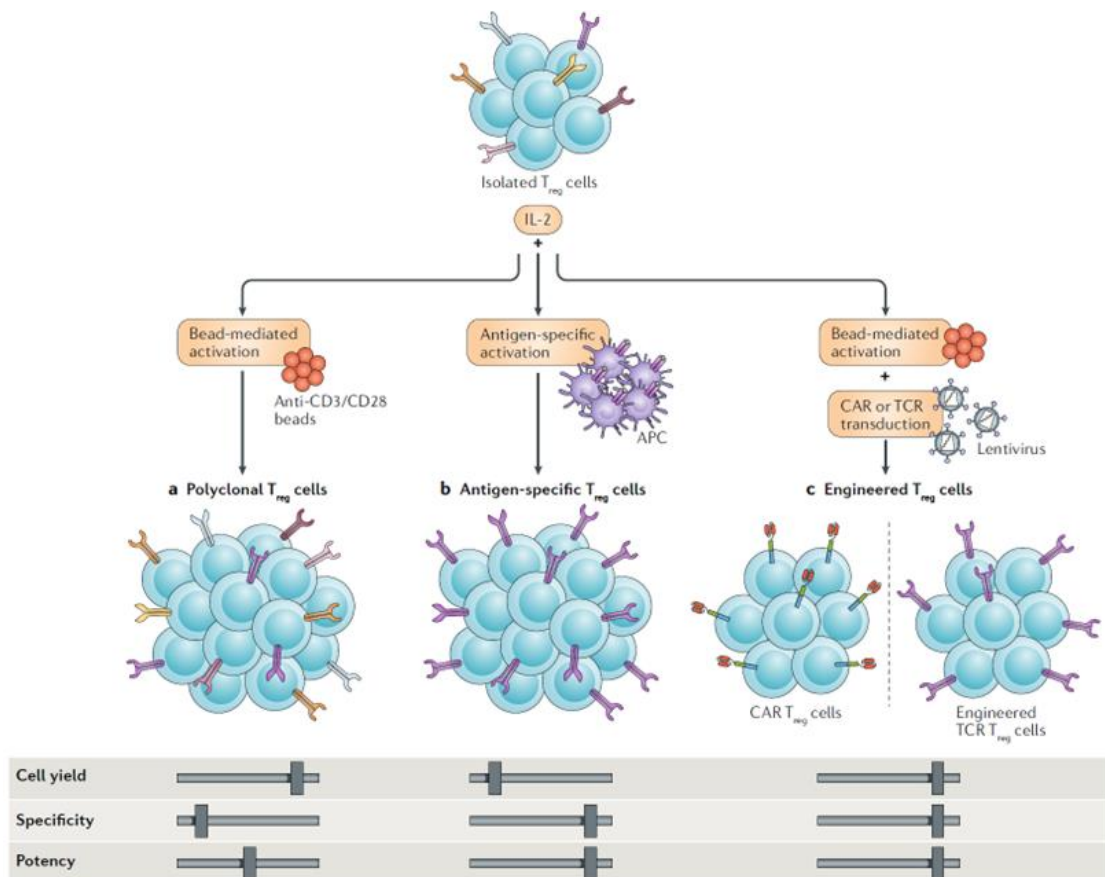
**Ilustración 6. Resumen de la calidad y propiedades de las células Treg atendiendo a su fenotipo y origen.** Las thyTreg muestran un estado más indiferenciado, un estado de metilación del *FOXP3* y el *TSDR* menor, y una mayor estabilidad fenotípica, capacidad supresora, supervivencia celular, capacidad proliferativa y cantidad de obtención de células, comparando con las Treg obtenidas de sangre de niños y adultos.

### III.4 Treg antígeno-específicas

La terapia con thyTreg policlonales tiene un alto potencial para conseguir resultados esperanzadores. Sin embargo, se ha demostrado que las pTreg antígeno-específicas son más eficaces que las pTreg policlonales (113-115). Para generar Treg específicas de un Ag, el método clásico ha consistido en poner en contacto APC que presentaran el Ag deseado a las pTreg de periferia (116). Debido a sus características, esta aproximación seguía teniendo la limitación de la necesidad de expansión de las Treg y de la limitada cantidad de APC que se pueden aislar (117), además de la complejidad técnica asociada (118) (Ilustración 7).

Otra aproximación ha sido la del empleo de la bioingeniería para conferir esa especificidad antigénica. Una de las técnicas de bioingeniería empleadas fue la introducción de un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en

inglés) en las Treg, con muy buenos resultados en cuando rendimiento celular, especificidad y potencial inmunosupresor (Ilustración 7). Hace más de una década que se realizaron los primeros estudios preclínicos con Treg-CAR en modelos animales de colitis o que habían recibido un xenotrasplante (119-121). Sin embargo, esta aproximación terapéutica comenzó a ganar mucha relevancia cuando se generaron pTreg-CAR específicas del HLA-A2, un Ag comúnmente mal emparejado en los trasplantes. Estas pTreg-CAR anti-HLA-A2 podían inducir una supresión específica hacia las células que expresaban ese Ag en un modelo de trasplante hematológico en ratón humanizado (122). Concretamente, estas Treg-CAR previnieron específica y exitosamente el desarrollo de la EICH causada por las células Tconv efectoras que expresaban el HLA-A2. Gracias a este estudio, numerosos grupos de investigación han validado posteriormente el potencial de las Treg-CAR específicas del HLA-A2 en modelos de rechazo de trasplante de piel (123-125), en modelos xenogénicos de hemofilia A desarrollada por auto-Ac frente el FVIII (126), o frente a la vimentina citrulinada, específica de la matriz extracelular de pacientes con artritis reumatoide (127).



**Ilustración 7. Diferentes aproximaciones dentro de la terapia celular adoptiva basada en Treg, sus características y propiedades (121).** A) Treg policlonales. B) Treg antígeno-específicas gracias a las APC. C) Treg antígeno-específicas gracias a la bioingeniería de un CAR o de un TCR recombinante.

### III.5 Receptores de Antígeno Quiméricos

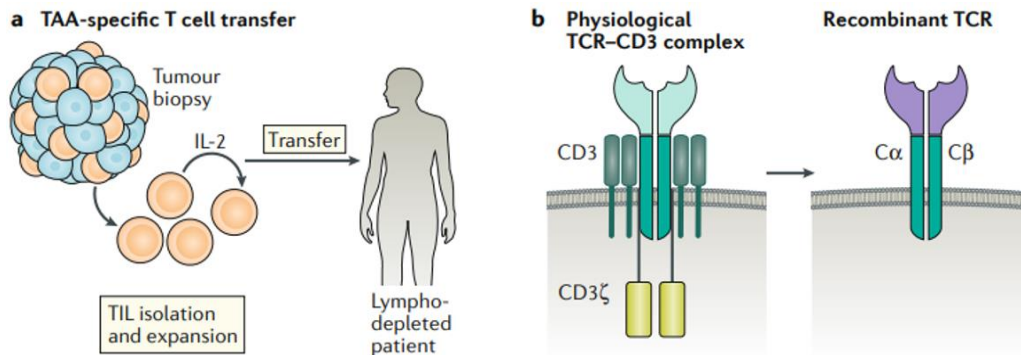
Las proteínas CAR son constructos sintéticos diseñados para conferir especificidad antigénica a los linfocitos T de una forma independiente a la vía clásica mediada por las MHC de las APC (128). Tras el reconocimiento de los antígenos diana, los CAR estimulan e inducen la funcionalidad de las células T que los portan (129).

#### III.5.1 Origen del CAR: necesidad de nuevos tratamientos frente al cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que un grupo de células del cuerpo proliferan descontroladamente y pueden tener la capacidad de migrar hacia otras partes del cuerpo. De forma normal, el SI es capaz de reconocer y eliminar dichas células tumorales. Sin embargo, la mayoría de los tipos de cáncer tienen en común que, para que puedan desarrollarse, deben ser capaces de escapar al control del SI (130). Se han descrito una multitud de mecanismos que generan un microambiente en el tumor que permite inhibir la respuesta inmunitaria frente a las células cancerosas, impidiendo su eliminación (131-133).

Los tratamientos clásicos, como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, han sido las aproximaciones más utilizadas para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, debido a gran cantidad de efectos secundarios dañinos para el paciente, junto con los escasos resultados positivos frente a algunos tipos de cánceres, se hizo imprescindible desarrollar nuevas estrategias. Una de estas nuevas estrategias se enfocó en estimular la respuesta inmune para superar ese microambiente tumoral desfavorable. Dentro de esta aproximación, se encuentra la vía terapéutica de la transferencia adoptiva de células T que, a su vez, engloba varias estrategias (121), como: I) Potenciar a los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) con la capacidad de reconocer los Ag tumorales (134) (Ilustración 8A); II) Bioingeniería del TCR fisiológico para crear un TCR

recombinante específico de los Ag tumorales (121) (Ilustración 8B) o II) Conferir antígeno-especificidad a los linfocitos T mediante las proteínas CAR (135).



**Ilustración 8. Estrategias de terapia de transferencia adoptiva de células T. (121).** A) Linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) son aislados a partir de una biopsia y expandidos *ex vivo* con IL-2. Posteriormente, son infundidos de nuevo en el paciente tras un tratamiento linfo-deplecionante. B) Bioingeniería del complejo TCR $\alpha\beta$ -CD3 fisiológico para crear un TCR con cadenas  $\alpha\beta$  recombinantes específicas de un Ag.

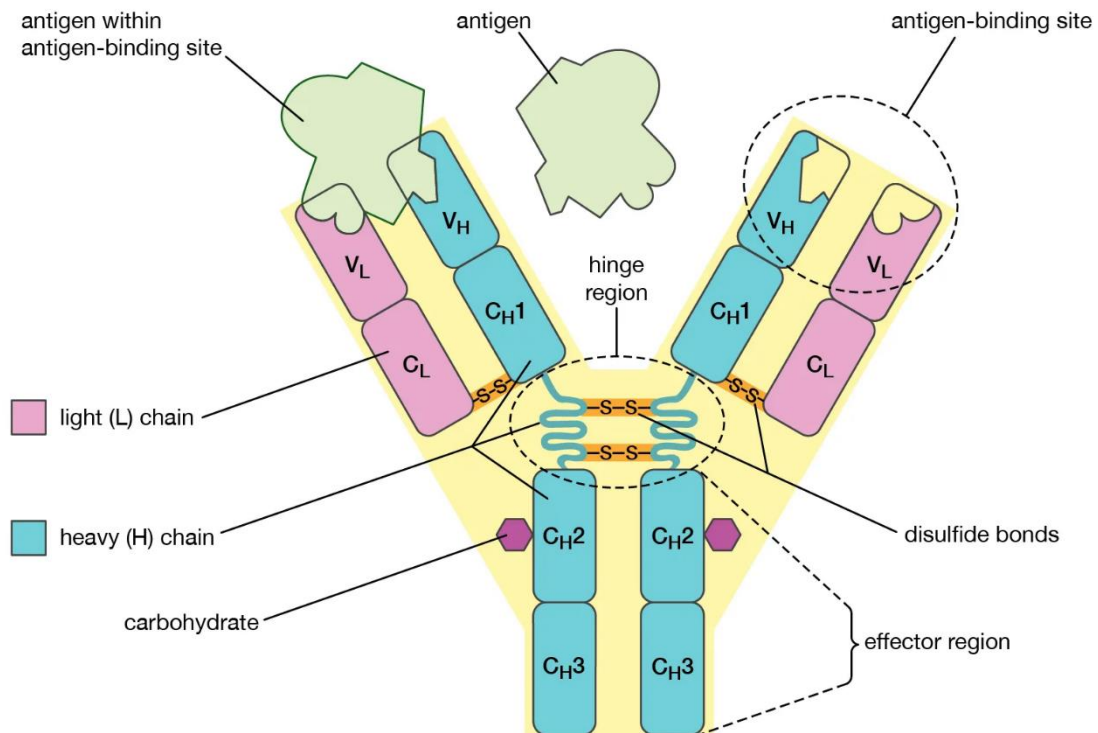
La modificación genética de linfocitos Tconv con CAR se ha utilizado principalmente para hacer frente a algunos tumores hematológicos. Por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), uno de los tumores hematológicos más frecuentes, se caracteriza por una proliferación excesiva de células hematopoyéticas CD19<sup>+</sup> anormales tanto en sangre como en médula ósea (136). Numerosos ensayos clínicos con células Tconv-CAR dirigidas frente al CD19 han conseguido tasas de remisión completa de hasta el 93%, tanto en niños como en adultos con esta enfermedad (137, 138). Por lo tanto, estos tratamientos han supuesto una revolución a nivel clínico como inicio de las terapias avanzadas personalizadas.

### III.5.2 Diseño y Estructura del CAR

El CAR es un constructo sintético formado por la combinación de un dominio extracelular derivado de un Ac y el dominio intracelular, con al menos una señal de activación del complejo TCR-CD3 (139), dando lugar a la siguiente estructura:

- **Dominio Extracelular:** Zona de reconocimiento antigénica procedente de un Ac monoclonal específico. Los Ac, únicamente producidos por los

linfocitos B, son una familia de proteínas glicosiladas con la capacidad de reconocer epítomos (regiones concretas) de Ag. Los Ac están formados por cuatro cadenas de proteínas: dos ligeras ( $V_L$ ) y dos pesadas ( $V_H$ ). La combinación de los extremos N de las cadenas  $V_L$  y  $V_H$  constituye la fracción variable de unión a los Ag (Fab, por sus siglas en inglés), y contiene en su interior el dominio de unión antigénica. Esta región de los Ac reconoce a los Ag de una forma muy afín y específica (140) (Ilustración 9).



**Ilustración 9: Estructura de un Ac.** Los Ac están compuestos por dos cadenas ligeras ( $V_L$ , rosa) y dos cadenas pesadas ( $V_H$ , azul). Las regiones variables de las  $V_H$  y  $V_L$  conforman la fracción variable de unión a los Ag (Fab), con la zona de unión del Ag (*antigen-binding site*).

El dominio extracelular de un CAR es el resultado de la unión de una  $V_L$  y de una  $V_H$  de un Ac, dando lugar al fragmento variable de cadena única (ScFv, por sus siglas en inglés). Las  $V_H$  y  $V_L$  del ScFv de un CAR se mantienen unidas gracias a una secuencia comunicante de 15-20 aminoácidos (normalmente residuos de glicina-serina), que reduce el riesgo de interferencia y aumenta la flexibilidad del ScFv para facilitar el reconocimiento antigénico (141) (Ilustración 10). Como esta región extracelular proviene de la Fab de un Ac, mantiene la afinidad y la especificidad originales a un Ag (142).

- **Secuencia Espaciadora, Bisagra o Hinge:** Región que conecta el dominio extracelular ScFv con la región transmembrana (Ilustración 10). Normalmente, esta secuencia suele estar derivada de la proteína CD28, de la cadena  $\alpha$  del CD8 o de un Ac. La longitud de la secuencia espaciadora puede afectar a la activación de las células portadoras. Algunos autores mencionan que, a menor longitud de esa secuencia, menos inmunogénica es la estructura CAR y mayor es la activación que induce en las células T. Por el contrario, una mayor distancia de esta secuencia proporciona una mayor facilidad de reconocimiento de Ag diana menos accesibles (143-145).

- **Dominio Transmembrana:** Dominio en forma de hélice alfa embebida en la membrana celular que conecta la región espaciadora con los dominios intracelulares (Ilustración 10). Su principal función es el correcto anclaje de la proteína CAR a la membrana. Suelen ser secuencias derivadas del CD4, del CD28, de la cadena  $\zeta$  del CD3 o de la cadena  $\alpha$  del CD8 (146).

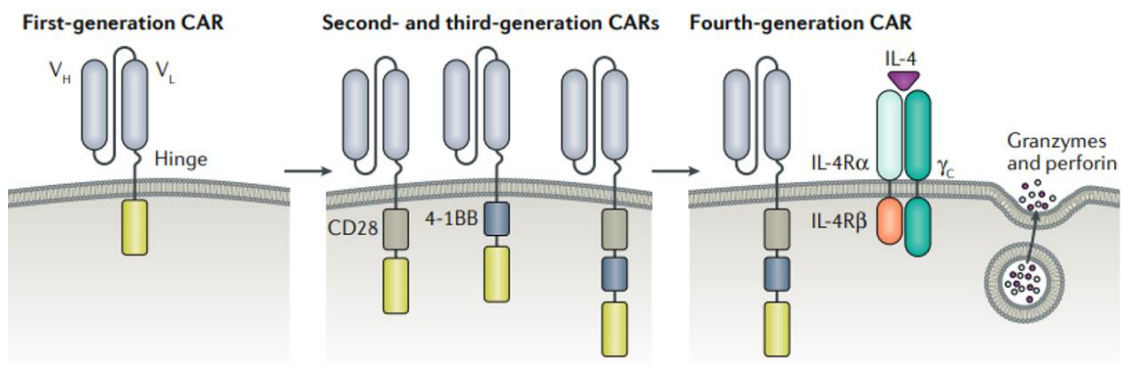
- **Dominio Intracelular:** Región que proporciona las señales necesarias para la activación de la célula T portadora del CAR. En función de los componentes de este dominio intracelular, se diferencian las generaciones de los CAR (Ilustración 10):

- CAR de 1ª generación: Estructura de CAR cuyo dominio intracelular está compuesto únicamente por la cadena  $\zeta$  del CD3 (principalmente) o por la cadena  $\gamma$  del receptor de alta afinidad de un Ac (135). Gracias al hecho de que la cadena  $\zeta$  del CD3 contenga en su estructura 3 motivos activadores basados en el receptor de tirosina (ITAMs, por sus siglas en inglés), es capaz de estimular a la célula T sin la combinación de otros componentes fisiológicos del complejo TCR-CD3 u otros co-estimuladores. Sin embargo, esta activación es aberrante y causa un rápido agotamiento de las células y, por tanto, una limitada eficacia celular (147).

- CAR de 2ª generación: Estructura de CAR cuyo dominio intracelular está compuesto por la cadena  $\zeta$  del CD3 y por un dominio co-estimulador. Se descubrió que para una activación fisiológica de la célula T, el complejo TCR-CD3 debía incorporar una señal de co-estímulo como segunda señal de activación, normalmente mediada por las APC. Para simular

esta activación fisiológica, los CAR de 2ª generación incorporaron un dominio de co-estimulación provenientes de las proteínas CD28, 4-1BB, CD27, OX40 o ICOS (148). Estos CAR de 2ª generación han mostrado una mayor capacidad de activación e inducción de la proliferación de la célula que lo portan, así como una mayor persistencia *in vivo*, reduciendo el agotamiento de las células comparado con sus predecesores de la 1ª generación. Sin embargo, el tipo de dominio co-estimulador escogido, junto con su posición dentro del constructo CAR, puede afectar a la activación y proliferación de las células que lo portan (149).

- CAR de 3ª generación: Estructura de CAR cuyo dominio intracelular está compuesto por la cadena  $\zeta$  del CD3 y por dos dominios co-estimuladores. Estos constructos inducen una mayor tasa de proliferación y mayor supervivencia a largo plazo *in vivo*, así como menor agotamiento celular que los CAR de 2ª generación (149).
- CAR de 4ª generación: CAR de tercera generación cuyo dominio intracelular, además de tener la cadena  $\zeta$  del CD3 y dos dominios de co-estimulación, contiene un elemento adicional que aumenta el potencial del CAR en la célula T que lo porta. Estos elementos adicionales pueden servir para controlar el “encendido-apagado” del CAR, pueden ser genes suicidas, moléculas que aumenten la funcionalidad de la célula T o que minimicen su senescencia (150-152).



**Ilustración 10. Bioingeniería de una célula T con CAR y las diferentes generaciones de los CAR.** (121). Un constructo CAR está compuesto por una región extracelular ScFv (regiones  $V_L$  y  $V_H$ , de un Ac unidas por la secuencia comunicante), el dominio bisagra o *Hinge*, la región transmembrana y el dominio de estimulación  $\zeta$  del CD3. La segunda generación de CAR combina CD3- $\zeta$  y un dominio de co-estimulación. La tercera generación de CAR combina CD3- $\zeta$  y dos dominios de co-estimulación. La cuarta generación de CAR añade, además de los dominios de co-estimulación, un elemento adicional que aumente el rendimiento o supervivencia del CAR o de la célula que lo porta, como, por ejemplo, la síntesis y liberación de granzimas y perforinas; o el dominio IL-4R  $\alpha\beta$ , que activa a la célula tras el reconocimiento de la IL-4, muy presente en el microambiente tumoral.

### III.5.3 Limitaciones de los CAR convencionales

Debido a la alta eficacia de activación de las células Tconv con CAR ante las células tumorales, la principal limitación de esta terapia para los pacientes oncológicos se debe al riesgo de citotoxicidad celular, como: **I) Toxicidad debida al efecto directo** de las Tconv-CAR sobre el Ag y la célula diana, pero con consecuentes eventos adversos para el paciente, como la tormenta de liberación de citoquinas (gran activación de las células T mediada por el CAR que desencadena una liberación descontrolada de citoquinas pro-inflamatorias asociada con neurotoxicidad o, incluso, con fallo multiorgánico) (153, 154). **II) Síndrome de lisis tumoral**, en el que una excesiva muerte de las células tumorales altera la homeostasis tisular, induciendo una respuesta inmune exacerbada y pudiendo llegar a la muerte del paciente (155). **III) Toxicidad debida al efecto directo** de las Tconv-CAR sobre el Ag, pero no sobre la célula adecuada, ya que muchos Ag pueden no estar presentes sólo en las células tumorales. Por ejemplo, un CAR  $\alpha$ -CD19 reconoce la proteína CD19 en linfocitos B tumorales, pero esta proteína también es expresada en el resto de los linfocitos B no patológicos, pudiendo llegar a originar una depleción de todas las células B CD19<sup>+</sup> (156). **IV) Toxicidad fuera de la diana** debido a un efecto indirecto de las Tconv-CAR sobre otros Ag y otras células no deseadas, atacando a otras células o tejidos (157). **V) Inmunogenicidad** causada porque la mayoría de las regiones ScFv de un CAR derivan de Ac desarrollados en ratón, pudiéndose desencadenar una respuesta inmune frente a las células Tconv-CAR (158). **VI) Genotoxicidad** debido al uso de vectores virales para una integración estable de la secuencia del constructo

CAR en el genoma atañe riesgos. A pesar de utilizar vectores virales deficientes en la replicación, debido a que la inserción de la secuencia del CAR en el genoma de la célula es aleatoria, esta se puede integrar en regiones donde puedan despertar genes potencialmente oncogénicos o alterar genes relevantes (153).

Otra limitación de las Tconv-CAR convencionales ocurre cuando se enfrentan a células tumorales con una baja o nula expresión del Ag. En este contexto, debido a la falta de reconocimiento, las Tconv-CAR no pueden eliminar a las células tumorales y así, por presión selectiva, esos clones tumorales pueden seguir creciendo y originar una recaída de la enfermedad (159). Para superar estas limitaciones, habría que generar nuevos CAR específicos de otros Ag diana del tumor, y procurando desencadenar la menor citotoxicidad posible, lo que suele llevar muchos años.

#### III.5.4 Nuevos tipos de CAR

Para superar algunas de las limitaciones previamente descritas, mantenido la alta eficacia de las terapias basadas en células Tconv-CAR, se han diseñado numerosas aproximaciones diferentes. Las más conocidas o relevantes se reflejan a continuación:

a) **CAR con genes suicidas HSV-tk/GCV.** La propia estructura del CAR contiene en su interior un gen que, llegado el momento adecuado, induce apoptosis en la célula que lo porta para evitar una sobre-activación, y su consecuente toxicidad. Un ejemplo es el gen de la quinasa de timidina del Virus Herpes Simple (HSV-tk, por sus siglas en inglés). Así, si se administra ganciclovir (GCV) a un paciente con Tconv-CAR que contengan la HSV-tk, esta proteína genera un compuesto tóxico que polimeriza el ácido desoxirribonucleico (ADN) e induce la muerte celular (160) (Ilustración 11A).

b) **CAR con genes suicidas caspasa 9 (Casp9).** La estimulación del CAR activa, en paralelo, la expresión de la Casp9, induciendo la muerte celular (161, 162). Este sistema ha mostrado buenos resultados en ensayos clínicos en el contexto del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas ya que, gracias a estos genes suicidas, se puede evitar la EICH, enfermedad muy asociada a esos trasplantes (163) (Ilustración 11B).

c) **Anticuerpos inductores de muerte celular.** Como otras muchas células, las Tconv-CAR también pueden ser eliminadas por Ac monoclonales. Para evitar la eliminación de otras células, estos Ac monoclonales deben estar dirigidos frente a las secuencias de cualquier dominio extracelular del CAR, causando su depleción, como se ha visto en modelos animales (164) (Ilustración 11C).

d) **CAR duales.** Usan la estrategia de doble diana, que consiste en combinar dos CAR diferentes que solo inducen una señal de activación completa y adecuada cuando actúan en combinación. Esta compartimentación de las señales de estimulación y co-estimulación ha mostrado tener una muy buena eficacia frente a células tumorales *in vitro* (165) (Ilustración 11D).

e) **CAR en Tándem.** Están basados en una estructura de CAR completa combinada con un segundo dominio ScFv. De esta forma, solo se desarrolla una respuesta ante células que expresan los dos Ag de forma simultánea, reduciendo la toxicidad en la diana fuera del tumor (166) (Ilustración 11E).

f) **Receptores CAR + Notch sintéticos.** Para que la célula pueda ejercer su función, un Ag debe unirse a una primera proteína, un receptor Notch sintético (SynNotch). Mediante un mecanismo de proteólisis de la región intracelular, estos receptores liberan un factor de transcripción que genera otro tipo de CAR. Este nuevo CAR llegará a la membrana, donde reconocerá a otro Ag de interés (167) (Ilustración 11F). Actualmente, esta aproximación se está probando en modelos *in vivo*.

g) **CAR inhibidores.** CAR diseñados con dominios inhibidores de receptores celulares, como el PD-1 o el CTLA-4, sobre-expresados en la mayoría de los tumores. Así, la célula portadora del CAR no se inhibe ante esas proteínas, tal y como se ha demostrado en estudios *in vitro* (168) (Ilustración 11G).

h) **CAR biespecíficos mediados por un intermediario:** Estrategia en la que el CAR necesita de pequeñas moléculas que actúan como intermediarios extracelulares para reconocer el Ag diana deseado, ya que el CAR solo reconoce algún elemento de ese intermediario. Un ejemplo son los CAR anti-isotiocianato de fluoresceína ( $\alpha$ -FITC) que, junto con un Ac que porte esa

molécula FITC, reclutará y activará a las células T para que ejerzan su actividad (169) (Ilustración 11H).

i) **CAR encendido-apagado:** Estrategia “On/Off” utilizada para poder controlar la activación de las células CAR-T, se caracteriza por la necesidad de pequeñas moléculas que intermedien entre los elementos necesarios para que se produzca la activación. De esta forma, eliminando, o no aportando esas moléculas, el CAR se desactiva, reduciendo la estimulación a la célula que lo porta y limitando la posible toxicidad asociada (170) (Ilustración 11I).

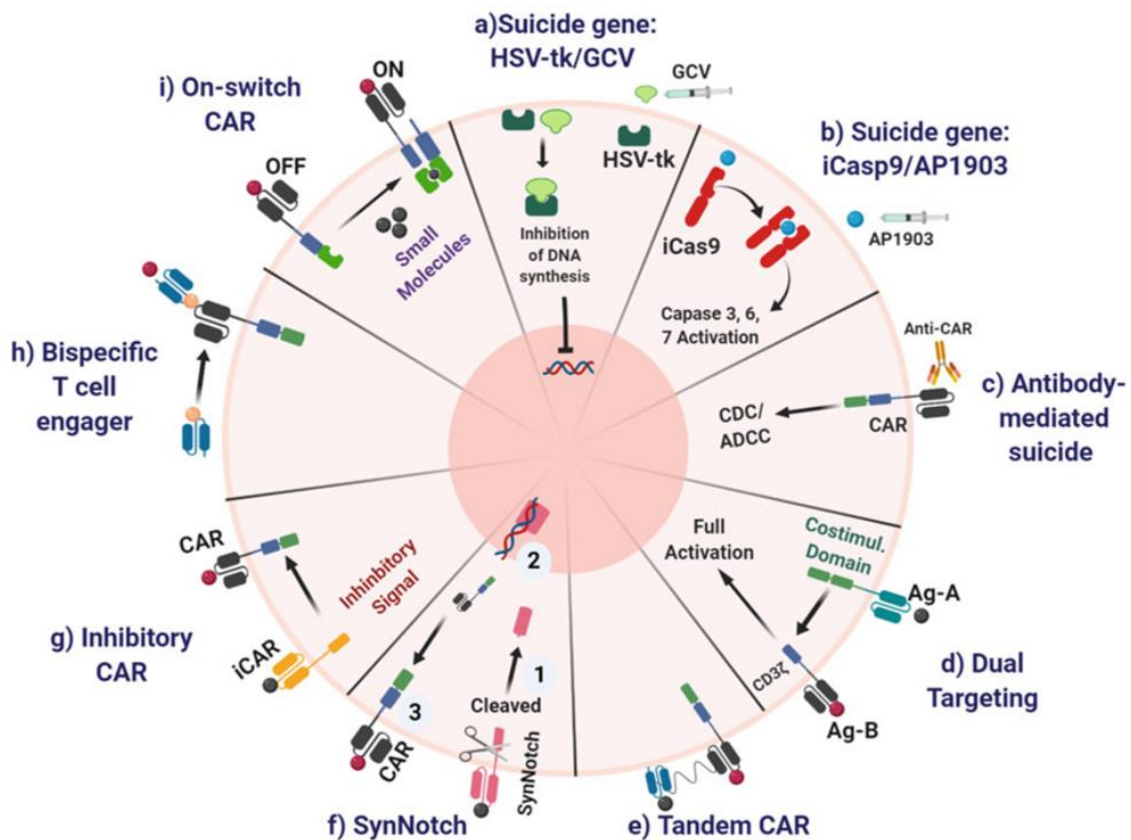


Ilustración 11. Nuevas estrategias terapéuticas en el uso, estructura o funcionalidad de los CAR para superar las limitaciones de los CAR convencionales. (128).

### III.5.5 mSA2-Universal CAR

Como ha sido comentado anteriormente, una de las limitaciones de los CAR es que la especificidad frente a un Ag y, por tanto, la escalabilidad de las células CAR-T, se limita solo a un Ag en los CAR clásicos, o a dos, en los CAR biespecíficos. Debido a su potencial versatilidad, en el presente estudio nos hemos enfocado en el uso de los CAR que necesitan de un intermediario para reconocer el Ag deseado (Ilustración 11H).

Como ya fue comentado, esta aproximación de CAR + intermediario tiene como principal ventaja que un solo constructo CAR amplía enormemente el rango terapéutico de esta tecnología, ya que, cambiando únicamente el intermediario, se reconocería otro Ag diana, lo que disminuiría los costes de tratamiento y aumentaría su escalabilidad a los pacientes (171). Debido a estas características, también se les han denominado CAR Universales o UniCAR. Además, permite superar otras limitaciones relacionadas con la toxicidad derivadas de los CAR convencionales, pues al necesitar de un intermediario para reconocer su diana, es posible modular la activación y la función celular mediada por el CAR, simplemente variando la disponibilidad del intermediario. (172). Actualmente, ya se están testando varios tipos diferentes de UniCAR en ensayos clínicos en humanos, como el UCART123 (código de ensayo clínico: NCT03190278), frente a la leucemia mieloide aguda, o los UCART22, UCARTCS1, UCART19, cada uno con diferentes intermediarios, pero todos dirigidos frente a neoplasias hematológicas. Incluso, se están testando frente a tumores de órgano sólido (NCT04633148).

Bajo el termino UniCAR, además del uso de un UniCAR  $\alpha$ -FITC y Ac con este fluorocromo como intermediarios, descritos anteriormente, se han desarrollado muchas estrategias diferentes (173-175). Por ejemplo, los denominados SUPRA CAR tienen en su dominio extracelular un adaptador en cremallera de leucina (zipCAR, por sus siglas en inglés). Este adaptador reconoce específicamente otro adaptador homólogo presente en el intermediario (zipFv) que reconocerá a los Ag diana (176). Otra estrategia es la que usan como intermediarios péptidos cortos de 10 aminoácidos, no inmunogénicos, unidos a un módulo reconocedor de Ag derivado de un Ac monoclonal humano (172).

Otra de las aproximaciones más prometedoras es el UniCAR basado en la interacción entre la biotina y las proteínas de unión a la biotina (171). Una de las principales proteínas de unión a la biotina es la avidina. En la naturaleza, la avidina es una glicoproteína tetramérica con pH básico, formada por cuatro subunidades idénticas y con una altísima especificidad y afinidad por la biotina (177). Debido a que esta proteína tetramérica ha demostrado una cierta

inmunogenicidad asociada, se diseñaron UniCAR con avidinas diméricas y monoméricas para limitar esta inmunogenicidad. El UniCAR basado en la avidina dimérica, utilizando como intermediarios Ac biotinilados, mostró muy buenos resultados tanto *in vitro* como *in vivo* (178). Sin embargo, la glicosilación de la avidina y su pH básico hace que este UniCAR desarrolle un alto grado de uniones inespecíficas *in vivo* (171). Por este motivo, se probaron otros análogos de la avidina.

La estreptavidina, derivada de la bacteria *Streptomyces avidinii*, es un análogo tetramérico de la avidina no glicosilado y con un pH ligeramente ácido. Debido a estas diferencias fisicoquímicas, la estreptavidina ha demostrado mejores resultados *in vivo* que la avidina (177). Además, Lohmueller *et al.*, desarrollaron un UniCAR cuyo dominio extracelular es una estreptavidina monomérica (UniCAR-mSA2) (179). Este UniCAR-mSA2 supera las limitaciones encontradas en los UniCAR basados en la avidina y, además, ha mostrado tener más afinidad por la biotina que las avidinas monoméricas y diméricas (180).

En la actualidad, existe un gran interés para encontrar una estructura CAR que sea válida para varios tipos celulares (células T, NK o Treg) y que, a la vez, tenga la habilidad de ser flexible en la selección de los Ag diana. En este contexto, las ventajas de los UniCAR suponen no solo ser una estructura modulable y con la posibilidad de ser usada frente a prácticamente cualquier tipo de diana, sino que también se puede limitar la toxicidad celular que generen (añadiendo o dejando de añadir el intermediario) y hacer frente a la posible desaparición de la diana principal, cambiando simplemente de intermediario.



# IV. Hipótesis y Objetivos



## IV.1 Hipótesis

Las hipótesis que se plantearon para los proyectos de esta Tesis doctoral fueron los siguientes:

- Las células CD25<sup>+</sup> precursoras de las Treg suponen cerca del 1% del total de células comprendidas en un timo. El gran porcentaje de timocitos humanos restantes, pertenecientes a la fracción CD25 negativa (CD25<sup>neg</sup>), podrían ser inducidos *in vitro* hacia células thyTreg funcionales mediante las citoquinas IL-2 y TGF- $\beta$ 1, o mediante la expresión ectópica del factor de transcripción FOXP3, estrategias que fueron eficaces para generar iTreg desde Tconv de sangre periférica.

- La bioingeniería de las thyTreg para que expresen el UniCAR-mSA2 supondría la combinación del gran potencial supresor de las células thyTreg con las ventajas de este constructo modulable. Esta nueva aproximación innovadora estaría basada en el uso de las células thyTreg-UniCAR como elemento que permitiera restaurar específica y eficazmente la tolerancia y homeóstasis inmunológica en múltiples enfermedades autoinmunes, evitar el rechazo de trasplantes o inhibir la EICH.

## IV.2 Objetivos

Los objetivos principales de esta tesis doctoral han sido estudiar si los timocitos podrían suponer una posible vía de generación alternativa para inducir células con idénticas propiedades a las thyTreg; y modificar genéticamente células thyTreg con la tecnología UniCAR-mSA2 para incrementar su potencial terapéutico dotándolas de especificidad antigénica. Para conseguir estos objetivos principales, se establecieron los siguientes objetivos secundarios:

- 1) Inducir thyTreg con gran capacidad supresora y una alta estabilidad fenotípica a partir de los timocitos CD25<sup>neg</sup> mediante la activación celular, las citoquinas TGF- $\beta$ 1 e IL-2 y la expresión ectópica del FOXP3.
- 2) Diseñar varios constructos UniCAR funcionales que contengan la secuencia mSA2 y las secuencias de activación y de co-estimulación adecuadas para las thyTreg y testar su funcionalidad en células de línea y células primarias.
- 3) Transducir eficazmente las células thyTreg con los constructos desarrollados y analizar posibles alteraciones en el fenotipo de las thyTreg-UniCAR comparándolas con thyTreg no modificadas. Además, estudiar la especificidad de la activación celular de las thyTreg mediada por los constructos UniCAR.
- 4) Estudiar cómo afectan los constructos UniCAR a la función supresora de las células thyTreg-UniCAR modificadas genéticamente y, así, poder elegir el constructo con los dominios de estimulación y co-estimulación más óptimos para incrementar la funcionalidad de las thyTreg.

# V. Materiales y métodos



## V.1 Plásmidos y vectores lentivirales

### V.1.1 Plásmido pMSCV-FOXP3 y creación del pMSCV-ΔFOXP3

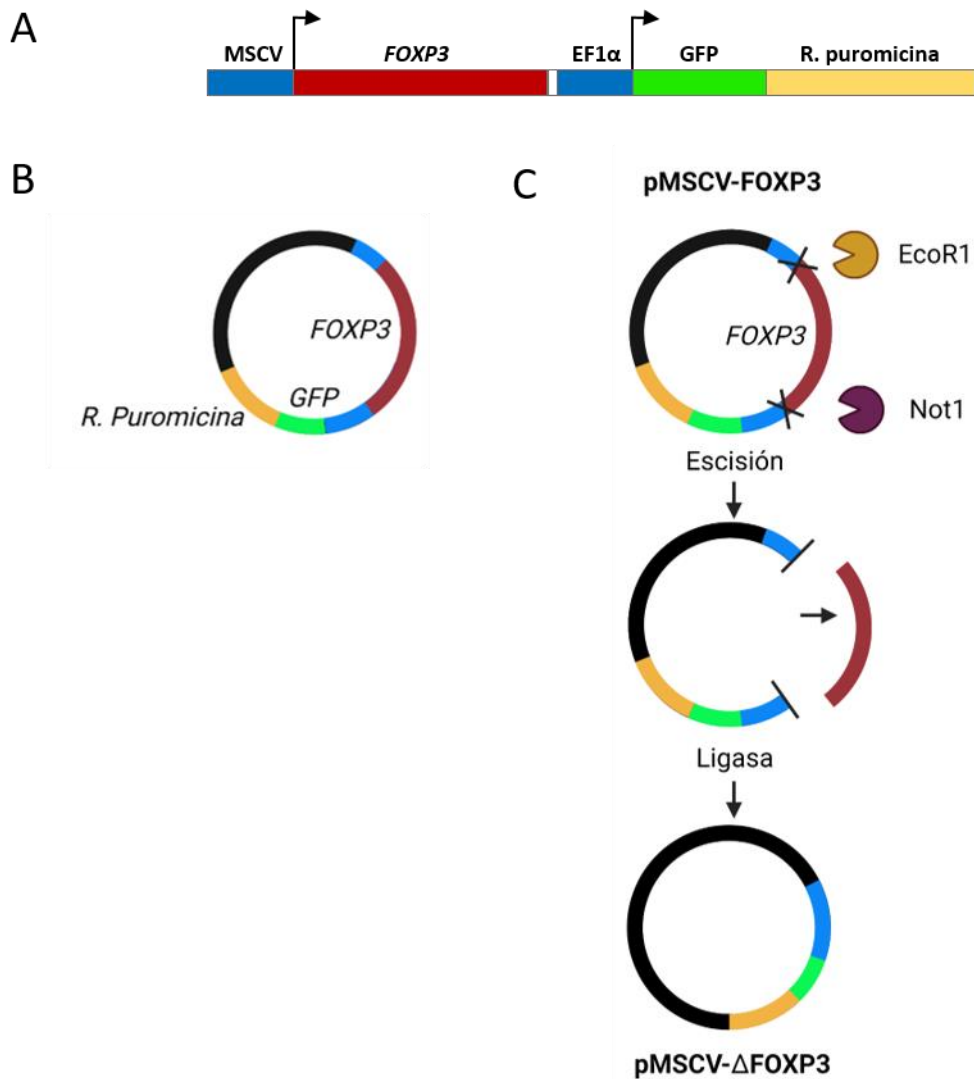
El plásmido pMSCV-FOXP3-EF1-GFP-T2A-Puro (denominado como pMSCV-FOXP3, SBI System Biosciences, Palo Alto, CA, Estados Unidos-EEUU) contiene en su estructura toda la secuencia del gen *FOXP3* humano. Esta región es iniciada por el promotor del virus de células madre murinas (*MSCV*, por sus siglas en inglés).

El plásmido también codifica la proteína verde fluorescente (*GFP*, por sus siglas en inglés), que sirve como marcador de las células transducidas, y el gen de resistencia a la puromicina. Ambas regiones están unidas gracias al péptido co-transductor T2A (Figura 1A y B). Este péptido T2A, procedente del virus *Thosea asigna*, permite la auto-escisión de las proteínas resultantes de las regiones de ADN colindantes en el plásmido. Gracias a este T2A, las secuencias del *FOXP3* y de la *GFP* dan lugar a dos proteínas separadas, a pesar de encontrarse en el mismo marco de lectura. Todo ello iniciado por el promotor Factor 1 de elongación alfa (*EF1α*, por sus siglas en inglés).

El pMSCV-FOXP3 será utilizado para modificar genéticamente a las células deseadas mediante un sistema de transducción por vectores lentivirales. Para permitir la modificación genética, el constructo plasmídico cuenta con las secuencias de “repetición terminal larga” (*LTR*, por sus siglas en inglés) 5' y 3'. Estas secuencias, alteradas para evitar la replicación de los retrovirus de los que provienen, son las que permiten la integración en el genoma de la célula transducida, modificando de forma permanente dicha célula a nivel genético, así como todas las células resultantes tras su proliferación, para que expresen el *FOXP3* y la *GFP*.

A partir de este pMSCV-FOXP3 se generó el plásmido que se utilizó como control. Para ello, se deletionó la secuencia *FOXP3* usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* siguiendo las indicaciones de uso del fabricante (New England Biolabs, NEB, Ipswich, MA, EEUU) sobre la secuencia original. Las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* cortaron el plásmido en el principio y el fin del gen *FOXP3*, respectivamente. Tras la digestión enzimática, se volvió a

circularizar el plásmido sin la secuencia *FOXP3*, gracias a la ligasa *T4 DNA Ligase* (NEB) según las indicaciones del fabricante, uniendo los extremos del plásmido, dando lugar al nuevo constructo, denominado pMSCV- $\Delta$ FOXP3 (Figura 1C). Se verificó la delección del gen mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y secuenciación Sanger (realizado en la Unidad de Genómica del H.G.U. Gregorio Marañón), con cebadores que flanqueaban la región delecionada.



**Figura 1. Esquema del plásmido pMSCV-FOXP3 y la creación del vector pMSCV-ΔFOXP3 mediante enzimas de restricción.** (A) Diseño del constructo de expresión lentiviral basado en los promotores *MSCV* y *EF1α*; y que codifica las proteínas FOXP3, GFP y la enzima que confiere resistencia a la puromicina. (B) Representación del plásmido pMSCV-FOXP3. (C) Gracias a las enzimas de restricción utilizadas (*EcoR1* y *Not1*), se eliminó el gen *FOXP3* (rojo) dentro de la región que se inserta dentro del genoma de las células transducidas (azul, verde y amarillo). Se utilizó una ligasa para restaurar la estructura circular del plásmido. Figura creada con BioRender.

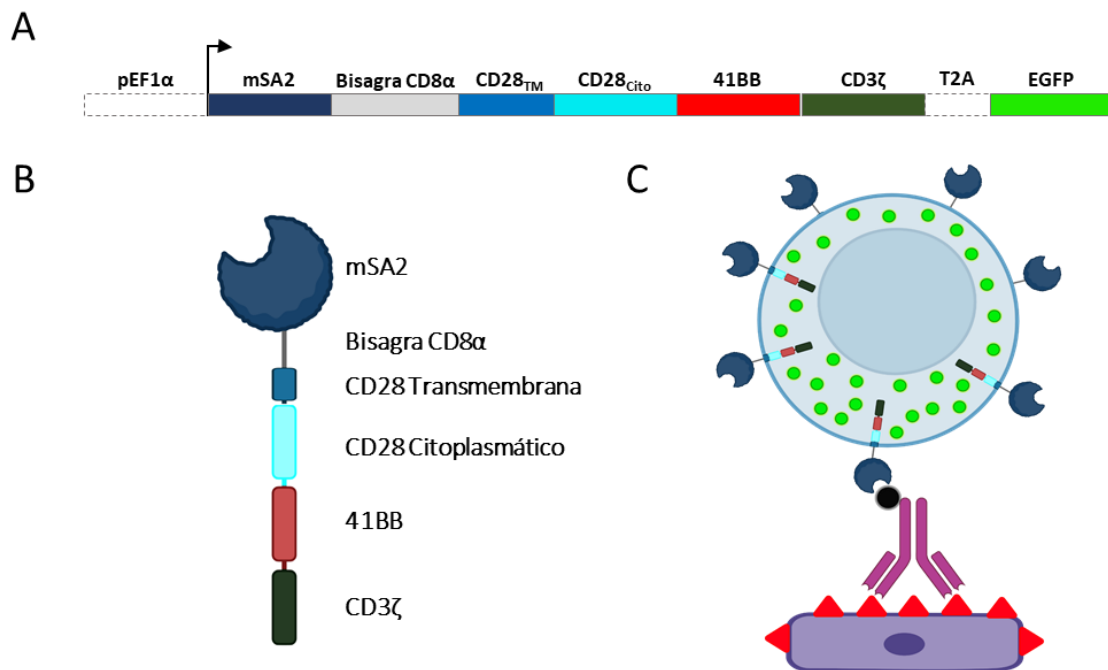
### V.1.2 Constructo UniCAR de 3ª generación

El plásmido pLenti-EF1α-mSA2-CAR-EGFP (denominado pUniCAR; diseñado por nuestro grupo y generado por Creative Biolabs, Shirley, Nueva York, EEUU) contiene la secuencia de la proteína UniCAR de tercera generación, cuya estructura está compuesta por varias regiones (Figura 2A y B): I) a nivel extracelular, la mSA2 (179) y una bisagra espaciadora procedente de la cadena CD8α; II) una región transmembrana perteneciente a la proteína CD28; y III) una estructura intracelular formada por los dominios de co-estimulación CD28 y 4-1BB citoplasmáticos, junto con el dominio de estimulación CD3ζ citoplasmático. A su vez, el plásmido también codifica la variante mejorada de la GFP (EGFP, por sus siglas en inglés) que sirve como marcador de las células transducidas. Todo ello iniciado por el promotor *EF1α* y unido gracias al péptido co-transductor T2A (Figura 2A y B). Gracias a este T2A, las secuencias del UniCAR y de la EGFP dan lugar a dos proteínas separadas, a pesar de encontrarse en el mismo marco de lectura.

El pUniCAR será utilizado para modificar genéticamente a las células deseadas mediante un sistema de transducción por vectores lentivirales. Para permitir la modificación genética, este constructo plasmídico cuenta con las secuencias *LTR* truncadas 5' y 3', permitiendo que se integren de forma permanente en el genoma de la célula transducida las anteriores secuencias descritas, modificando genéticamente dicha célula, y todas las resultantes tras su proliferación, para que expresen permanentemente el UniCAR y la EGFP.

Para que la célula portadora del UniCAR pueda ejercer su función sobre la célula diana, el UniCAR necesita un intermediario biotinilado que reconozca el Ag diana, por ejemplo, un Ac monoclonal biotinilado (179). De esta forma,

se produce una cascada de reconocimiento entre el Ag deseado y el Ac biotinilado, y entre la biotina del Ac y la mSA2 del UniCAR (Figura 2C).



**Figura 2. Esquemas del diseño del vector, del UniCAR y de su sistema de reconocimiento.** (A) Diseño del constructo de expresión lentiviral que codifica la proteína UniCAR de tercera generación y EGFP. (B) Representación de los elementos extracelulares, transmembrana e intracelulares que componen al UniCAR de tercera generación. (C) Representación de una célula que expresa la EGFP (puntos verdes) y el UniCAR; y que es capaz de reconocer y unirse a un intermediario biotinilado, como un Ac monoclonal biotinilado. Al mismo tiempo, el intermediario biotinilado encuentra y reconoce el Ag específico deseado para que la célula pueda ejercer su función sobre la célula diana. Figura creada con BioRender.

### V.1.3 Mutagénesis del UniCAR

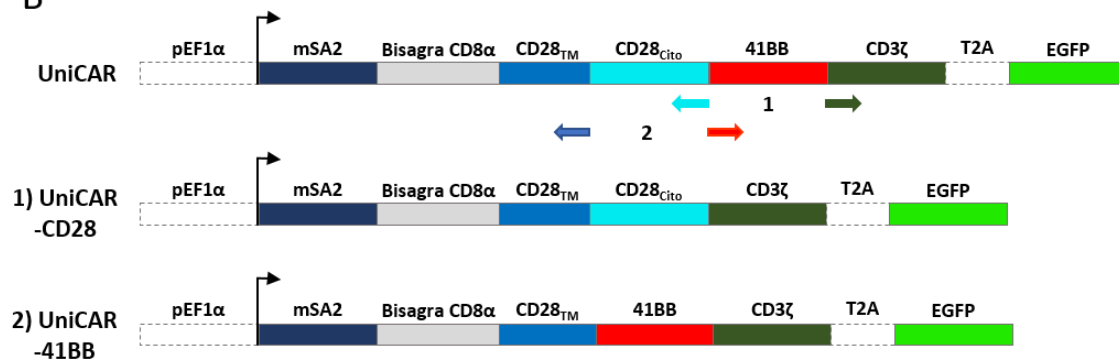
Boroughs et al., describieron que la capacidad supresora de las células Treg podía verse afectada en constructos CAR cuyo dominio co-estimulador fuera el 4-1BB (181). Debido a que nuestro UniCAR de 3<sup>a</sup> generación también contenía este dominio en su estructura, y que nuestro objetivo final era modificar genéticamente thyTreg, cuya funcionalidad podía verse afectada por el 4-1BB, se decidió crear dos nuevos UniCAR de segunda generación. Para ello, a partir del UniCAR de 3<sup>a</sup> generación, el dominio 4-1BB y el dominio CD28 citoplasmático fueron deletados, dando lugar a los constructos UniCARCD28 y UniCAR41BB, respectivamente.

Para la formación de cada nuevo plásmido pUniCAR de segunda generación (pUniCARCD28 y pUniCAR41BB), se usaron dos cebadores (Eurogentec S.A. Seraing, Bélgica) que flanqueaban estrictamente la región que se deseaba delecionar del plásmido pUniCAR original con el UniCAR de tercera generación (Figura 3A y B). Utilizando los cebadores, se realizaron sendas PCR a las que se le aumentó el tiempo de elongación para que el amplicón abarcara toda la región plasmídica que se deseaba mantener, es decir, todo el plásmido excepto la región del dominio de co-estimulación a delecionar. Para estas PCR especiales se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Q5 (NEB), basado en la enzima polimerasa de alta fidelidad Q5. Siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante, para delecionar la secuencia CD28 citoplasmática se realizó una PCR con la pareja de cebadores correspondientes con un tiempo y una temperatura de alineamiento de 30 segundos a 62,5 °C, respectivamente; y un tiempo y una temperatura de elongación de 4 minutos y 30 segundos a 72 °C, respectivamente, durante 25 ciclos. Para delecionar la secuencia 4-1BB, se realizó una PCR con la pareja de cebadores correspondientes con un tiempo y una temperatura de alineamiento de 30 segundos a 68 °C, respectivamente; y un tiempo y una temperatura de elongación de 4 minutos a 72 °C, respectivamente, durante 25 ciclos. Por último, se usó una quinasa y una ligasa para unir ambos extremos de los amplicones resultantes (kit de enzimas KLD, NEB) y disponer de los dos plásmidos de segunda generación sin los correspondientes dominios de co-estimulación (Figura 3 C y D).

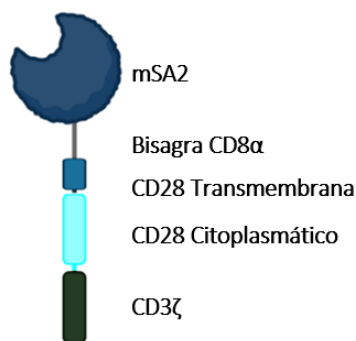
A

1) Cebadores de la mutagénesis para crear el UniCARCD28	
Secuencia 5'-3'	Reconocimiento
<b>CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCG</b>	Inicio región CD3 $\zeta$
<b>CCCTCCGCCGGACCGGTAG</b>	Final región CD28 <sub>Cito</sub>
2) Cebadores de la mutagénesis para crear el UniCAR41BB	
Secuencia 5'-3'	Región Reconocimiento
<b>AAACGGGGCAGAAAGAAAC</b>	Inicio región 41BB
<b>CACCCAAAAGATGATGAAGG</b>	Final región CD28 <sub>TM</sub>

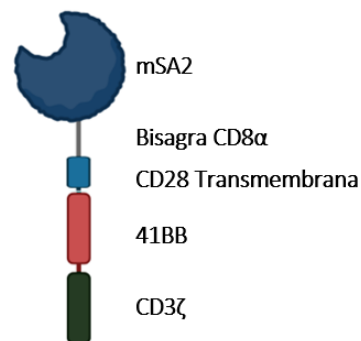
B



C



D



**Figura 3. Esquemas del diseño de los vectores y de las diferentes proteínas UniCAR.** (A) Tabla con la secuencia de los cebadores utilizados y su sitio de unión. (B) Diseño de los constructos plasmídicos que contienen el gen de la proteína UniCAR de 3<sup>a</sup> generación, el UniCARCD28 (1) y el UniCAR41BB (2), con sus correspondientes proteínas EGFP y promotores *EF1 $\alpha$* . Visualización de las regiones de reconocimiento de los cebadores utilizados y la dirección de amplificación de cada uno de ellos. Representación de las proteínas C) UniCARCD28 y (D) UniCAR41BB, ambos UniCAR de 2<sup>a</sup> generación, con los elementos extracelulares, transmembrana e intracelulares que los componen. Figura creada con BioRender.

#### V.1.4 Otros plásmidos y constructos utilizados

- Plásmido expresión codificante para la proteína CD19 (VectorBuilder, Chicago, EEUU) para crear las células de línea K562-CD19 a partir de las K562 (Ver apartados V.2.1, V.2.2, V.6.2 y V.6.3).
- Plásmido de expresión codificante para la proteína CAR  $\alpha$ -CD19 (plásmido denominado como pCAR19) desarrollado y cedido por el Hospital Clínic de Barcelona (CAR-T ARI-0001), como control positivo de activación y funcionalidad celular en los experimentos de co-cultivo de las Tconv-UniCAR y thyTreg-UniCAR con las células K562 (PHE, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Salisbury, Reino Unido) y K562-CD19 (Ver apartados V.4.3, V.4.4, V.6.2 y V.6.3).
- Plásmidos de expresión codificantes para las proteínas estructurales de vectores lentivirales: psAX2 y pMD2.G y pRSV-REV (plásmidos que fueron cedidos por el Prof. Dr. Trono, Addgene, Watertown, MA, EEUU). La combinación de estos tres plásmidos proporciona las estructuras de empaquetamiento y de envoltura esenciales para generar a los lentivectores correspondientes. El psAX2 codifica los genes necesarios para generar la cápside y la matriz lentiviral derivadas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). El pMD2.G codifica el sistema de envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G, por sus siglas en inglés), así, los lentivectores disponen de una mayor facilidad para transducir una mayor gama de células. El pRSV-REV codifica para la proteína Rev del VIH-1 que se une al RRE (Elemento de respuesta Rev, por sus siglas en inglés) en el núcleo celular, aumentando la eficiencia en la salida del ácido ribonucleico (ARN) desde el núcleo hacia el citoplasma.

La secuencia de todos los plásmidos anteriores fue verificada de múltiples formas (mediante enzimas de restricción, PCR y secuenciación Sanger, realizado en la Unidad de Genómica del H.G.U. Gregorio Marañón). Todos los plásmidos anteriores contenían, además, el gen de resistencia a la ampicilina, permitiendo la supervivencia de las bacterias correctamente transformadas (Ver apartado V.1.5) en presencia del antibiótico ampicilina.

### V.1.5 Transformación de bacterias con los plásmidos

Una vez se dispuso de cada uno de los anteriores plásmidos, se transformaron bacterias *Escherichia coli* competentes (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), modificadas genéticamente para evitar insertar mutaciones en los plásmidos introducidos tras la transformación, mediante la técnica del choque térmico (NEB). Esta técnica comienza añadiendo 25 ng de plásmido a 50 µl de bacterias competentes e incubando en hielo durante 30 minutos. Finalizado este periodo, se realiza el choque térmico incubando a las bacterias a 42°C durante 30 segundos. Posteriormente, se incuban de nuevo las bacterias en hielo durante otros 5 minutos. Tras esta incubación, se añaden 950 µl de SOC (medio súper óptimo con represión catabólica, por sus siglas en inglés, NEB) a las bacterias y se incuban durante 1 hora a 37°C con una agitación de 250 rpm. Después, se esparcen 50-100 µl de las bacterias en placas de Petri que contienen el antibiótico de selección y se incuban a 37°C durante toda la noche.

El día siguiente, se seleccionan las colonias de interés y se hacen crecer en 3 ml de medio de cultivo LB (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) con el antibiótico de selección durante 24 horas. Tras la incubación, se congela 1 ml del cultivo bacteriano en una mezcla con 50% de glicerol y 50% agua destilada para criopreservarlas a -80°C. Si se requieren grandes cantidades de plásmido, se vuelve a incubar las bacterias congeladas adecuadas en medio LB (Sigma-Aldrich) y se extraen sus plásmidos usando el kit de extracción de plásmidos (MaxiPrep, Qiagen, Hilden, Alemania).

### V.1.6 Transfección de células de línea para la producción de vectores lentivirales

Tras obtener una abundante cantidad de cada plásmido, se produjeron los vectores lentivirales. Para ello, se co-transfectaron las células HEK-293T (ATCC, LGC Standards S.L.U., Barcelona, España) con los plásmidos de interés (descritos en los apartados V.1.1, V.1.2, V.1.3 y V.1.4), cada uno de ellos en combinación con los plásmidos de empaquetamiento y de envoltura (psAX2 y pMD2.G y pRSV-REV, descritos en el apartado V.1.4) utilizando el kit de transfección por fosfato de calcio siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich) (182). Durante este protocolo, las células HEK-

293T (ATCC) fueron cultivadas en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, ThermoFisher) suplementadas con 4,5 g/l de glucosa, suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés; Biowest, Nuaille, France) al 10% y una mezcla de antibióticos al 1% (125 g/ml de ampicilina, 125 g/ml de cloxacilina y 40 g/ml de gentamicina, combinación que será denominada en adelante como ATB, Sigma-Aldrich). Tras 18 horas desde el inicio de la co-transfección, estas células se lavan y, posteriormente, se cultivan durante 24 horas mientras liberan al sobrenadante los lentivectores formados.

Tras la recolección y la filtración del sobrenadante de las células a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Corning, NY, EE. UU.), se alicuotaron los lentivectores en crioviales y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La concentración de los lentivectores fue titulada tras la cuantificación de la proteína HIV-1-p24<sup>gag</sup> mediante un kit de ensayo enzimático de inmuno-absorbancia (ELISA, Abcam, Cambridge, Reino Unido). La P24<sup>gag</sup> es uno de los componentes de la cápside vírica del lentivector que permite proteger el genoma contenido en su interior. Según los experimentos y las células a transducir, se utilizaron entre 200 y 600 ng de P24<sup>gag</sup> por millón de células.

## V.2 Cultivo y transducción de células de línea.

### V.2.1 Cultivos de células de línea

Las células de línea Jurkat, Jurkat transducidas para expresar el UniCAR (Jurkat-UniCAR), THP1, THP1 que expresaban la proteína DC-SIGN (THP1-DC-SIGN) (todas ellas del *Reagent Program*, NIH, EEUU), K562 (PHE) y K562 transducidas para permitir la expresión de la proteína CD19 (K562-CD19) fueron cultivadas y mantenidas en el medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Biochrome, Harvard Bioscience, Holliston, MA, EEUU) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich), a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Para determinados experimentos, las Jurkat-UniCAR fueron también temporalmente cultivadas en X-vivo15 (Lonza, Walkersville, MD, EEUU) complementado con suero humano AB al 5% (SAB, Sigma-Aldrich); en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich), 1% ATB

(Sigma-Aldrich) o en X-vivo15 (Lonza) complementado con 10% FBS (Biowest).

Las células HEK-293T (ATCC) fueron cultivadas en DMEM (Gibco) suplementadas con 1 g/l de glucosa, 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich).

### V.2.2 Protocolo de transducción de células de línea

Para la transducción de las células de línea Jurkat y K562, estas fueron cultivadas durante 24h en presencia de los vectores correspondientes para expresar las proteínas UniCAR de 3<sup>a</sup> generación y el CD19, respectivamente. Posteriormente, fueron lavadas y se volvieron a cultivar en medio fresco RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest), 1% ATB (Sigma-Aldrich). Tras, al menos, 48 horas de cultivo, se utilizó el separador celular MACSQuant® Tyto® (siguiendo las instrucciones del fabricante, Miltenyi Biotec) para aislar y purificar las poblaciones correctamente transducidas de Jurkat-UniCAR EGFP<sup>+</sup> y las K562-CD19<sup>+</sup>, usando, respectivamente, los marcadores EGFP y CD19 (utilizando un Ac  $\alpha$ -CD19-ECD, Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). Tras el aislamiento, las fracciones resultantes Jurkat-UniCAR y K562-CD19 estaban enriquecidas en más de un 98% de población positiva para EGFP y CD19, respectivamente, y conservando una alta viabilidad. Finalmente, se volvieron a cultivar en medio fresco.

## V.3 Aislamiento y obtención de las células primarias

### V.3.1 Aislamiento y obtención de células a partir de tejido tímico.

Los tejidos tímicos se obtuvieron a partir de pacientes pediátricos que fueron intervenidos de una cirugía cardiaca debido a diferentes patologías en la Unidad de Cirugía Cardíaca Infantil del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Los pacientes pediátricos cuyos timos hemos utilizado para la presente tesis no tenían anomalías inmunológicas o genéticas conocidas que pudieran afectar al desempeño de los linfocitos T reguladores. Para poder disponer de estos timos, se obtuvo el consentimiento para la participación en el estudio de los padres o tutores. Este protocolo fue aceptado

por el comité de ética clínica del Hospital Gregorio Marañón según los principios descritos en la Declaración de Helsinki (2013). Una vez el tejido tímico fue extraído de los pacientes, los timos se recogieron en recipientes estériles que contenían TexMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) suplementado con 1% de ATB (Sigma-Aldrich) y se conservaron a 4°C hasta que se realizó el protocolo de disgregación mecánica.

Desarrollado anteriormente por el Laboratorio de Inmuno-Regulación (112), los timocitos se obtuvieron siguiendo un protocolo de disgregación que comienza con un proceso de limpieza y fragmentación del tejido tímico. Posteriormente, se introdujeron los fragmentos en unos tubos especiales (*gentleMACS*, Miltenyi Biotec) para proceder a la disgregación mecánica, utilizando el disgregador *gentleMACS Dissociator* (Miltenyi Biotec). Tras la recolección de los timocitos después de la disgregación mecánica, la fracción positiva para el CD25 (CD25<sup>+</sup>) y la fracción negativa para CD25 (CD25<sup>neg</sup>) fueron purificadas a partir de los timocitos totales utilizando microesferas de selección positiva del CD25 (Miltenyi Biotec). En el tejido tímico, los linfocitos T reguladores se caracterizan por ser las únicas en expresar el marcador CD25 (77, 112). Por ello, esta fracción CD25<sup>+</sup> será denominada en la presente tesis como CD25<sup>+</sup> y/o thyTreg, tras el protocolo de expansión *ex vivo* que se detallará más adelante (Ver apartados V.4.1, V.4.2 y V.4.4).

Para algunos experimentos, tras la obtención de las fracciones anteriores, se aislaron también las fracciones el CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> procedentes de la fracción CD25<sup>neg</sup>, utilizando microesferas  $\alpha$ -CD8 mediante el kit de selección positiva CD8 *Microbeads* (Miltenyi Biotec) (Figura 4).

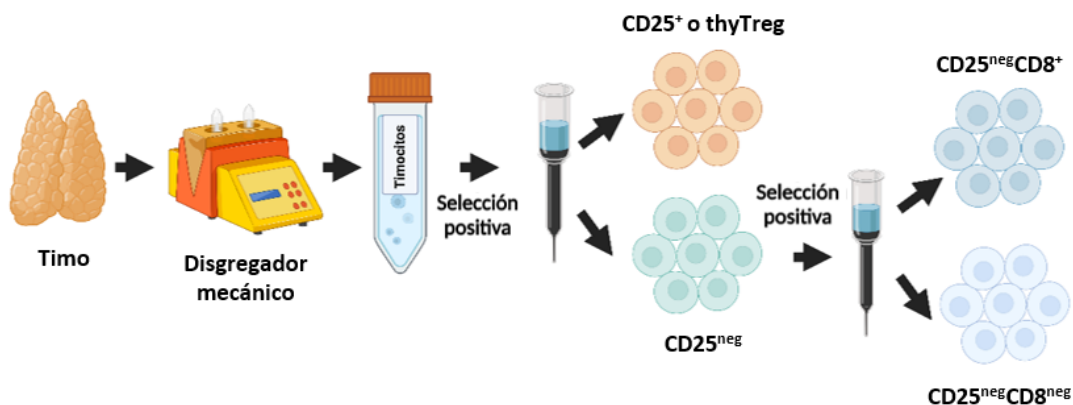


Figura 4. Esquema del protocolo de disgregación del timo y obtención de las diferentes fracciones células. Figura creada con BioRender.

### V.3.2 Aislamiento y obtención de células a partir de sangre periférica.

A partir de concentrados leucocitarios derivados de donaciones de sangre periférica (*Buffy Coats*) de adultos sanos, cedidos por el Centro de Transfusiones de Madrid, y mediante la técnica de gradientes de densidad Ficoll-Paque (Palex, Barcelona, España), se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica totales (CMSP). Estas CMSP fueron usadas en fresco, o tras un ciclo de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, para diferentes fines:

- A partir de las CMSP en fresco, se aislaron las células Th CD4 *naive* (CD45RA<sup>+</sup>) mediante el kit de aislamiento homónimo a dichas células (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del fabricante. A partir de las anteriores Th CD4 *naive*, se aislaron la fracción de células CD25<sup>+</sup> CD127<sup>bajo</sup> (consideradas pTreg *naive* de sangre periférica) (183) y las CD25<sup>neg</sup> *naive* de periferia, mediante el separador celular (MACSQuant® Tyto®, Miltenyi Biotec) (Figura 5). Ambos tipos de células se usaron como controles de algunos experimentos (Ver apartado V.4.1)

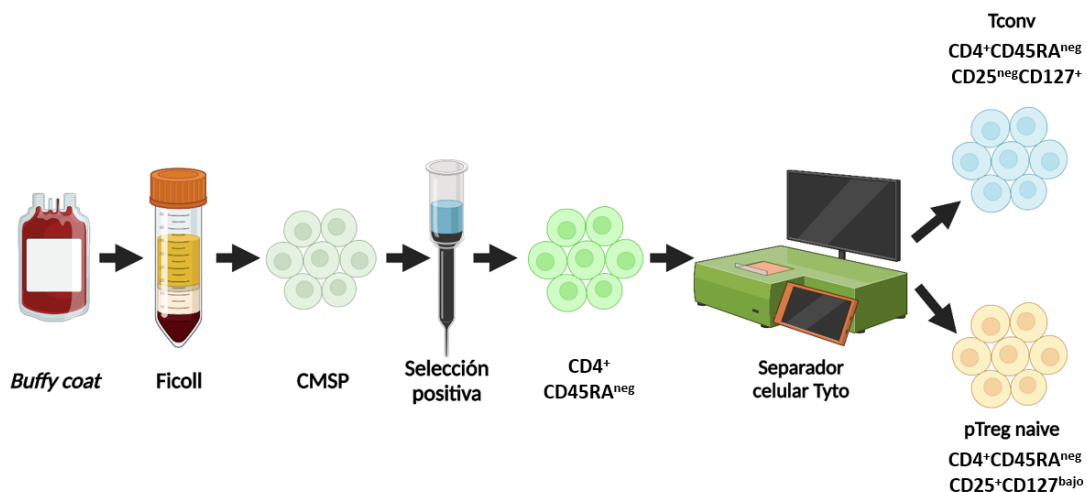


Figura 5. Esquema del protocolo de recolección de CMSP y obtención de las diferentes fracciones células. Figura creada con BioRender.

- CMSP totales, tras un ciclo de congelación-descongelación, como células efectoras de los experimentos de transducción con UniCAR, para dar lugar a los diferentes tipos de Tconv-UniCAR o CAR19 (Ver apartado V.4.3).
- CMSP en fresco y tras un proceso de congelación-descongelación fueron utilizadas como células diana de los ensayos de función supresora en los co-cultivos con los timocitos o con los diferentes tipos de thyTreg-NT y thyTreg-UniCAR (Ver apartados V.7.1 y V.7.2).
- A partir de las CMSP en fresco, se hizo una selección de células Tc CD8, quedando la fracción restante como no-CD8, utilizando el kit de selección negativa CD8 *Microbeads* (Miltenyi Biotec). Estas células se usaron como células diana en los ensayos de función supresora con diferentes tipos de thyTreg-NT y thyTreg-UniCAR (Ver apartado V.7.3).

Estas aplicaciones de las CMSP serán detalladas en profundidad más adelante.

## V.4 Protocolos de cultivo, transducción y expansión de células primarias de timo y de sangre periférica.

### V.4.1 Cultivo de células CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup> y CD25<sup>neg</sup> TGF- $\beta$ procedentes de timo y de periferia.

A día 0, tras la obtención de las células CD25<sup>+</sup> y las células CD25<sup>neg</sup>, ambas procedentes tanto de los timocitos disgregados como de las Th CD4 *naive* de periferia, se cultivaron la totalidad de las CD25<sup>+</sup> y la mitad de las CD25<sup>neg</sup> a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml; 2x10<sup>6</sup> células por cada pocillo; en placa de cultivo P24; con medio X-vivo15 (Lonza) complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich) y con 600 U/ml de IL-2 (ImmunoTools, Friesoythe, Alemania), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron estimuladas con partículas magnéticas  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (*Dynabeads Human T-Activator*, Invitrogen, Waltham, MA, EEUU) durante 72 horas con un ratio de activación 1:4 (*Dynabead* : Células). En paralelo, bajo las mismas condiciones de cultivo y estimulación, la otra mitad de las células CD25<sup>neg</sup>, tanto procedentes del timo como de las Th CD4 *naive* de periferia, fueron también cultivadas en presencia del TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, ImmunoTools).

Transcurridas 72h, se quitaron las *Dynabeads* y las células se cultivaron durante otros 4 días, hasta día 7 de cultivo. El medio de cultivo y las citoquinas se reemplazaron cada dos días. Las células CD25<sup>+</sup> procedentes de los timocitos y de las Th CD4 *naive* de periferia, correspondientes a las thyTreg y pTreg, respectivamente, fueron usadas como controles positivos del fenotipo, estabilidad y funcionalidad inmunosupresora.

#### **V.4.2 Cultivo de las células tímicas CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ y transducción con los vectores MSCV-FOXP3 y MSCV- $\Delta$ FOXP3**

A día 0, tras la purificación de las células CD25<sup>+</sup> y de las células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> a partir de los timocitos, se cultivaron estas células a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml, 2x10<sup>6</sup> células por cada pocillo de la placa de cultivo P24 y en medio X-vivo15 (Lonza) complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich) y con 600 U/ml de IL-2 (ImmunoTools), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron estimuladas con *Dynabeads* (Invitrogen), a ratio de activación 1:4 (*Dynabead* : Células). Las células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fueron tratadas, además, con TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, ImmunoTools).

Transcurridas 24h, a todas las condiciones se les retiraron la mayor parte de los sobrenadantes (~1,5 ml) procurando no tocar las células que estaban en el fondo de la placa. A las células CD25<sup>+</sup> y a una parte de las CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> se les añadió de nuevo medio fresco con las correspondientes citoquinas. Por otro lado, para transducir al resto de las células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, se añadió a los pocillos los sobrenadantes con los lentivectores MSCV-FOXP3 y MSCV- $\Delta$ FOXP3, además de las citoquinas correspondientes.

A día 3, se retiraron las *Dynabeads* de todas las condiciones, se analizó su viabilidad y se volvieron a cultivar en medio fresco al que también se le renovaron las citoquinas IL-2 y TGF- $\beta$ 1, según correspondiera. Adicionalmente, a las condiciones de las CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transducidas con los dos tipos de vectores se les añadió puromicina (2.5  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich), para seleccionar únicamente a las células que fueron correctamente

transducidas, gracias al gen de resistencia a la puromicina incluido en el genoma transducido.

El cultivo de las diferentes fracciones celulares se continuó hasta día 14, estudiando a días 7, 10 y 14 el fenotipo, la estabilidad y la funcionalidad de las células (Figura 6). El medio de cultivo y las citoquinas se renovaron cada dos días. Se usaron las células CD25<sup>+</sup> o thyTreg, como control positivo para el fenotipo Treg y en los ensayos funcionales y de estabilidad.

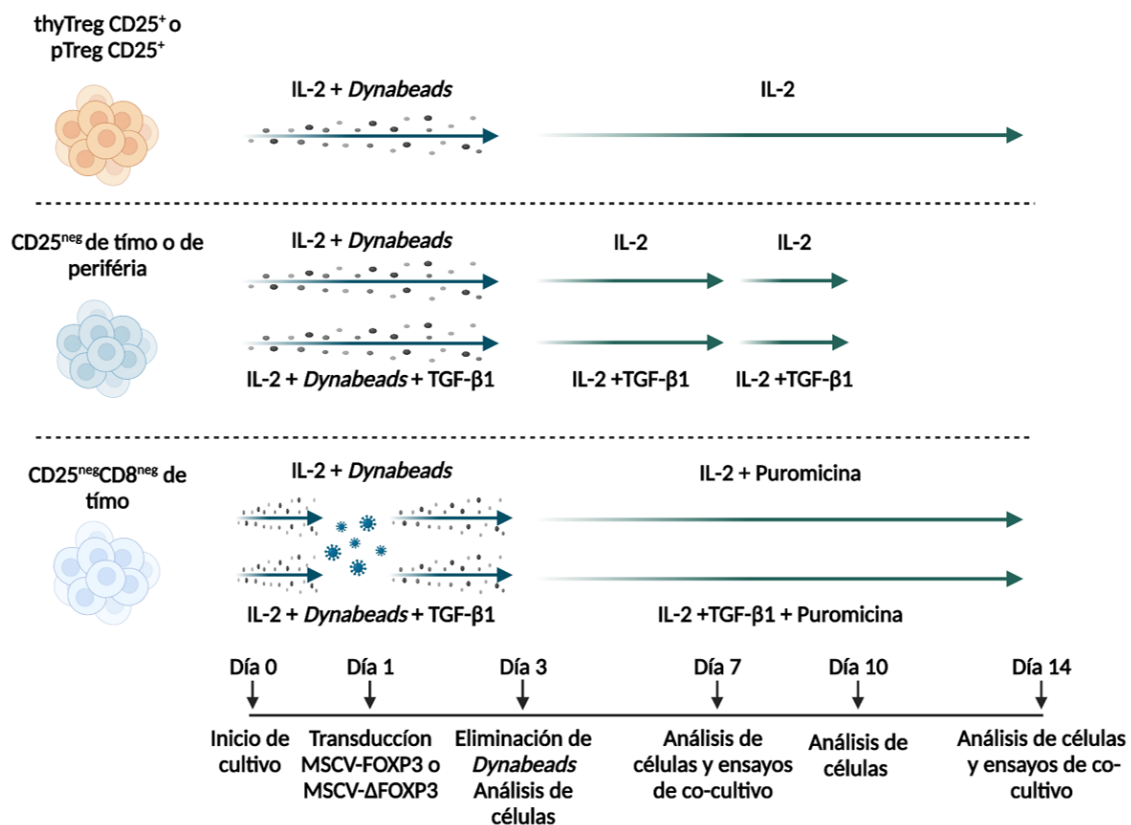


Figura 6. Esquema del protocolo de cultivo de las diferentes fracciones celulares derivadas del timo o de sangre periférica. Figura creada con BioRender.

### V.4.3 Activación, transducción y selección de las Tconv con los diferentes UniCAR y CAR19

18 h antes del inicio de cada experimento, se descongelaron las células CMSP que fueron previamente obtenidas a partir de *buffy coats* y congeladas en nitrógeno líquido. A día 0, se cultivaron  $1,5 \times 10^6$  células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo y fueron estimuladas con *Dynabeads* (Invitrogen) durante 72 horas, hasta el día 3. Ratio de activación 1:1 (*Dynabead* : Célula). Estos cultivos celulares fueron suplementados con 300 U/ml de IL-2 (ImmunoTools).

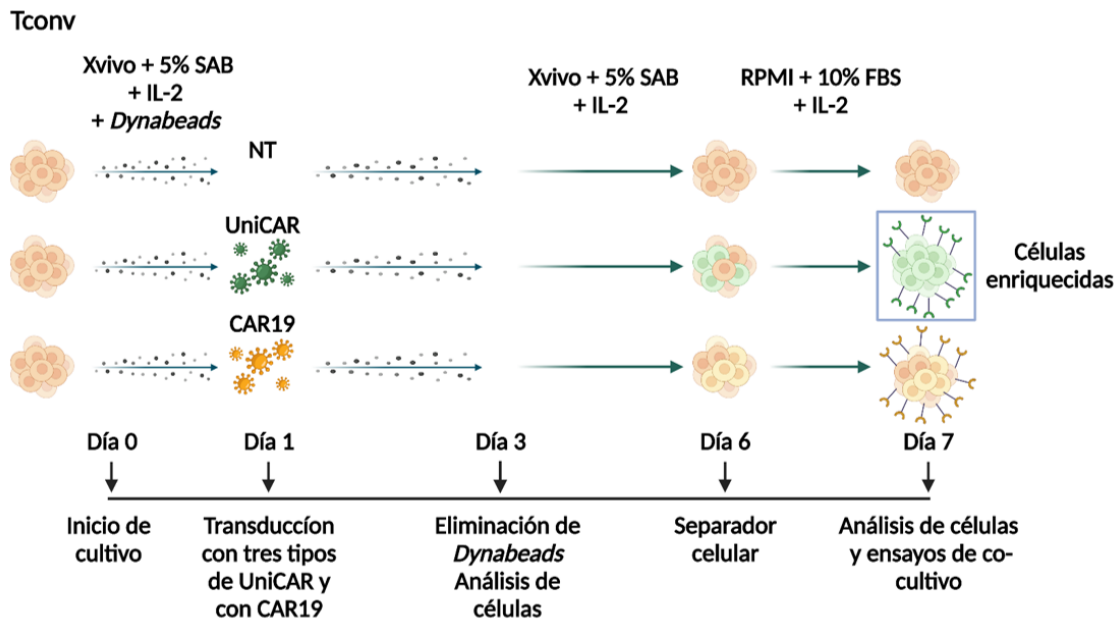
Transcurridas 24 horas de estimulación, se llevó a cabo la transducción. Para ello, se descongelaron los viales correspondientes de los vectores lentivirales UniCAR, UniCARCD28, UniCAR41BB y CAR19. Una vez descongelados, los lentivectores se incubaron durante 1 hora a 4 °C con *Dynabeads*, en un ratio 1:2 (*Dynabead* : Célula) con respecto a las células del día 0. Tras la incubación de los vectores con las *Dynabeads*, se retiraron 1,5 ml de los sobrenadantes de las condiciones que iban a ser transducidos para añadir el mix de vectores + *Dynabead* a las células, añadiendo a cada pocillo la cantidad correspondiente de IL-2. En paralelo, se cambió el renovó el medio de cultivo e IL-2 de la condición control de células no transducidas (NT).

A día 2, se retiraron de nuevo 1,5 ml para añadir medio fresco e IL-2. A día 3 del experimento, tras 72 horas de estimulación y 48 h después del inicio de la transducción, se retiraron las *Dynabeads* y se lavaron las células con PBS para cultivarlas de nuevo en medio fresco suplementado con la cantidad correspondiente de IL-2. Se cultivaron en este momento a  $0,8 \times 10^6$  células/pocillo. Se dejaron reposar y proliferar otros 3 días, en los que se renovaba el medio de cultivo con la IL-2 cada dos días. A día 6 se llevó a cabo la selección de la población EGFP<sup>alto</sup> mediante el separador celular MACSQuant® Tyto® (Miltenyi Biotec) (Figura 7).

Desde el inicio del experimento hasta el día 6, día correspondiente al aislamiento de las EGFP<sup>alto</sup>, las células fueron cultivadas en medio X-vivo15 (Lonza) complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich) y la cantidad de IL-2 correspondiente. Tras la selección de las células EGFP<sup>alto</sup>, las células resultantes fueron cultivadas en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest), 1% ATB (Sigma-Aldrich) y 300 U/ml de IL-2 hasta el día 7.

De igual modo, hasta día 6, las células NT y las transducidas con el CAR19, que no pasaron por el seleccionador celular, fueron cultivadas en X-vivo15 complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich) y 300 U/ml de IL-2, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para someter a estas células al mismo estrés que las células transducidas, se renovó el medio de cultivo los mismos días en los que las células transducidas con los UniCAR fueron sometidas a cualquier tipo de

manipulación. El día 6, estas células fueron recuperadas, lavadas con PBS y cambiadas al medio RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest), 1% ATB (Sigma-Aldrich) e IL-2 de igual forma que se hizo con las transducidas. Estas células NT y CAR19 se utilizaron como controles para el fenotipo, funcionalidad y estabilidad de las Treg y de los UniCAR, respectivamente.



**Figura 7. Esquema del protocolo de activación, transducción y selección de las Tconv modificadas genéticamente con los diferentes UniCAR y CAR19. Figura creada con BioRender.**

#### V.4.4 Activación, transducción y selección de las thyTreg con los diferentes UniCAR y CAR19

A día 0, tras el aislamiento de las células CD25<sup>+</sup> del timo, se cultivaron 1,5 x10<sup>6</sup> células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo y fueron estimuladas con *Dynabeads* (Invitrogen) durante 72 horas, hasta el día 3. Ratio de activación 1:1 (*Dynabead* : Célula). Estos cultivos celulares fueron suplementados con 600 U/ml de IL-2 (ImmunoTools).

Transcurridas 48 h de estimulación, se llevó a cabo la transducción. Para ello, se descongelaron los vectores lentivirales UniCAR, UniCARCD28, UniCAR41BB y CAR19. Una vez descongelados, los vectores se incubaron durante 1 hora a 4 °C con *Dynabeads*, en un ratio 1:2 (*Dynabead* : Célula) con

respecto a las células del día 0. Tras la incubación de los vectores con las *Dynabeads*, se retiraron 1,5 ml de los sobrenadantes de las condiciones que iban a ser transducidos para añadir el mix de vectores + *Dynabead* a las células, añadiendo a cada pocillo la cantidad correspondiente de IL-2. En paralelo, se mantuvo la condición control de células no transducidas (NT).

A día 3 del experimento, se retiraron las *Dynabeads* y se lavaron las células con PBS para, posteriormente, cultivarlas de nuevo en medio fresco suplementado con la cantidad correspondiente de IL-2. Se cultivaron en este momento a  $0,8 \times 10^6$  células/pocillo. Tras dejar reposar y proliferar 3 días, a día 6, se llevó a cabo la selección de la población EGFP<sup>alto</sup> mediante el separador celular MACSQuant® Tyto®.

Desde el inicio del experimento hasta el día 6, día correspondiente al aislamiento de las EGFP<sup>alto</sup>, las thyTreg fueron cultivadas en medio X-vivo15 (Lonza) complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich). Tras la selección de los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR EGFP<sup>alto</sup>, las células resultantes fueron cultivadas en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest), 1% ATB (Sigma-Aldrich) y 600 U/ml de IL-2 hasta el día 7 (Figura 8).

De igual modo, hasta día 6, las thyTreg no transducidas (thyTreg-NT) y las transducidas con el CAR19 (thyTreg-CAR19), que no pasaron por el seleccionador celular, fueron cultivadas en X-vivo15 complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich) y 300 U/ml de IL-2. Para someter a estas células al mismo estrés, se retiró el medio y se renovó por medio fresco los mismos días en los que las células transducidas fueron sometidas a cualquier tipo de manipulación. En el día 6, estas células fueron recuperadas, lavadas y cambiadas al medio RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest), 1% ATB (Sigma-Aldrich) e IL-2, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> de igual forma que se hizo con las transducidas. Estas thyTreg-NT y thyTreg-CAR19 se utilizaron como controles para el fenotipo, funcionalidad y estabilidad de las Treg y de los UniCAR, respectivamente.

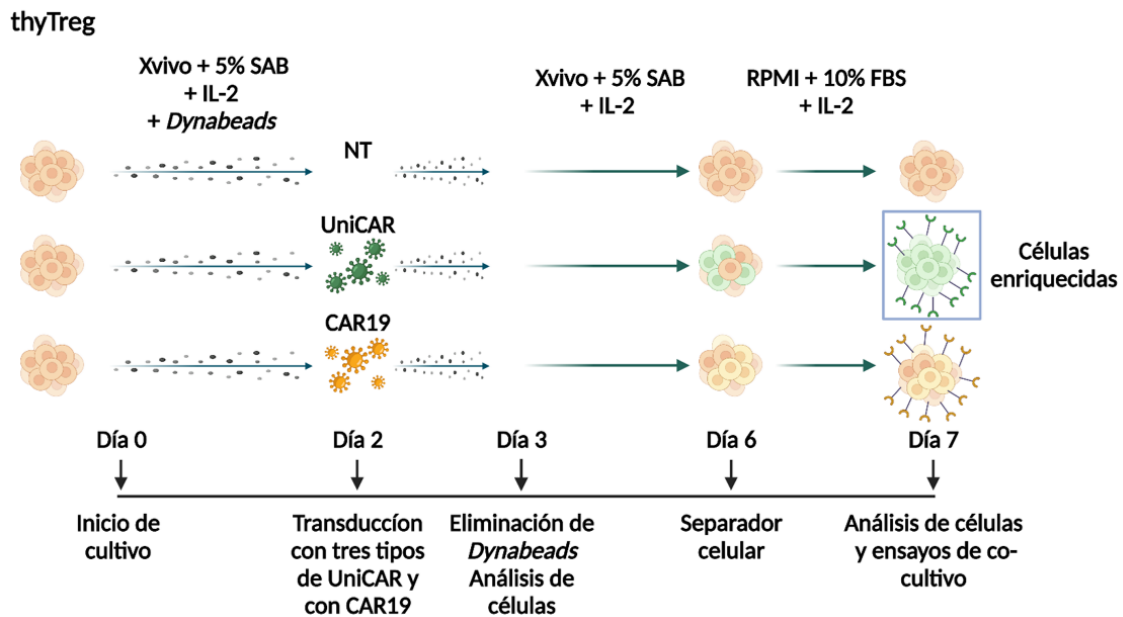


Figura 8. Esquema del protocolo de activación, transducción y selección de las thyTreg modificadas genéticamente con los diferentes UniCAR y CAR19. Figura creada con BioRender.

## V.5 Análisis del fenotipo celular por citometría de flujo

Todas las muestras fueron adquiridas con un analizador de células *Gallios Flow Cytometer* (Beckman Coulter) y un *MACSQuant Analyzer 16 - Flow Cytometer* (Miltenyi Biotec) y el análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software de análisis Kaluza (Versión 2.1, Beckman Coulter). Para establecer el límite entre la población de células positiva y negativa para cada marcador, se usaron los controles correspondientes (tanto isotípicos como *Fluorescence Minus One- FMO*, por sus siglas en inglés) cuando fueron necesarios.

### V.5.1 Marcaje de proteínas superficiales

Para llevar a cabo el marcaje de las proteínas superficiales, cuando correspondía, y tras un lavado en un tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés; Lonza), las células fueron marcadas con Ac específicos conjugados con fluorocromos concretos (Tabla 1) durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad, en un medio de PBS + 2% FBS. Tras un nuevo lavado y centrifugación con PBS para retirar el exceso de Ac, se continuó con el marcaje para determinar la viabilidad celular (Ver apartado V.5.2).

Por otro lado, para marcar concretamente las proteínas UniCAR, se utilizó el fluorocromo Atto655 unido a una Biotina (Sigma-Aldrich). También se utilizó el Ac primario IgG-Biotina de rata (Miltenyi Biotec). Para este marcaje del UniCAR con el Atto655-Biotina y el Ac primario, se incubaron las células durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, en un medio de PBS + 2% FBS. Posteriormente, únicamente para poder visualizar por citometría el Ac primario, se utilizó un Ac secundario  $\alpha$ IgG-APC frente rata procedente de asno (Jackson ImmunoResearch, Ely, Reino Unido). Este marcaje fue 30 minutos a 4°C y en oscuridad, en un medio de PBS + 2% FBS. Finalmente, en ambos casos también se llevó a cabo el marcaje de la viabilidad (Ver apartado V.5.2).

### V.5.2 Marcaje viabilidad

Tras la tinción de las proteínas de superficie, se usaron diferentes compuestos para determinar la viabilidad celular. Para aquellos marcajes que finalizaban en este paso y que iban a ser adquiridas directamente por los citómetros, se usó 7-Aminoactinomicina D (7-AAD, Invitrogen), con una incubación de, al menos, 10 minutos, a 4°C y en oscuridad.

Por otro lado, para aquellos marcajes que se continuarían con el marcaje de las proteínas intracelulares (Ver apartado V.5.3), se usaron los *Fixable Viability Dye* eFluor 450 y eFluor 780 (ThermoFisher), en un mililitro de medio de PBS + 2% FBS, con una incubación de 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, se aplicó un lavado y centrifugación.

### V.5.3 Marcajes de proteínas intracelulares

Tras los marcajes previos de proteínas superficiales y de viabilidad, las proteínas intracelulares fueron marcadas utilizando el empleo del kit comercial "Factor de transcripción FOXP3" (ThermoFisher). Este kit consiste en la fijación y la permeabilización de las células, durante 20 minutos, a 4°C y en oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se realiza el marcaje de las proteínas intracelulares con Ac específicos conjugados con fluorocromos (Tabla 1), durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Finalmente, y tras otros dos lavados, las células fueron adquiridas por el citómetro.

<b>Tinción fenotípica superficial</b>			CCR7	BV510	Beckton Dickinson
<u>Diana</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Proveedor</u>	CCR4	BV605	Biolegend
CD39	FITC	Miltenyi Biotec	CD62L	BV650	Biolegend
CD3	PO	Miltenyi Biotec	CXCR3	PE-Vio615	Miltenyi
CD45RA	ECD	Beckman Coulter	CD27	PC5.5	Beckman Coulter
HLA-DR	PC5.5	Beckman Coulter	CD103	APC	Miltenyi
HLA-DR	APC	Immuno-Step	<b>Tinción Viabilidad</b>		
CD8	APC/Cy5	Beckman Coulter	7-AAD		Invitrogen
CD8	BV570	Biolegend	<i>Viability dye</i>	eFluor450	eBioscience
CD25	PC7	Becton Dickinson	<i>Viability dye</i>	eFluor780	eBioscience
CD25	PC7	eBioscience	<b>Tinción fenotípica intracelular</b>		
CD4	APC/Cy7	Biolegend	<u>Diana</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Proveedor</u>
CD4	ECD	Miltenyi	FOXP3	PE	eBioscience
CD4	VioGreen	Miltenyi	CTLA-4	APC	Becton Dickinson
CD73	BV605	Biolegend	Helios	PC5	eBioscience
ICOS	BV650	Biolegend	Perforina	VioBlue	Miltenyi
PD-1	PE	Miltenyi	IL-2	PerCP	Biolegend
CD69	APC5	Biolegend	IL-10	eFluor660	eBioscience
CD71	APC7	Miltenyi	Granzima B	APC5	Biolegend
LAG3	BV650	Biolegend			
GITR	PE-Vio615	Miltenyi			
LAP	APC	eBioscience			

**Tabla 1: Ac para citometría de flujo utilizados.** Ac primarios con sus fluorocromos y casas comerciales utilizados como marcaje de proteínas superficiales, intracelulares o como marcadores de viabilidad, para citometría de flujo.

## V.6 Activación mediada por los UniCAR

### V.6.1 Activación de Jurkat mediada por UniCAR

Para evaluar si el constructo UniCAR podía ejercer sus funciones de reconocimiento de la biotina y de activación celular, se estudió la expresión del marcador de activación celular CD69 en la superficie celular de las células de línea Jurkat. Para ello, se cultivaron solas  $5 \times 10^4$  de Jurkat o de Jurkat-UniCAR; o se co-cultivaron ambos tipos celulares con  $5 \times 10^4$  de células de otra línea celular, las THP1 o las THP1-DC-SIGN. Para poder diferenciarlas, las células THP1 y THP1-DC-SIGN fueron marcadas con  $1 \mu\text{M}$  de *CellTrace Violet* (CTVio, Invitrogen) previamente al co-cultivo. A los cultivos y a los co-cultivos se les añadió el Ac intermediario  $\alpha\text{DC-SIGN-Biotina}$  (Invitrogen). Para el control negativo de este experimento no se añadió ningún Ac y, para el control positivo de activación, se añadió  $2 \mu\text{g/ml}$  de un activador celular inespecífico, la Fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés, Invitrogen). Los cultivos y co-cultivos fueron realizados en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich), a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se siguió el protocolo de marcaje superficial utilizando el Ac  $\alpha\text{CD69}$  (Tabla 1) el 7-AAD como marcador de viabilidad celular y, finalmente, se adquirieron por el citómetro correspondiente.

### V.6.2 Activación de células primarias Tconv-UniCAR y Tconv-CAR19

Para evaluar si el constructo UniCAR podía ejercer sus funciones de reconocimiento de la biotina y de la consecuente activación en células primarias, se estudió la expresión del marcador de activación celular CD25 en la superficie celular de las células primarias Tconv-NT o modificadas genéticamente tras el protocolo anteriormente descrito (Ver apartado V.4.3).

A día 7 del experimento, las células fueron lavadas en PBS y, tras el contaje, se cultivaron solas  $5 \times 10^4$  Tconv-NT, Tconv-UniCAR, Tconv-UniCARCD28, Tconv-UniCAR41BB y Tconv-CAR19. A estos cultivos en solitario de los diferentes tipos de Tconv se les añadieron los Ac intermediarios  $\alpha\text{CD19-}$

Biotina, y sus controles  $\alpha$ CD19 sin biotina e IgG-Biotina (todos ellos de Miltenyi Biotec), todos ellos a una concentración final en cada pocillo de 1,5  $\mu$ g/ml. Como control negativo de activación, no se añadió ningún elemento a los cultivos celulares. Como control positivo de activación, se les añadió 2  $\mu$ g/ml de PHA (Invitrogen).

En paralelo a esos cultivos en solitario, también se co-cultivaron  $2 \times 10^4$  células de cada uno de los cinco tipos celulares de Tconv, con  $2 \times 10^4$  células de línea K562-CD19. Las células K562-CD19 fueron marcadas con 1  $\mu$ M CTVio (Invitrogen) previamente al co-cultivo, para poder distinguir unas células de otras. A los co-cultivos se les añadió el Ac intermediario  $\alpha$ CD19-Biotina, y sus controles experimentales, el Ac  $\alpha$ CD19 sin biotina y Ac el IgG-Biotina. Como control negativo de estimulación celular, a los co-cultivos no se les añadió ningún Ac (Figura 9). Las células fueron cultivadas o co-cultivadas en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 y 72 horas. Todos los experimentos se hicieron en duplicado.

Para analizar la viabilidad de las células del cultivo o del co-cultivo de la forma más fidedigna posible, transcurridos las 24 y 72 horas de cultivo o co-cultivo, se añadió 1  $\mu$ l de 7-AAD a cada pocillo de uno de los duplicados y se adquirió por el citómetro de flujo tras 10 min de incubación, sin lavar las células. Con los otros pocillos de los duplicados, se siguió el protocolo de marcaje superficial y viabilidad utilizando el Ac  $\alpha$ CD25 (Tabla 1) y el 7-AAD, respectivamente, y se adquirieron por el citómetro correspondiente.

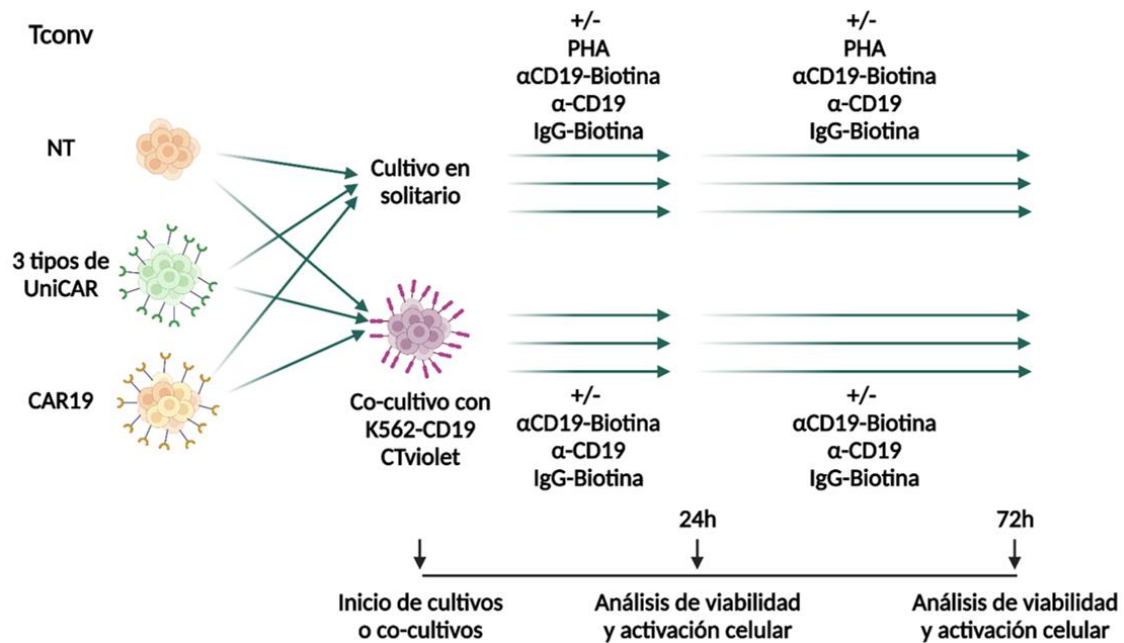


Figura 9. Esquema del protocolo de cultivo para estudiar la activación de Tconv mediada por los UniCAR y CAR19. Figura creada con BioRender.

### V.6.3 Activación de thyTreg mediada por los UniCAR y CAR19

Para evaluar si el constructo UniCAR podía ejercer sus funciones de reconocimiento de la biotina y de activación celular de las thyTreg que los portaban, se estudió la expresión del marcador de activación celular CD25, CD69 y PD-1 en la superficie celular de las células primarias thyTreg-NT o modificadas genéticamente.

A día 7, tras el protocolo descrito en el apartado V.4.4, las células se lavaron en PBS, se realizó el conteo y se co-cultivaron  $2 \times 10^4$  de cada tipo celular thyTreg-NT, thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28, thyTreg-UniCAR41BB y thyTreg-CAR19 con  $2 \times 10^4$  células de dos tipos de células de línea, las K562 o las K562-CD19. Las células K562 y K562-CD19 fueron marcadas con  $1 \mu\text{M}$  CTviolet (Invitrogen) previamente al co-cultivo, para poder distinguir unas células de otras. A los co-cultivos se les añadió el Ac intermediario αCD19-Biotina, o sus controles experimentales, el Ac αCD19 sin biotina y el Ac IgG-Biotina (todos ellos de Miltenyi Biotec), todos ellos a una concentración final en cada pocillo de  $1,5 \mu\text{g/ml}$ . Como control negativo de estimulación celular, a los co-cultivos no se les añadió ningún Ac. Las células fueron co-cultivadas en duplicado en RPMI 1640 (Biochrome)

suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 y 72 horas (Figura 10).

Para analizar la viabilidad de las células del cultivo o del co-cultivo de la forma más fidedigna posible, transcurridas las 24 y 72 horas de cultivo o co-cultivo, se añadió 1 µl de 7-AAD a cada pocillo de uno de los duplicados y se adquirió por el citómetro de flujo tras 10 min de incubación, sin lavar las células. Con los otros pocillos de los duplicados, se siguió el protocolo de marcaje superficial y viabilidad utilizando los Ac αCD25, αCD69, αPD-1, αCD71, αICOS y αHLA-DR (Tabla 1), y el 7-AAD, respectivamente, y se adquirieron por el citómetro correspondiente.

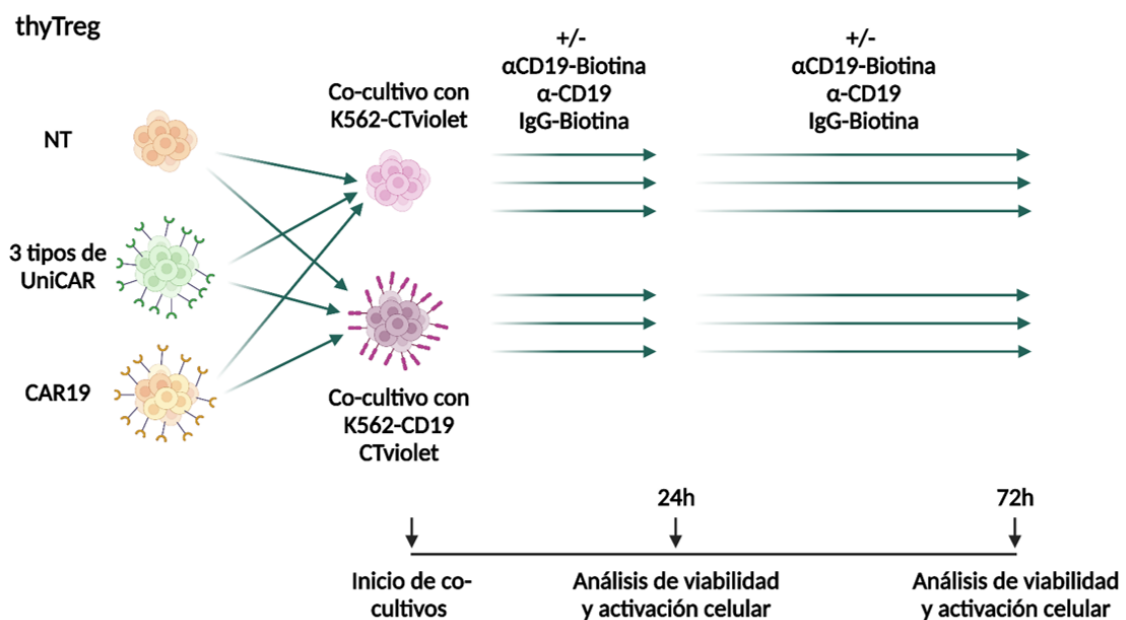


Figura 10. Esquema del protocolo de cultivo para estudiar la activación de thyTreg mediada por los UniCAR y CAR19. Figura creada con BioRender.

## V.7 Análisis de función supresora

### V.7.1 Inhibición de la proliferación: Co-cultivo de CMSP con las diferentes fracciones celulares procedentes del timo o de periferia.

Para evaluar la función supresora de las diferentes células obtenidas a partir de los timocitos, se estudió su capacidad de inhibir la proliferación de CMSP en un co-cultivo. Este experimento, ampliamente utilizado para evaluar la

capacidad supresora de las Treg (184, 185), es similar a la reacción mixta de linfocitos, tradicionalmente utilizada en el área de la inmunología celular que permitió entender el reconocimiento del complejo MHC-Ag por el TCR de las células T (186). En el contexto del estudio de la supresión de la proliferación, el co-cultivo se inició el día 7 de los cultivos de las condiciones celulares CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup> y CD25<sup>neg</sup> TGF- $\beta$ , procedentes tanto del timo como de periferia; y las CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> del timo + TGF- $\beta$ , con y sin transducción con MSCV-FOXP3 y MSCV- $\Delta$ FOXP3. Estas células se consideran las células efectoras que van a ejercer su presunta función inhibidora sobre la proliferación de unas células diana. Por otro lado, las CMSP, que son consideradas como las células diana cuya proliferación presuntamente será suprimida, se obtuvieron previamente a partir de *buffy coats* (Ver apartado V.3.2).

A día 7, y 24 horas después de la descongelación de las CMSP, estas CMSP se marcaron con 1 $\mu$ M de CTVio (Invitrogen). Tras este marcaje, se co-cultivaron 1x10<sup>5</sup> de las células efectoras derivadas de los timocitos con 5x10<sup>4</sup> CMSP-CTVio<sup>+</sup> (ratio 2:1, células efectoras : CMSP-CTVio<sup>+</sup>), en medio X-vivo15 (Lonza) suplementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich) y 600 U/ml de IL-2 (ImmunoTools), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, en placas de cultivo de 96 pocillos (p96) con fondo en U. A su vez, se le añadió al co-cultivo 5x10<sup>4</sup> *Dynabeads* (Invitrogen). Tras 72 horas de co-cultivo, las células se marcaron superficialmente con  $\alpha$ CD4 y  $\alpha$ CD8 (ver Tabla 1) y la viabilidad con 7-AAD (Figura 11). En algunas ocasiones, tras las 72 horas de co-cultivo, las células fueron marcadas con  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD4,  $\alpha$ CD8,  $\alpha$ CD25,  $\alpha$ FOXP3,  $\alpha$ CD39 y  $\alpha$ CTLA-4 para analizar el fenotipo celular después del co-cultivo, además de la proliferación y viabilidad de las CMSP.

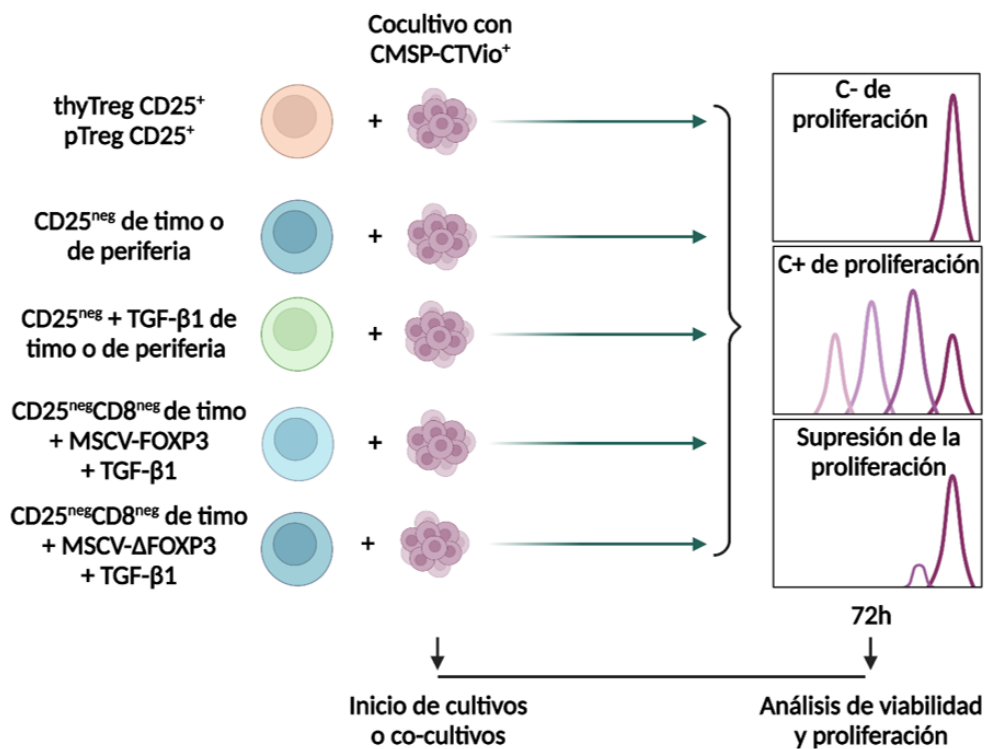


Figura 11. Esquema del protocolo de cultivo para estudiar la capacidad de las diferentes fracciones celulares del timo o de periferia de inhibir la proliferación de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>. Figura creada con BioRender.

Como control negativo de proliferación, se cultivaron  $1 \times 10^5$  CMSP solas sin estimular y, como control positivo de proliferación, se cultivaron  $5 \times 10^4$  CMSP solas con las correspondientes *Dynabeads*.

El porcentaje de supresión ejercido por células efectoras derivadas del timo, por las thyTreg-NT o thyTreg modificadas genéticamente sobre la proliferación de las CMSP totales y de las fracciones T CD8<sup>+</sup> CTv<sup>+</sup> y no-CD8 CTv<sup>+</sup>, se calculó comparando el porcentaje de proliferación de las células diana co-cultivadas con las células efectoras con el porcentaje de proliferación del control positivo, considerando cada uno de los picos de proliferación proporcionados por el CTv<sup>+</sup> y utilizando el “Método del índice de División” (185).

### V.7.2 Co-cultivo entre thyTreg-NT o los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR con CMSP totales

Para evaluar la función supresora de las thyTreg modificadas genéticamente con los diferentes tipos de UniCAR o de las propias células sin transducir, se

estudió su capacidad de inhibir la proliferación de CMSP totales en un co-cultivo, de una forma similar a lo descrito en el apartado V.7.1, con la salvedad de que, en este experimento, las células fueron pre-estimuladas antes del co-cultivo. Las células thyTreg-NT, thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28 y thyTreg-UniCAR41BB se consideran las células efectoras que van a ejercer presuntamente su función inhibidora sobre la proliferación de las células CMSP totales.

A día 7, las CMSP fueron obtenidas a partir de *buffy coats* (Ver apartado V.3.2) y fueron marcadas con 2 $\mu$ M de CTVio (Invitrogen). Acabado este marcaje, se cultivaron 1x10<sup>6</sup> células/pocillo de cada tipo celular de thyTreg en placas de cultivo de 24 pocillos (p24) y 1x10<sup>6</sup> células/ml de células CMSP-CTVio<sup>+</sup> en placas de cultivo de 6 pocillos (p6). A todas las condiciones se les añadió *Dynabeads* (Invitrogen) a ratio 1:2 (Dynabead : Células) por pocillo. Estos cultivos se realizaron en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich) suplementado con 600 U/ml de IL-2 (ImmunoTools) para las condiciones de las thyTreg-NT o los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR, y 300 U/ml en el caso de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>.

Tras 24 horas de estimulación, se retiraron las partículas de activación, se lavaron las células y se co-cultivaron 5x10<sup>4</sup> de células pre-estimuladas de cada tipo de thyTreg con diluciones seriadas de las células pre-estimuladas CMSP-CTVio correspondiendo a los ratios 2:1, 1:1 o 1:2 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>), en placas de cultivo de 96 pocillos (p96) con fondo en U. Como control negativo de proliferación, se cultivaron solas 1x10<sup>5</sup> CMSP-CTVio<sup>+</sup> sin estimular y, como control positivo de proliferación, se cultivaron solas 2,5x10<sup>4</sup> CMSP-CTVio<sup>+</sup> pre-estimuladas. A los co-cultivos y a los cultivos en solitario de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> pre-estimuladas se les añadió el Ac intermediario  $\alpha$ CD8-Biotina, o sus controles experimentales, el Ac  $\alpha$ CD8 sin biotina y el Ac IgG-Biotina (todos ellos a una concentración final en cada pocillo de 1,5  $\mu$ g/ml, Miltenyi Biotec.), junto con la condición control con ausencia de Ac. Todos los cultivos en solitario o co-cultivos de células fueron en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich) suplementado con 180 U/ml de IL-2 (ImmunoTools), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras

72 horas de co-cultivo, se retiró el sobrenadante de las condiciones experimentales y las células se marcaron superficialmente con  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD4,  $\alpha$ CD8,  $\alpha$ CD25,  $\alpha$ CD69,  $\alpha$ PD-1,  $\alpha$ CD71,  $\alpha$ ICOS y  $\alpha$ HLA-DR (Tabla 1) (ver Tabla 1) y la viabilidad con 7-AAD (ver Tabla 1) y la viabilidad con 7-AAD (Figura 12).

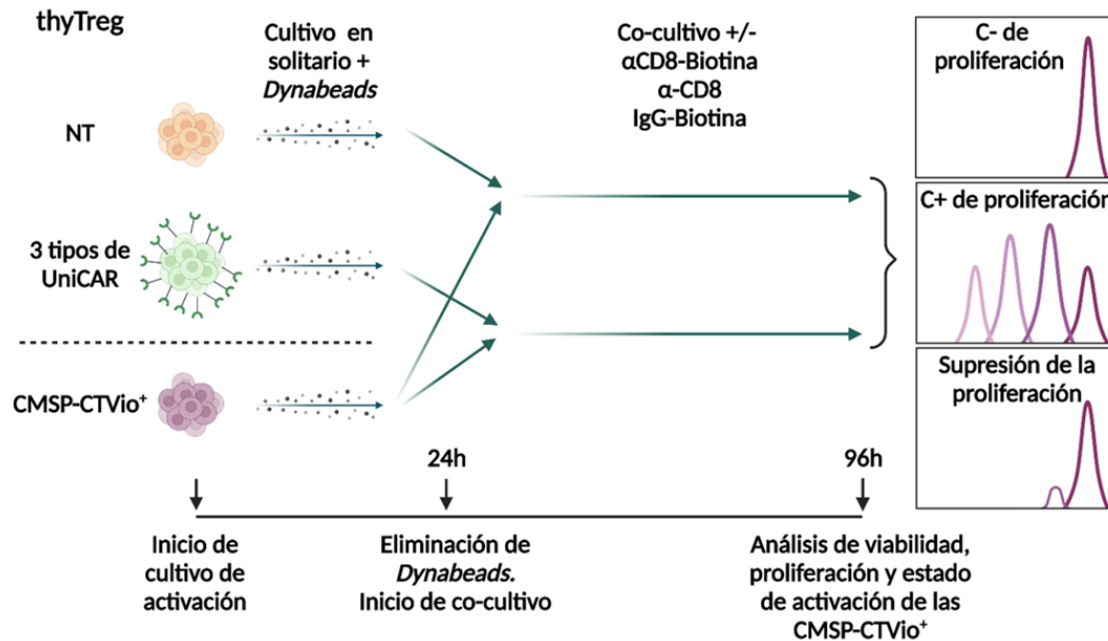


Figura 12. Esquema del protocolo de cultivo para estudiar la capacidad de las thyTreg-NT o de las diferentes thyTreg-UniCAR de inhibir la proliferación o estado de activación de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>. Figura creada con BioRender.

El porcentaje de supresión se calculó comparando el porcentaje de proliferación de las células diana co-cultivadas con las células efectoras frente al porcentaje de proliferación del control positivo de proliferación, tal y como ha sido descrito anteriormente.

Los sobrenadantes recogidos de estos experimentos fueron congelados a -80 °C para el análisis de las citoquinas (Ver apartado V.9)

### V.7.3 Co-cultivo thyTreg-NT y los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR con las fracciones celulares procedentes de CMSP

Con el mismo fin que los experimentos anteriores, este experimento tiene un diseño similar al descrito en el apartado V.7.2. Sin embargo, para estudiar en profundidad el efecto directo e indirecto observado en la capacidad de las thyTreg-NT o las diferentes thyTreg-UniCAR de inhibir la proliferación de las

CMSP, se aislaron las fracciones celulares T CD8<sup>+</sup> y no-CD8 a partir de las CMSP (Ver apartado V.3.2).

A día 7 de los experimentos, las CMSP se obtuvieron a partir de *buffy coats*. Una vez obtenidas las CMSP, se utilizó el kit de selección negativa (*CD8<sup>+</sup> T cell isolation kit*, human, Miltenyi). Las fracciones T CD8<sup>+</sup> y no-CD8 resultantes fueron marcadas con 2µM de CTVio (Invitrogen). Al igual que con las CMSP totales del apartado anterior (apartado V.7.2), acabado este marcaje, se cultivaron 1x10<sup>6</sup> células/pocillo de cada tipo celular de thyTreg en placas de cultivo de 24 pocillos (p24) y 1x10<sup>6</sup> células/ml de las fracciones T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y no-CD8 CTVio<sup>+</sup> en placas de cultivo de 6 pocillos (p6). Todas las condiciones fueron pre-estimuladas añadiendo *Dynabeads* (Invitrogen) a ratio 1:2 (*Dynabead* : Células) por pocillo. Como control negativo de proliferación, se cultivaron solas y sin estimular 1x10<sup>6</sup> de ambas fracciones T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y no-CD8-CTVio<sup>+</sup>. Estos cultivos se realizaron en RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich) suplementado con 600 U/ml de IL-2 (ImmunoTools), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> para las condiciones de las thyTreg-NT o los diferentes tipos de thyTreg-UniCAR, y 300 U/ml en el caso de las fracciones T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y no-CD8-CTVio<sup>+</sup>.

Tras 24 horas de estimulación, se retiraron las partículas de activación, se lavaron las células y se co-cultivaron 5x10<sup>4</sup> células de cada tipo de thyTreg con diluciones seriadas de las células pre-estimuladas de ambas fracciones T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y no-CD8-CTVio<sup>+</sup>, correspondiendo a los ratios 2:1, 1:1 o 1:2 (thyTreg : CTVio<sup>+</sup>), en placas de cultivo de 96 pocillos (p96) con fondo en U. Como control negativo de proliferación, se cultivaron solas 1x10<sup>5</sup> las ambas fracciones T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y no-CD8-CTVio<sup>+</sup> sin estimular y, como control positivo de proliferación, se cultivaron solas 2,5x10<sup>4</sup> de ambas fracciones T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y no-CD8-CTVio<sup>+</sup> pre-estimuladas. A los co-cultivos y a los cultivos en solitario de las células CTVio<sup>+</sup> pre-estimuladas se les añadió el Ac intermediario αCD8-Biotina, o sus controles experimentales, el Ac αCD8 sin biotina y el Ac IgG-Biotina (todos ellos a una concentración final en cada pocillo de 1,5 µg/ml, Miltenyi Biotec), junto con la condición control con ausencia de Ac. Todas las condiciones fueron cultivadas en RPMI 1640

(Biochrome) suplementado con 10% FBS (Biowest) y 1% ATB (Sigma-Aldrich) suplementado con 180 U/ml de IL-2 (ImmunoTools), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 72 horas de co-cultivo, las células se marcaron superficialmente con  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD4,  $\alpha$ CD8,  $\alpha$ CD25,  $\alpha$ CD69,  $\alpha$ PD-1,  $\alpha$ CD71,  $\alpha$ ICOS y  $\alpha$ HLA-DR (Tabla 1) (ver Tabla 1) y la viabilidad con 7-AAD (Figura 13).

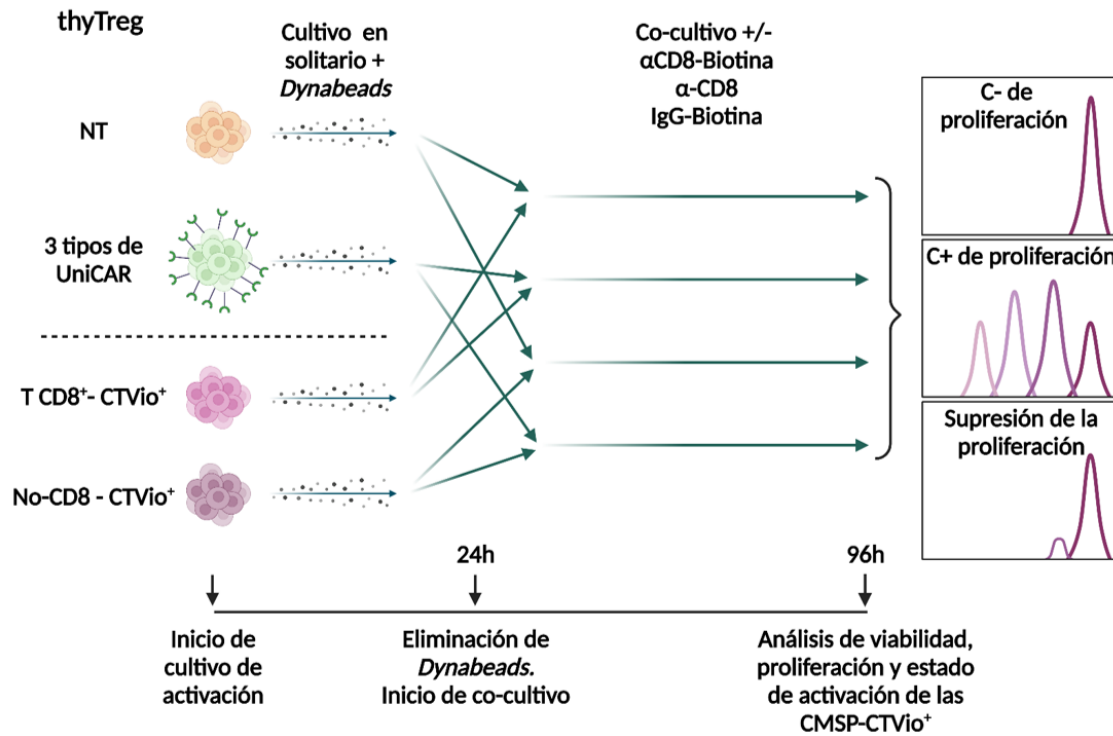


Figura 13. Esquema del protocolo de cultivo para estudiar la capacidad de las thyTreg-NT o de las diferentes thyTreg-UniCAR de inhibir la proliferación o estado de activación de las fracciones celulares T CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> y No-CD8-CTVio<sup>+</sup>, derivadas de las CMSP. Figura creada con BioRender.

El porcentaje de supresión se calculó comparando el porcentaje de proliferación de las células diana co-cultivadas con las células efectoras frente al porcentaje de proliferación del control positivo de proliferación, tal y como ha sido descrito anteriormente.

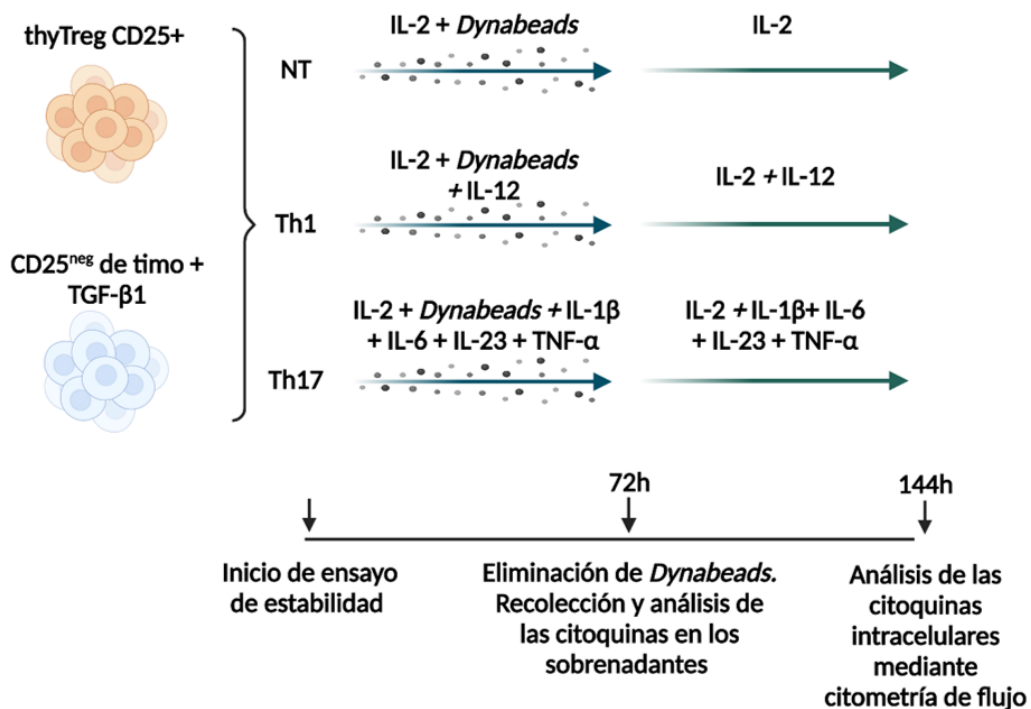
## V.8 Estabilidad fenotípica

### V.8.1 Estabilidad fenotípica bajo ambientes pro-inflamatorios de tipo Th1 o Th17

Para este ensayo se cultivaron  $1 \times 10^5$  células thyTreg CD25<sup>+</sup> y las diferentes condiciones las CD25<sup>neg</sup> derivadas del timo en medio X-vivo15 (Lonza)

complementado con 5% SAB (Sigma-Aldrich), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, y se re-estimularon con *Dynabeads* (Invitrogen) a ratio 1:2 (*Dynabead* : Células) por pocillo. Estas células fueron cultivadas con las siguientes citoquinas: 600 U/ml de IL-2 como condición control (NT); 600 U/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-12 como condición polarizante hacia un fenotipo Th1; y 600 U/ml de IL-2, 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de IL-23 y 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  como condición polarizante hacia un fenotipo Th17 [todas las citoquinas utilizadas en este apartado fueron de ImmunoTools (112)]. Tras 72h de cultivo, se recuperaron los sobrenadantes, que se conservaron a -80 °C (Ver apartado V.9) y se retiraron las partículas de re-estimulación (Figura 14).

En este momento, las células fueron cultivadas de nuevo en presencia de las mismas citoquinas polarizantes durante 72h más. Transcurrido este tiempo, las células fueron recuperadas y estimuladas con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, por sus siglas en inglés; 50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e Ionomicina (1  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) durante 5,5h y con Brefeldina (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) durante las dos últimas horas de incubación. Después, las células fueron lavadas, teñidas superficial e intracelularmente, junto con un marcador de viabilidad, tal y como está descrito anteriormente (Tabla 1).



**Figura 14. Esquema del protocolo de cultivo para estudiar la estabilidad en ambientes pro-inflamatorios polarizantes hacia los fenotipos Th1 y Th17 de las fracciones celulares derivadas del timo.** Figura creada con BioRender.

### V.8.2 Perfil de producción de citoquinas de los timocitos CD25<sup>neg</sup> transducidas con MSCV-FOXP3

Para determinar la producción de citoquinas de todas las fracciones de células CD25<sup>neg</sup> o CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> (Ver apartado V.4.1 y V.4.2), a los días 7 y día 14, estas células fueron estimuladas con PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e Ionomicina (1 µg/ml; Sigma-Aldrich) durante 5,5h y con Brefeldina (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) durante las dos últimas horas más de incubación. Transcurrido este periodo, las células fueron lavadas, teñidas superficial e intracelularmente, junto con un marcador de viabilidad, tal y como está descrito anteriormente (Tabla 1).

## V.9 Análisis de citoquinas en sobrenadante de cultivo.

Tras los cultivos de los diferentes tipos celulares derivados del timo en los cultivos de estabilidad (Ver apartado V.8.1) se llevó a cabo la cuantificación de citoquinas en los sobrenadantes. Tras la descongelación de los sobrenadantes, se centrifugaron para eliminar posibles restos celulares. Después, se procesaron siguiendo las indicaciones de los fabricantes y se analizaron. Las citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los cultivos de estabilidad en condición polarizante hacia Th17 y la IL-17 fueron medidas por triplicado mediante ELISA (Abcam).

En el caso de las citoquinas presentes en los sobrenadantes de los co-cultivos entre las thyTreg-NT o thyTreg-UniCAR con las CMSP totales (Ver apartado V.7.2), se utilizó el sistema de inmunoensayos automatizados ELLA *Protein-Simple* (Biotechne, Minneapolis, Minnesota, EEUU) para medir las citoquinas IL-10, IL-2, IFN-γ, TNF-α e IL-6. Esta tecnología es equivalente a la realización de ELISA, pero completamente automatizado y con la capacidad de medir varias citoquinas simultáneamente. Además, es un método reproducible y parte de una cantidad mínima de sobrenadante gracias a un sistema de

microfluídica. Los cartuchos utilizados por esta tecnología analizan por triplicado cada una de las citoquinas presentes en los sobrenadantes.

## V.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8 (para Windows 11) con el apoyo de la Unidad de Bioestadística (Dr. José M<sup>a</sup> Bellón) del IiSGM. Las medidas, sus desviaciones de error y los tipos de métodos estadísticos utilizados serán concretados en sus respectivos pies de figura. Resultados estadísticos con una  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativo.

## VI. Resultados



Como ha sido descrito previamente, existe un gran interés en aprovechar el potencial inmunosupresor de las células Treg frente a enfermedades relacionadas con un descontrol en los mecanismos de tolerancia del SI. Una de las principales conclusiones de los ensayos preclínicos y clínicos con el uso de dichas células, ya sean provenientes de sangre periférica, de cordón umbilical o derivadas de células madre, es que las Treg son más eficaces y con un fenotipo más estable cuanto más *naive* son. Basándonos en estos conocimientos, y gracias al desarrollo previo un novedoso protocolo de obtención y expansión de las thyTreg llevado a cabo en nuestro laboratorio, en el presente trabajo hemos intentado explotar esta nueva fuente de obtención de thyTreg y de expandir aún más sus posibilidades terapéuticas.

## VI.1 La expresión ectópica de FOXP3, en combinación con la estimulación de TGF- $\beta$ 1 e IL-2, genera una limitada capacidad supresora en timocitos primarios humanos estimulados *ex vivo*.

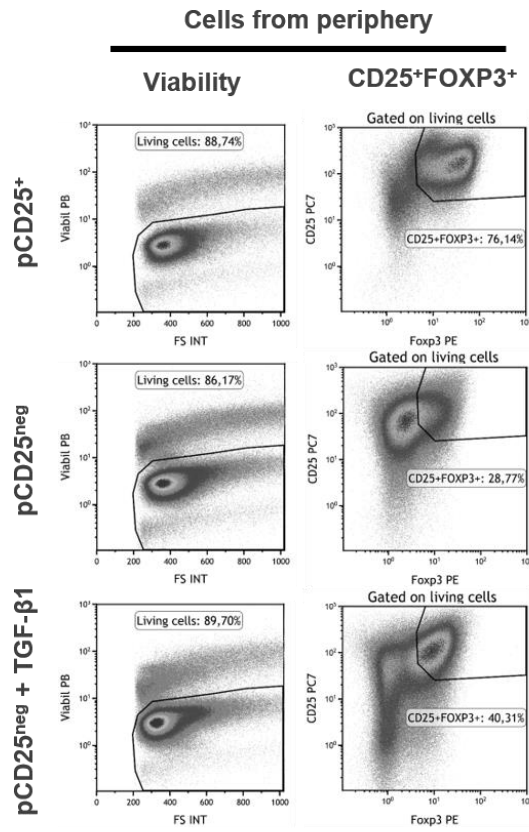
Los timocitos son, en su mayor parte, células inmaduras que están en diferentes fases de desarrollo para dar lugar a linfocitos T (5). Dentro de estos timocitos, además, se encuentran células ya maduras, como las células Treg naturales originadas en el timo (tTreg). Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que se pueden aislar células Treg de timo que, tras expandirlas *ex vivo*, dan lugar a una cantidad masiva de thyTreg con unas excelentes cualidades terapéuticas (112). En el mismo proceso de disgregación del tejido tímico se obtiene también una inmensa cantidad de timocitos y células DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> inmaduras, así como células Tconv *naive* CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Se ha demostrado que se pueden inducir Treg (dando lugar a las iTreg) a partir de células T CD4<sup>+</sup> *naive* de sangre periférica (62, 72). Sin embargo, hasta ahora se desconoce si las mismas condiciones de tratamiento que se han utilizado en Tconv para inducir iTreg serían capaces de inducir thyTreg a partir de los timocitos CD25<sup>neg</sup>. De ser posible, los timocitos supondrían una fuente aún mayor de thyTreg *naive*.

### **VI.1.1 TGF- $\beta$ 1 induce una expresión estable del CD25 y del FOXP3 en las células T procedentes de la sangre periférica**

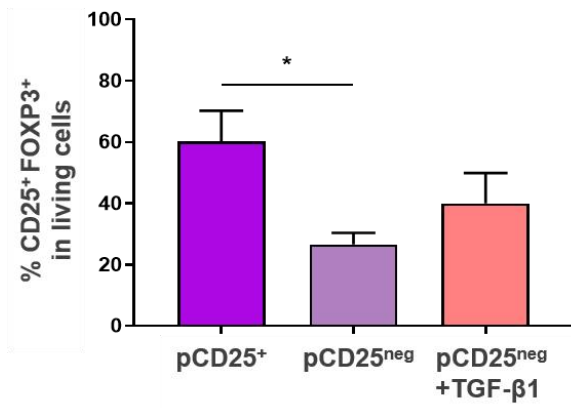
Se ha descrito que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 y altas dosis de IL-2 aumenta la expresión del FOXP3 en las Tconv *naive* de periferia (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>), generando iTreg funcionales, pero disminuyendo la proliferación celular (62). Para verificar que éramos capaces de replicar estos resultados, aislamos células Tconv CD25<sup>neg</sup> *naive* a partir de CMSP de periferia (pCD25<sup>neg</sup>) y las estimulamos con *Dynabeads* durante 3 días. Además, las células fueron cultivadas en presencia de IL-2 y, si correspondía, TGF- $\beta$ 1 durante 7 días (Ver apartados V.3.2 y V.4.1).

Como era de esperar, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 indujo una alta expresión del CD25 y del FOXP3 en Tconv pCD25<sup>neg</sup> a día 7 (Figura 15A y B) en comparación con las Tconv sin TGF- $\beta$ 1, aunque sin alcanzar el mismo nivel que en las pTreg CD25<sup>+</sup> (pCD25<sup>+</sup>). Además, las células tratadas con TGF- $\beta$ 1 presentaron una proliferación ligeramente menor que sus respectivos controles no tratados, mostrando que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 modificó las células Tconv periféricas, tal y como había sido previamente descrito (Figura 15C).

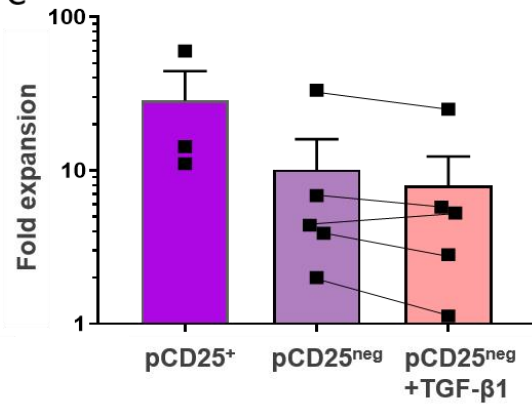
A



B



C



**Figura 15: Generación de iTreg a partir de Tconv de periferia.** (A) La viabilidad de las células, y los marcadores FOXP3 y CD25 fueron estudiados mediante citometría de flujo en las fracciones nTreg CD25<sup>+</sup> (pCD25<sup>+</sup>), CD25<sup>neg</sup> (pCD25<sup>neg</sup>) y CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1 (pCD25<sup>neg</sup> +TGF-β1) derivadas de las CMSP. Los diagramas de puntos son un ejemplo representativo de tres donantes independientes para las pCD25<sup>+</sup>, y de 5 para ambas fracciones pCD25<sup>neg</sup>. (B) Histogramas que representan el porcentaje de la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dentro de las células vivas, estudiadas a día 7 desde el inicio del experimento, en las diferentes condiciones. Media ± SEM de tres experimentos independientes para las pCD25<sup>+</sup> y de 5 para ambas fracciones pCD25<sup>neg</sup>. (C) Ratio de expansión de las células entre el día 3 y el día 7 del experimento. Cada símbolo corresponde con un donante y las líneas conectan las diferentes condiciones procedentes del mismo donante. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando p<0,05. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor. Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

### VI.1.2 TGF-β1 mantiene una alta expresión del CD25 y del FOXP3 en las CD25<sup>neg</sup> derivadas de timocitos

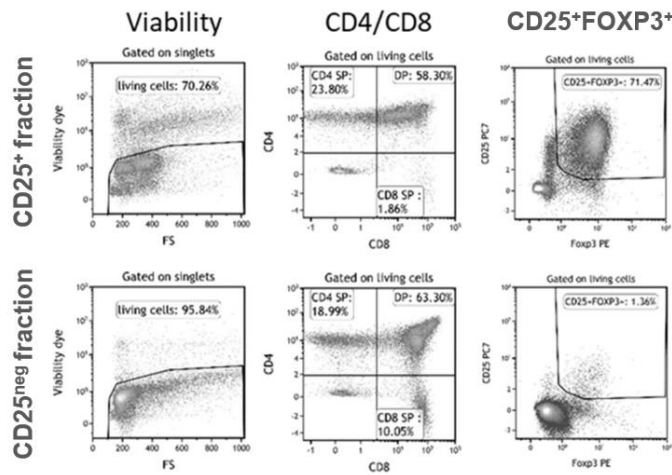
Una vez validada la capacidad del tratamiento con IL-2 y TGF-β1 para generar iTreg a partir de Tconv *naive* de periferia, se estudió la posibilidad de inducir thyTreg humanas a partir de timocitos. Para ello, extrajimos los timocitos del timo y luego aislamos las fracciones thyTreg o CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup> (Ver apartado V.3.1). El día 0, día del aislamiento celular, la mayor parte de la fracción CD25<sup>neg</sup> era DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, y mostraba una baja expresión del CD25 y el FOXP3. A pesar de que el fenotipo de la fracción CD25<sup>+</sup> fue también principalmente DP, estas células mostraron una muy alta expresión del CD25 y del FOXP3. Además, ambas fracciones mostraron una minoría de células CD8<sup>+</sup> SP (Figura 16A).

Siguiendo el mismo protocolo que con las células extraídas de sangre periférica (Ver apartado V.4.1), las células CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup> fueron estimuladas con *Dynabeads* durante tres días, en presencia de IL-2 y, cuando correspondiera en las CD25<sup>neg</sup>, del TGF-β1. Una vez retiradas las *Dynabeads*, examinamos la viabilidad y el fenotipo de los cultivos celulares en los días 3, 7 y 10 después del inicio del cultivo. Según los resultados, no se observan diferencias significativas en la viabilidad (Figura 16B) ni en la proliferación celular (Figura 16C) entre cualquiera de las condiciones. De hecho, la población CD25<sup>+</sup> proliferó un promedio de cuatro ciclos de expansión ( $4.06 \pm 1.57$ , media ± SEM) y la fracción CD25<sup>neg</sup>, tratada o no con TGF-β1, mostraron

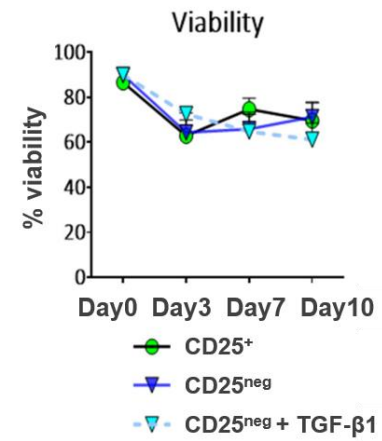
una media de  $2,90 \pm 0,54$  y  $3,00 \pm 0,98$  ciclos de expansión, respectivamente (media  $\pm$  SEM). Enfocándonos en el fenotipo celular, se analizó la frecuencia de la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. A día 3, se pudo apreciar un aumento significativo del porcentaje de la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en todas las fracciones CD25<sup>neg</sup>, alcanzando niveles equivalentes a las CD25<sup>+</sup>. Sin embargo, este aumento en la fracción de células CD25<sup>neg</sup> no tratadas con TGF- $\beta$ 1 resultó ser transitorio, pues se redujo paulatinamente en los días siguientes. Por el contrario, a pesar de que la expresión del CD25 y del FOXP3 en la fracción de células CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF- $\beta$ 1 también alcanza su máximo a día 3, esta se mantuvo más elevada durante los 10 días que duró el cultivo con respecto a las CD25<sup>neg</sup> sin TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, en ambos casos fue inferior a la expresión mostrada por la condición de thyTreg CD25<sup>+</sup> los días 7 y 10 de cultivo ( $70,69 \pm 5,88\%$  en la fracción de CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF- $\beta$ 1 y  $89,62 \pm 3,35\%$  en las células thyTreg CD25<sup>+</sup>, el día 10 de cultivo. Media  $\pm$  SEM. Figura 16D).

Se analizó también si estas células expresaban otros marcadores asociados a la función reguladora de las Treg, como el CD39 o CTLA-4, dos marcadores asociados a la función reguladora en Treg (44, 188). El día del aislamiento celular, la expresión de CD39 en la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> fue significativamente diferente entre la fracción CD25<sup>+</sup> ( $37,64 \pm 5,31\%$ , media  $\pm$  SEM) y la fracción CD25<sup>neg</sup> ( $11,54 \pm 2,24\%$ , media  $\pm$  SEM) (Figura 16E). A medida que avanzaron los días de cultivo, esta expresión del CD39 en la condición de CD25<sup>neg</sup> aumentó con el paso de los días de cultivo, independientemente de si las células fueron tratadas, o no, con TGF- $\beta$ 1, mientras que la expresión disminuyó progresivamente en la fracción CD25<sup>+</sup> (Figura 16E). En el caso del CTLA-4, este fue altamente expresado en todas las condiciones el día del aislamiento, con un pico de expresión en el día 3 en la fracción CD25<sup>+</sup> ( $82,95 \pm 3,43\%$ ) y en la condición de células CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF- $\beta$ 1 ( $74,81 \pm 4,83\%$ , media  $\pm$  SEM). Sin embargo, su expresión fue decreciendo a lo largo de los días de cultivo en todas las condiciones (thyTreg CD25<sup>+</sup>:  $34,10 \pm 15,98\%$ ; y CD25<sup>neg</sup> tratado con TGF- $\beta$ 1:  $43,75 \pm 13,53\%$ , a día 10 después del inicio del cultivo, media  $\pm$  SEM, Figura 16F).

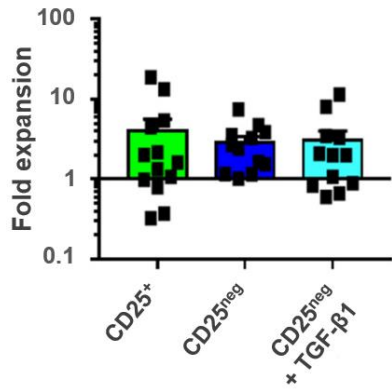
**A**



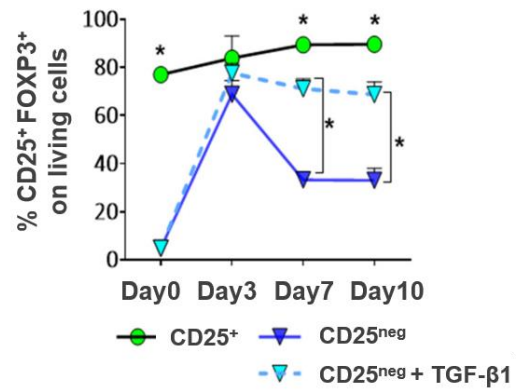
**B**



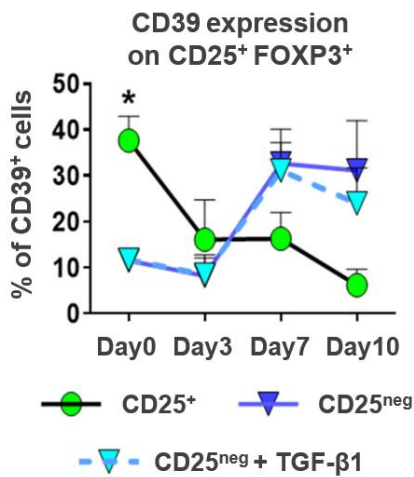
**C**



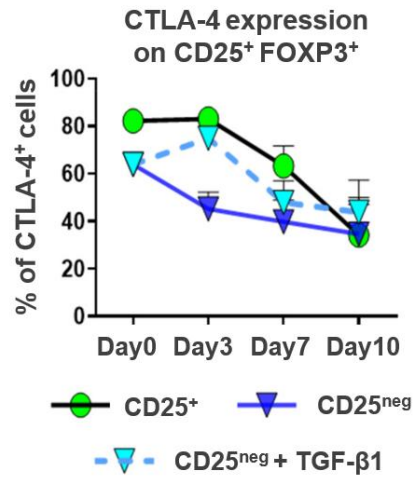
**D**



**E**



**F**



**Figura 16. Viabilidad y fenotipo después del aislamiento y durante el cultivo celular de las células extraídas del timo.** Las thyTreg CD25<sup>+</sup> y las fracciones CD25<sup>neg</sup> son, respectivamente, las fracciones positiva y negativa de la selección del CD25 de los timocitos. (A) Los diagramas de puntos representan el porcentaje de viabilidad, las subpoblaciones de CD4/CD8 y la expresión de CD25/FOXP3 tras el marcaje de cada fracción el día del aislamiento celular medidos por citometría de flujo. Estos diagramas de puntos pertenecen a un experimento representativo de 14. Células CD4<sup>+</sup> simples positivas (CD4SP); Células CD8<sup>+</sup> simples positivas (CD8SP); y células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dobles positivas (DP). (B) Evolución de los porcentajes medios de células viables a lo largo de 10 días de cultivo. (C) Factor multiplicador de la expansión de las células entre los días 3 y 7 de cultivo; cada símbolo corresponde a un individuo. (D) Evolución del fenotipo regulador estudiando la media de los porcentajes de expresión de los marcadores CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en las células vivas a lo largo de 10 días de cultivo. (E) Evolución de la media de los porcentajes de expresión del marcador CD39 en la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> vivas a lo largo de 10 días de cultivo. (F) Evolución de la media de los porcentajes de expresión del marcador CTLA-4 en la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> vivas a lo largo de 10 días de cultivo. Se muestra la media  $\pm$  SEM de 14 experimentos independientes en cada condición. Diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ . Un \* sobre los puntos en la gráfica representa una diferencia significativa de todas las condiciones con respecto al CD25<sup>+</sup>. Un \* lateral con líneas de conexión representa diferencias significativas entre las condiciones indicadas. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores. Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

En resumen, las células primarias derivadas de timocitos humanos, cuando se estimulan adecuadamente, pueden ser mantenidas en cultivo *ex vivo* durante, al menos, 10 días, presentando una alta viabilidad y capacidad proliferativa. Además, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 mantuvo una alta expresión de CD25, FOXP3 y CTLA-4, así como la adquisición del marcador CD39 en la condición CD25<sup>neg</sup> del timo.

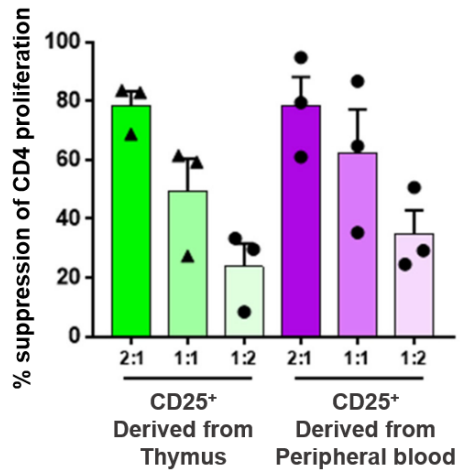
### VI.1.3 El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 no induce una capacidad supresora robusta en las células CD25<sup>neg</sup> derivadas de timocitos

Dado que la fracción de CD25<sup>neg</sup> +TGF- $\beta$ 1 adquirieron un fenotipo de tipo regulador constituido por la expresión de CD25, FOXP3, CTLA-4 y CD39, estudiamos si estas células pudieron desarrollar una función supresora similar a la de las thyTreg CD25<sup>+</sup>. Para ello, analizamos la capacidad supresora de las células el día 7 midiendo su capacidad para inhibir la proliferación de CMSP alogénicas marcadas con CTVio (Ver apartado V.7.1).

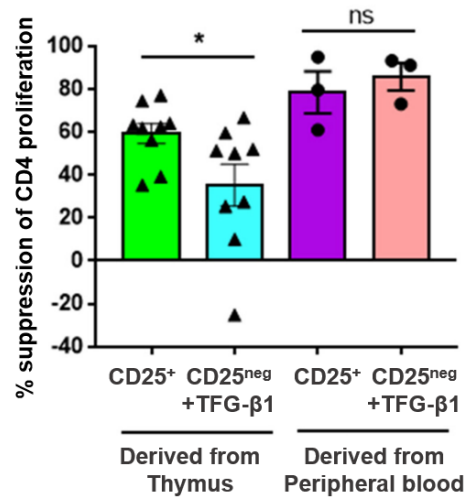
Las células thyTreg CD25<sup>+</sup> limitaron la proliferación de células CTVio<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de forma eficiente y dosis-dependiente. Además, esta supresión fue similar a la ejercida por las pCD25<sup>+</sup> (Figura 17A). Las células pCD25<sup>neg</sup> *naive* +TGF-β1 redujeron la proliferación de las CTVio<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> alogénicas de una forma similar a la mostrada por las pCD25<sup>+</sup>. Sin embargo, las células CD25<sup>neg</sup> derivadas del timo con TGF-β1 sólo pudieron limitar parcialmente la proliferación y de una forma muy heterogénea (Figura 17B). Finalmente, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de expresión del CTLA-4 y del CD39 en ambas fracciones CD25<sup>neg</sup> (CD25<sup>neg</sup> y CD25<sup>neg</sup> + TGF-β1) derivadas del timo con la función supresora ejercida por esas mismas células (p = 0,0257 y p = 0.0349, respectivamente. Figura 17C y D).

Por lo tanto, aunque el TGF-β1 mantuvo una alta expresión del FOXP3 en las células CD25<sup>neg</sup> derivadas del timo, estas no desarrollaron una función supresora similar a la observada en las thyTreg CD25 ni en las Tconv *naive* CD25<sup>neg</sup> de periferia tratadas con el TGF-β1. Además, esta heterogénea capacidad de supresión fue correlacionada con la expresión de CTLA-4 y CD39, lo que podría indicar que una adquisición estable de estos marcadores es imprescindible para la función supresora.

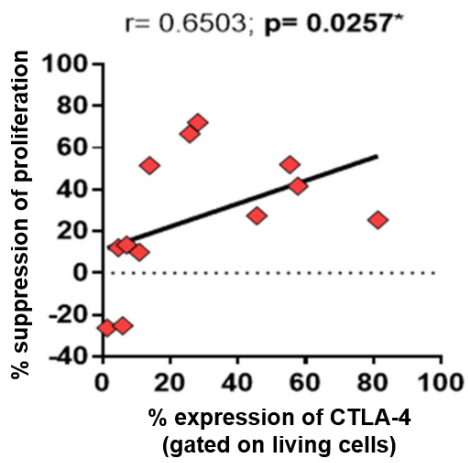
A



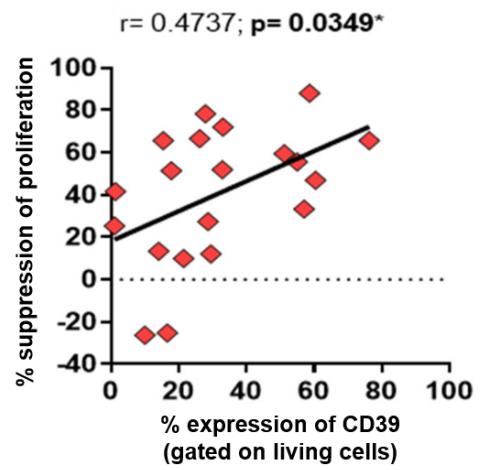
B



C



D

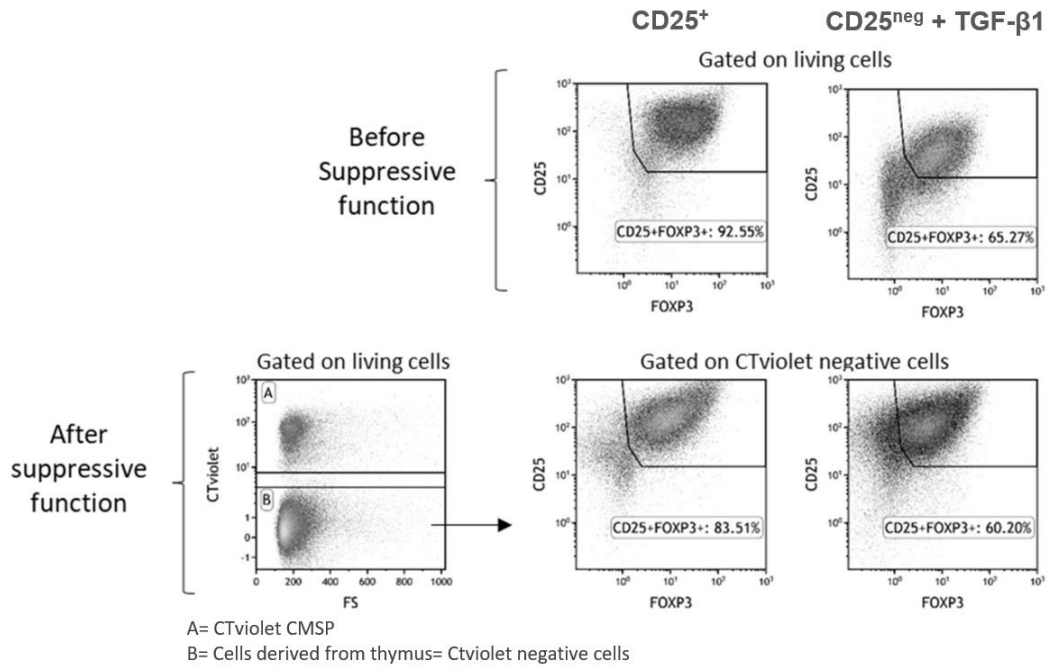


**Figura 17. Supresión de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> alogénicas por las células supresoras derivadas del timo y de la periferia.** (A) Porcentaje de supresión de la proliferación de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> después de 3 días de co-cultivo con CD25<sup>+</sup> derivadas de timo (thyTreg) y de periferia (nTreg), a ratios 2:1, 1:1 y 1:2 (células CD25<sup>+</sup>: células CTVio<sup>+</sup>). El porcentaje de supresión se calculó siguiendo el método del índice de división (185). Cada símbolo corresponde a un individuo. (B) Porcentaje de supresión de la proliferación de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> después de 3 días de co-cultivo con células CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF-β1 derivadas del timo o de sangre periférica. Los valores negativos corresponden a un aumento de la proliferación de las células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Cada símbolo corresponde a un individuo. (C) Correlación y regresión lineal (línea negra) entre el porcentaje de supresión de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de expresión del CTLA-4 (en CD25<sup>neg</sup> y CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1, valorado en células CTVio<sup>neg</sup> vivas). (D) Correlación y regresión lineal (línea negra) entre el porcentaje de supresión de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de expresión del CD39<sup>+</sup> (en CD25<sup>neg</sup> y CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1, valorado en células CTVio<sup>neg</sup> vivas). Cada símbolo corresponde a un individuo. Diferencias significativas \* cuando p<0,05; ns=no significativo. Estadística proporcionada por test T de Student. Las correlaciones se determinaron mediante la correlación de rangos de Spearman, y r es el coeficiente de correlación de Spearman. \* p < 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

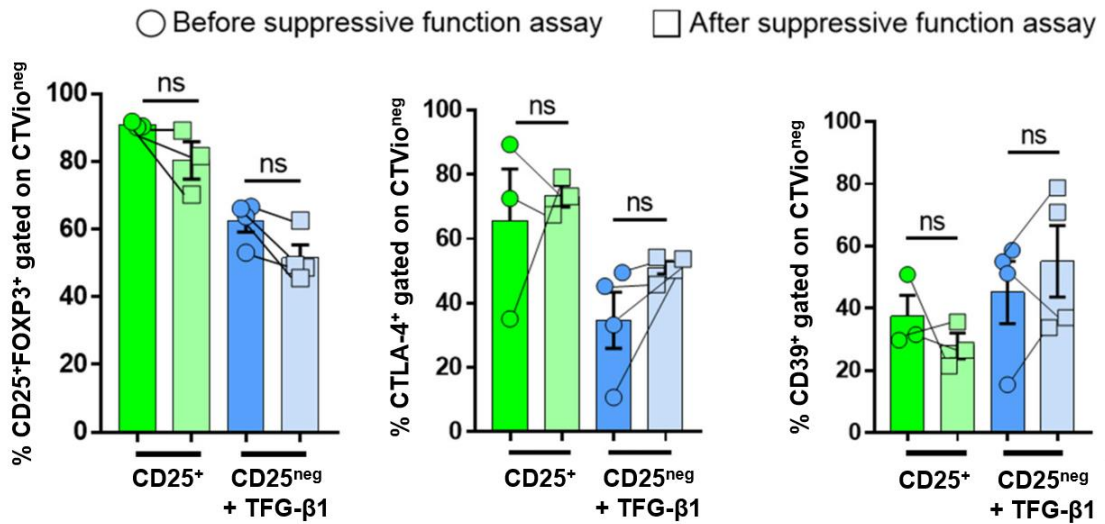
#### VI.1.4 Las CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1 mantienen el fenotipo tras el ensayo de supresión

Esta capacidad supresora heterogénea mostrada por las células de timo CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1 podría estar relacionado con la inestabilidad fenotípica. Por lo tanto, comprobamos los marcadores celulares asociados a Treg antes y después del ensayo de supresión (Figura 18A). Aunque la expresión del CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en las thyTreg CD25<sup>+</sup> disminuye ligeramente al finalizar el ensayo de supresión, su expresión seguía siendo superior a la de la condición CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1, que también se vio ligeramente reducida. Por otra parte, la expresión de los marcadores CD39 y CTLA-4 no cambiaron en ambas subpoblaciones (Figura 18B). Por lo tanto, la falta de una función supresora homogénea por parte de las células CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1, comparándola con las células thyTreg CD25<sup>+</sup>, no pudo ser explicada debido a una pérdida de la expresión de las proteínas asociadas con la supresión durante los tres días de duración del co-cultivo en el ensayo de supresión.

A



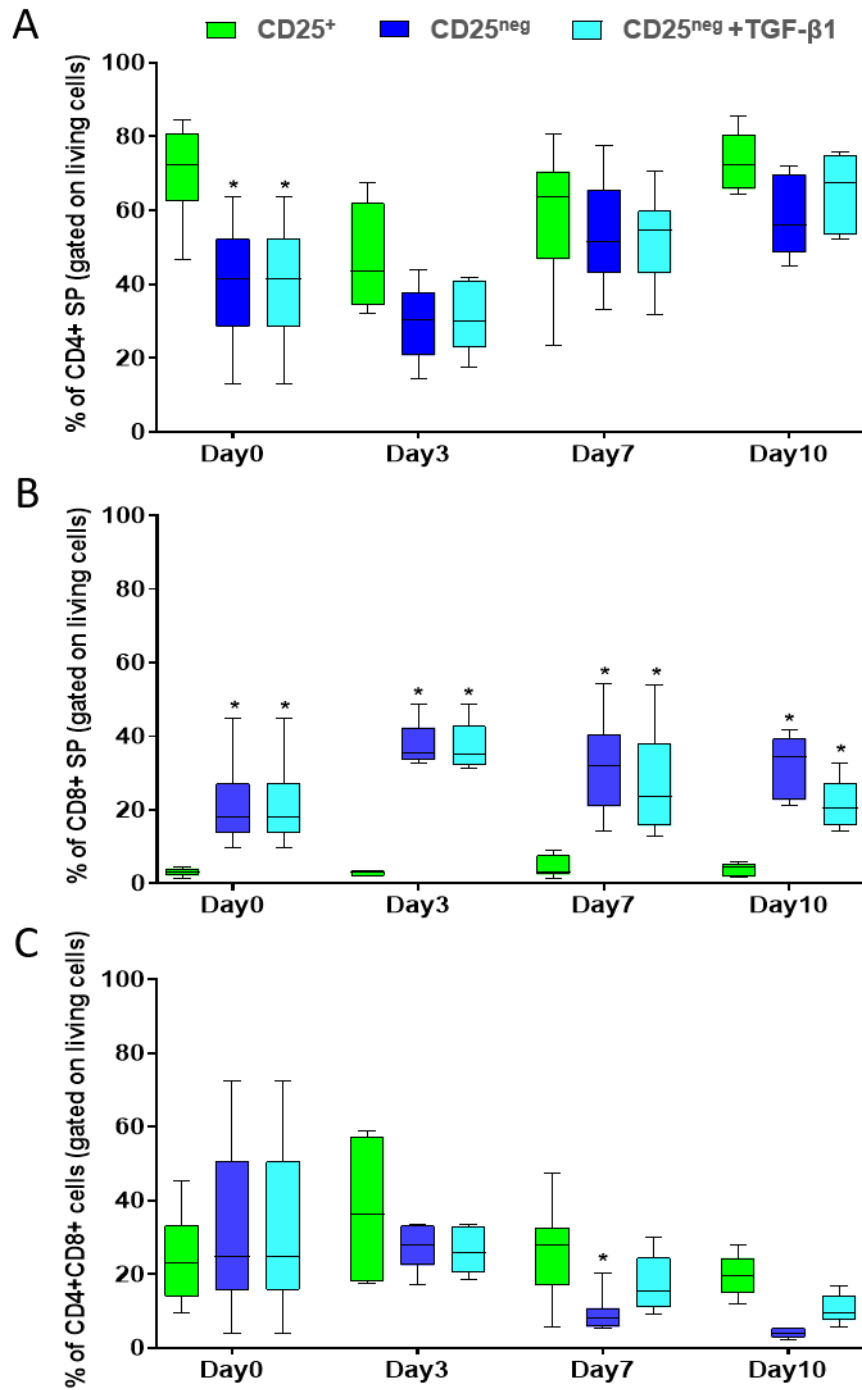
B



**Figura 18. Fenotipo celular antes y después del ensayo de supresión.** Después de 7 días de cultivo, las CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1 (células efectoras) se co-cultivaron durante 3 días con CMSP alogénicas marcadas con CTVio, a ratio 2:1 (células efectoras : célula CTVio<sup>+</sup>). (A) En el panel superior se muestran diagramas de puntos con el porcentaje de los marcadores CD25/FOXP3 de cada fracción en el día 7 de experimento, antes del inicio del ensayo de supresión. En el panel inferior se muestran diagramas de puntos con la estrategia de análisis utilizada después del ensayo de supresión. Para analizar los marcadores celulares de las fracciones derivadas del timo, se analizaron las células negativas para CTVio. Los diagramas de puntos pertenecen a un experimento representativo de 3 o 4 experimentos. (B) Histogramas que representan la frecuencia de CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (izquierda), CTLA-4<sup>+</sup> (centro) y CD39<sup>+</sup> (derecha) de las células vivas CTVio negativas antes y después del ensayo de supresión. Cada símbolo corresponde a un individuo. ns= no significativo. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de 2 factores. Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

#### **VI.1.5 La depleción de las células CD8<sup>+</sup> y la expresión ectópica del FOXP3 en las células CD25<sup>neg</sup> +TGF- $\beta$ 1 derivadas del timo no incrementa su capacidad supresora**

Para intentar explicar las anteriores diferencias observadas entre las thyTreg y las CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1, estudiamos más en profundidad las subpoblaciones de partida que componen a esas fracciones. Como se puede observar, la subpoblación CD4SP representó la mayoría de las células en todas las condiciones del cultivo, y su proporción aumentaba a medida que transcurrían el tiempo de cultivo, especialmente en ambas fracciones CD25<sup>neg</sup> (Figura 19A). Por otro lado, se muestran diferencias significativas en la frecuencia de la subpoblación CD8SP en ambas condiciones CD25<sup>neg</sup>, sin y con TGF- $\beta$ 1, en todos los días desde el inicio del cultivo. En el caso de la subpoblación DP, a pesar de que no se observen diferencias significativas, la fracción CD25<sup>+</sup> presenta porcentajes más elevados a los del resto de fracciones CD25<sup>neg</sup> (Figura 19B y C). En este contexto, aunque se han descrito células con funcionalidad supresora y con un fenotipo CD8<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>, nos preguntamos si esta alta presencia de la subpoblación CD8SP en la fracción CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1 podría explicar la inestabilidad observada en su expresión del FOXP3 y, también, su heterogénea capacidad para desarrollar una correcta función supresora.



**Figura 19. Frecuencias de las subpoblaciones CD4, CD8 y DP en las células derivadas del timo a lo largo de los días de cultivo.** Diagrama de cajas y bigotes que representa la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo de la frecuencia de las subpoblaciones (A) CD4SP, (B) CD8SP y (C) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP, a lo largo de los 10 días de cultivo. Medianas de n=10 experimentos independientes a día 0, de n=6 a día 3 y 10, y de n=9 a día 7, en cada condición. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando p<0,05. Diferencias significativas cuando se comparan con la fracción de células CD25<sup>+</sup>. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores. Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

Por lo tanto, con la intención de asegurar que las fracciones CD8SP y DP no estuvieran influyendo en la estabilidad y la funcionalidad de las CD25<sup>neg</sup>, purificamos la fracción CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, reduciendo la presencia de la población CD8SP con respecto a los timocitos de partida (Tabla 2).

	A) Cellular Subsets Analysed			B) Statistic Comparison	
	Total Thymocytes (%)	thyTreg CD25 <sup>+</sup> subset (%)	CD25 <sup>neg</sup> CD8 <sup>neg</sup> subset (%)	<i>P</i> CD25 <sup>+</sup> vs Thymocytes	<i>P</i> CD25 <sup>+</sup> vs CD25 <sup>neg</sup> CD8 <sup>neg</sup>
Living cells	69,81 ± 4,99	83,22 ± 2,29	81,86 ± 3,40	0.1494	>0.999
CD8SP	12,76 ± 2,47	2,67 ± 0,65	4,63 ± 1,39	0.0643	0.6858
CD4SP	37,51 ± 4,44	69.62 ± 2,47	59,97 ± 6,41	<b>0.0010</b>	<b>&gt;0.999</b>
CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	5,38 ± 0,30	77,44 ± 3,74	2,65 ± 0,46	<b>0.0004</b>	<b>0.0004</b>
CTLA-4 in CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	64,96 ± 5,86	77,87 ± 3,47	56,83 ± 9,03	0.1863	0.2215
CD39 in CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	23,39 ± 3,88	36,70 ± 7.96	11,13 ± 2,19	0.5334	0.2803
Treg (CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> in CD4SP)	11,59 ± 0,91	82,38 ± 2,69	4,18 ± 0,96	<b>0.0002</b>	<b>0.0001</b>

**Tabla 2. Frecuencias de viabilidad y marcadores celulares el día del aislamiento celular.** (A) Medias ± SEM de las frecuencias de células vivas, CD8SP, CD4SP, CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (en el total de células vivas), CTLA-4 (dentro de la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), CD39 (dentro de la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) y el fenotipo clásico Treg (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dentro de las CD4SP) en las tres fracciones diferentes obtenidas el día del aislamiento celular (timocitos totales, thyTreg CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>), obtenidas mediante análisis de citometría de flujo. (B) Comparación estadística entre las medias ± SEM de todas las subpoblaciones entre las fracciones CD25<sup>+</sup> y timocitos y entre CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, donde *p* < 0,05, \* y destacado en negrita, se considera significativo. Comparaciones estadísticas proporcionadas por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor. Tabla publicada en Gallego et al., 2021 (187).

Anteriormente, los resultados han mostrado que la expresión del CD25 y del FOXP3 en las CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF-β1, a pesar de mantenerse elevada, era inferior a la de las CD25<sup>+</sup> y se veía reducida tras un co-cultivo celular, desencadenando una heterogénea e inestable capacidad supresora. Con el fin de estabilizarla, además de eliminar las subpoblaciones que expresaban el CD8, se intentó sobre-expresar un FOXP3 ectópico que no estuviera sujeto a las regulaciones genéticas o epigenéticas de las células. Para ello, las

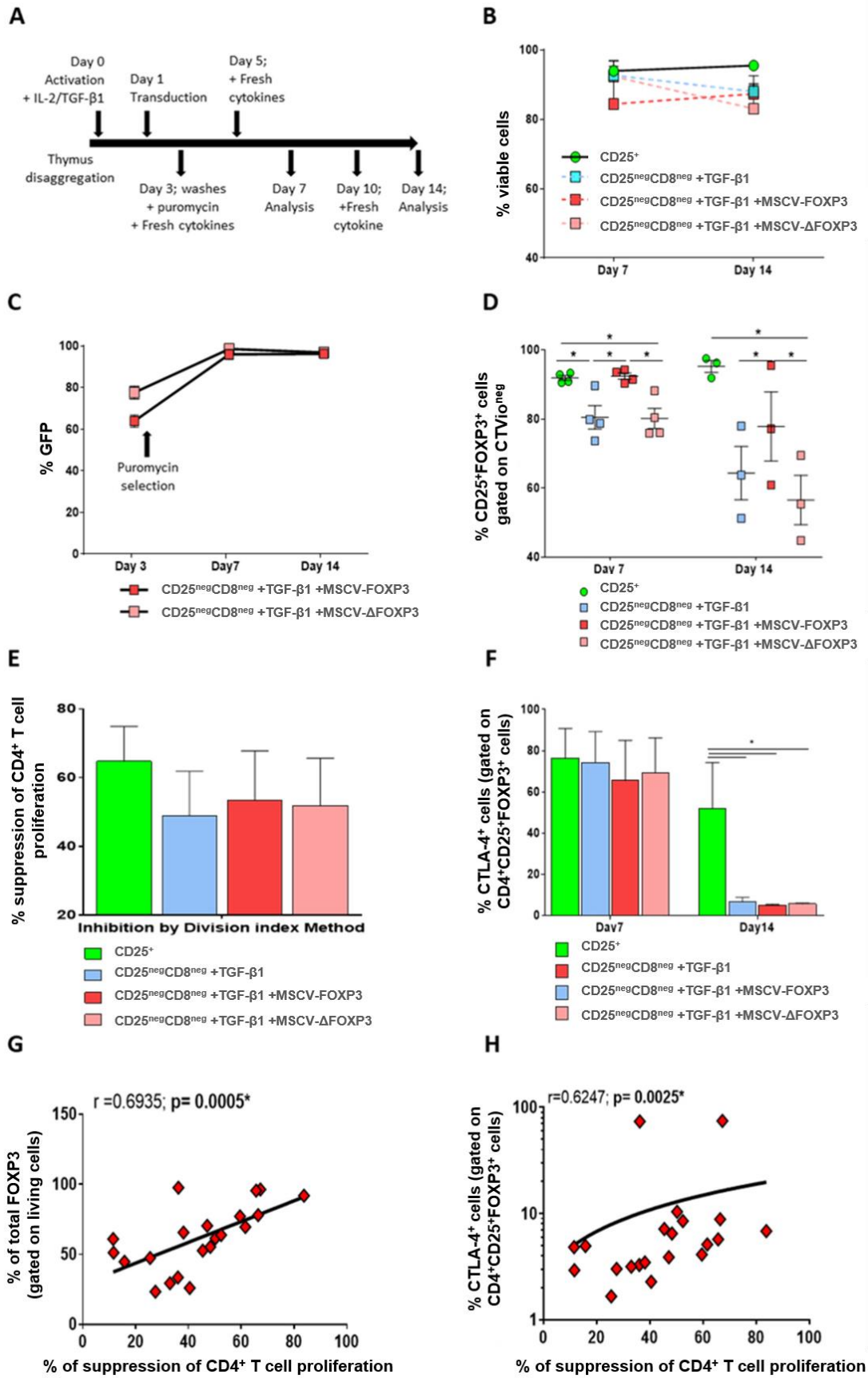
CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fueron transducidas con vectores lentivirales MSCV-FOXP3 o MSCV- $\Delta$ FOXP3 (vector control), en combinación con estimulación proporcionada por las *Dynabeads*, con la IL-2 y con el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 (Ver apartados V.3.1 y V.4.2) (Figura 20A).

Los resultados muestran que todas las fracciones celulares presentaban más del 60% de viabilidad (Figura 20B). Además, gracias a la proteína EGFP, codificada por los vectores aquí empleados, fuimos capaces de determinar el porcentaje de las células correctamente transducidas. A día 7, tras el tratamiento con puromicina para seleccionar las células correctamente transducidas, casi todas las células expresaban eficientemente la proteína EGFP ( $97.60 \pm 1.16\%$  para la condición CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>FOXP3 y  $98.61 \pm 0.41\%$  para la condición CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> $\Delta$ FOXP3, media  $\pm$  SEM. Figura 20C). Por un lado, tal y como era de esperar, tanto a día 7 como a día 14 la fracción CD25<sup>+</sup> presentó unos elevados niveles de FOXP3. Por otro lado, a día 7 las células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transducidas con el vector MSCV-FOXP3 y tratadas con TGF- $\beta$ 1 fueron las únicas que mostraron unos niveles de FOXP3 parecidos a las CD25<sup>+</sup> ( $92.39 \pm 0.89\%$  y  $91.88 \pm 0.70\%$ , respectivamente, media  $\pm$  SEM). Sin embargo, aunque a día 14 esta fracción aún expresaba unos niveles de FOXP3 altos ( $77.83 \pm 9.99\%$ , media  $\pm$  SEM), esta expresión no era ni igual de alta ni de homogénea a lo observado en la fracción CD25<sup>+</sup> ( $95.21 \pm 1.71\%$ , media  $\pm$  SEM) (Figura 20D). De hecho, esta reducción en la expresión de FOXP3 a día 14 se produjo a pesar de que el  $96.24 \pm 1.16\%$  (media  $\pm$  SEM) de las células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transducidas con MSCV-FOXP3 y tratadas con TGF- $\beta$ 1 expresaban la proteína EGFP (Figura 20C). En resumen, aunque las células procedentes de timocitos pueden ser eficientemente transducidas por lentivectores sin que su viabilidad se vea comprometida, la expresión de un FOXP3 ectópico también se vio reducida a medida que transcurrieron los días de cultivo.

También probamos si la sobre-expresión de un FOXP3 ectópico en la condición de células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> tratados con TGF- $\beta$ 1 podría inducir una eficiente capacidad supresora. A día 14, las condiciones CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> estimuladas y tratadas con TGF- $\beta$ 1, independientemente de si fueron

transducidas o no, ejercían una cierta supresión de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>, pero esta capacidad supresora siguió siendo menor que la mostrada por la fracción CD25<sup>+</sup>. Curiosamente, no se observaron diferencias significativas entre la supresión ejercida por las CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transducidas con MSCV-FOXP3 + TGF-β1, por MSCV-ΔFOXP3 + TGF-β1 y las únicamente tratadas con TGF-β1 (Figura 20E). Este resultado demuestra que la sobreexpresión de FOXP3 exógeno no indujo una mejor capacidad supresora en las CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, a diferencia de los resultados obtenidos en las Tconv de periferia.

Finalmente, estudiamos la expresión de CTLA-4 a lo largo del cultivo. Se puede observar una alta expresión de CTLA-4 en la subpoblación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> de todas las fracciones celulares a día 7. Sin embargo, a día 14 esta expresión se vio significativamente reducida en todas las condiciones CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, en comparación con la fracción CD25<sup>+</sup> (Figura 20F). Además, se observa una correlación positiva entre el porcentaje de supresión de la proliferación de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> con el porcentaje de expresión de FOXP3 en el total de células viables (Figura 20G); y con la frecuencia del CTLA-4<sup>+</sup> en la subpoblación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Figura 20H), al analizar todas las condiciones (CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> + TGF-β1, transducidas o no transducidas).



**Figura 20. Viabilidad y funcionalidad de los timocitos CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> modificados genéticamente y/o tratados con TGF-β1.** (A) Esquema representación del protocolo experimental, desde la disgregación del timo hasta el día 14. Las flechas indican el día y procedimiento realizado en cada paso. (B) Diagrama de puntos que muestra el porcentaje de células viables para cada condición, a día 7 y 14 (media ± SEM). N=4 a día 7 y N=3 a día 14 en todas las condiciones. (C) Diagrama de puntos que muestra el porcentaje de células transducidas, observado por la frecuencia de la expresión de la proteína fluorescente verde (EGFP) (media ± SEM). N=4 a día 7 y N=3 a día 14 en todas las condiciones. La flecha representa el inicio del tratamiento con puromicina. D) Diagrama de puntos que muestra el porcentaje de células que expresan FOXP3 en las células vivas (media ± SEM). Cada símbolo corresponde a un individuo, a día 7 y 14. N=4 a día 7 y N=3 a día 14 en todas las condiciones. (E) Histograma con el porcentaje de supresión de proliferación de células diana CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, calculada utilizando el método del índice de división (media ± SEM) a día 14. N=3 en cada condición. (F) Histograma con la frecuencia de expresión de CTLA-4 en la subpoblación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dentro de las células vivas, a día 7 y 14 (media ± SEM). N=4 a día 7 y N=3 a día 14 en todas las condiciones. (G) Correlación y regresión lineal (línea negra) entre la frecuencia de supresión de la proliferación de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de células vivas expresando el FOXP3<sup>+</sup>. Cada símbolo corresponde a un individuo. (H) Correlación y regresión lineal (línea negra) entre la frecuencia de supresión de la proliferación de células CTVio<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de células vivas expresando el CTLA-4<sup>+</sup> en la subpoblación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> de las CTVio<sup>neg</sup>. Cada símbolo corresponde a un individuo. Estadísticamente significativo \* cuando p < 0,05 al comparar las condiciones indicadas determinado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores. Las correlaciones se determinaron mediante la correlación de rango de Spearman y se consideraron estadísticamente significativos \* cuando p < 0,05. Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

Por lo tanto, la inducción de la expresión ectópica del FOXP3 en células tímicas primarias CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> tratadas con TGF-β1 es factible, manteniendo una alta viabilidad. Sin embargo, no se materializó en una expresión estable del FOXP3 dentro de las células que fueron transducidas. Tampoco fue capaz de mantener la estabilidad en la expresión del CTLA-4, ni una función supresora robusta u homogénea en las células modificadas genéticamente.

#### **VI.1.6 Las CD25<sup>neg</sup> +TGF-β1 son menos estables en ambientes pro-inflamatorios que la población thyTreg CD25<sup>+</sup>**

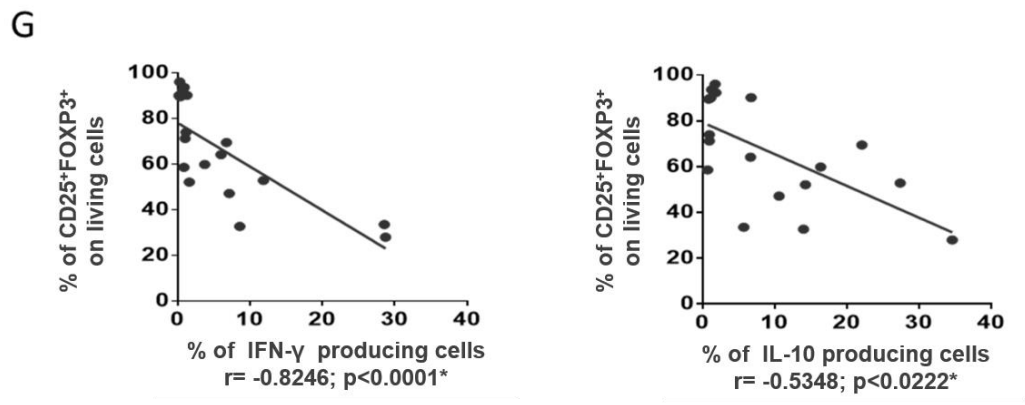
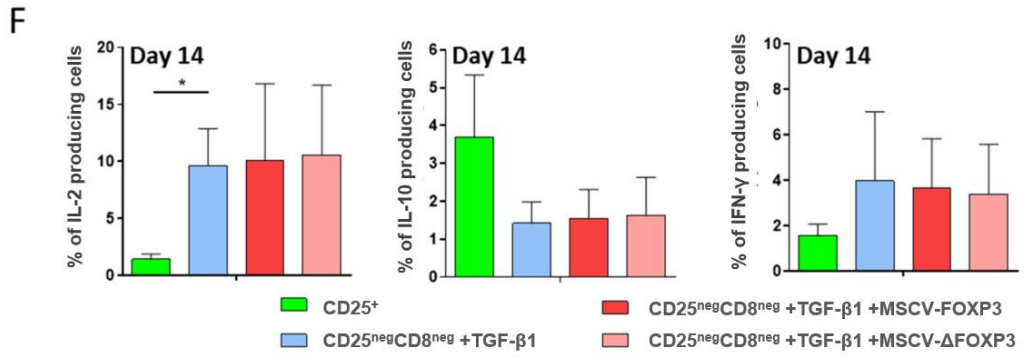
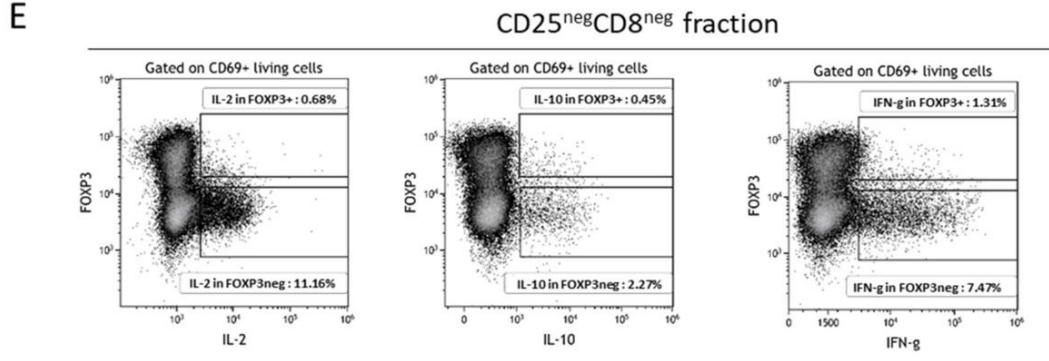
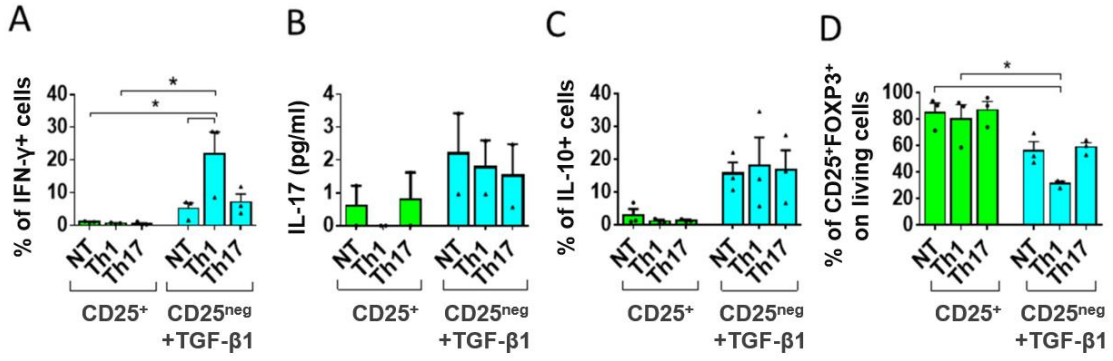
Una de las características más valiosas de las Treg que se haya demostrado para su uso seguro como inmunoterapia es su estabilidad fenotípica bajo condiciones inflamatorias, ya que algunos tipos de Treg presentan una

plasticidad celular muy alta hacia determinados tipos de Tconv, como las Th1 y Th17 (91, 189).

Debido a la inestabilidad en la expresión del FOXP3 y del CTLA-4 en las células CD25<sup>neg</sup> derivadas del timo, examinamos su estabilidad fenotípica re-estimulando a las células CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF- $\beta$ 1, bajo ambientes pro-inflamatorios polarizantes hacia los fenotipos Th1 o Th17 (Ver apartado V.8.1). Este estudio fue realizado a día 7, cuando las células CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1 aún presentaban una alta expresión del FOXP3. Las células de la fracción CD25<sup>+</sup>, cuando se re-estimularon bajo condiciones de cultivo polarizantes hacia fenotipos Th1 o Th17, casi no mostraron células productoras de IFN- $\gamma$ , de IL-10 ni secreción de IL-17, en comparación con la condición control sin tratamiento polarizante (NT) (Figura 21A, B y C). Por lo tanto, tal y como había sido descrito anteriormente (77, 112), las CD25<sup>+</sup> procedentes de timo no fueron susceptibles de cambiar su fenotipo bajo condiciones pro-inflamatorias. Por el contrario, la fracción CD25<sup>neg</sup> tratada con TGF- $\beta$ 1 mostró un aumento significativo en las frecuencias de células productoras de IFN- $\gamma$  en la condición de polarización Th1, en comparación con la fracción CD25<sup>+</sup> (Figura 21A). Además, las condiciones de polarización Th1, Th17 e, incluso, una simple re-estimulación, indujeron un aumento en la producción de IL-17 y en el porcentaje de las células productoras de IL-10 (Figura 21B y C). Finalmente, mientras que el porcentaje de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en la fracción CD25<sup>+</sup> no se vio afectado en ninguna de las condiciones polarizantes NT, Th1 o Th17, las células de la fracción CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1 mostraron una significativa disminución en la frecuencia de la subpoblación CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cuando se cultivó bajo la condición de polarización hacia Th1 (Figura 21D). Por lo tanto, a pesar el tratamiento con el TGF- $\beta$ 1, las células CD25<sup>neg</sup> presentaron una gran capacidad de producción de citoquinas pro-inflamatorias cuando fueron cultivadas en un ambiente polarizante hacia un fenotipo Th1, mostrando que no se habían inducido correctamente las cualidades de las thyTreg.

También cuantificamos la producción intracelular de IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  en las fracciones de células CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transducidas, o no, y tratadas con TGF- $\beta$ 1 tras una re-estimulación, pero sin un entorno pro-inflamatorio.

Primeramente, tal y como se puede observar, la expresión de estas citoquinas intracelulares fue menor en la subpoblación FOXP3<sup>+</sup> con respecto a la FOXP3<sup>neg</sup> de la fracción CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> sin tratamiento con el TGF-β1. Esto demuestra que la expresión del FOXP3 está relacionada con una menor producción de citoquinas tras una re-estimulación celular (Figura 21E). Después, se observó un mayor porcentaje de células productoras IL-2 e IFN-γ, y frecuencias más bajas de células productoras de IL-10, en todas las condiciones CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> tratadas con TGF-β1, independientemente de si fueron transducidas o no, en comparación con la fracción CD25<sup>+</sup>, aunque las diferencias no fueron significativas en todas las comparativas (Figura 21F). Finalmente, se observaron asociaciones negativas entre la frecuencia de la población CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y los porcentajes de células productoras de IFN-γ o de IL-10, al analizar todas las condiciones no CD25<sup>+</sup> (Spearman  $r = -0.8246$ ,  $p < 0.0001$ , y  $r = -0.5348$ ,  $p = 0.0222$ , respectivamente. Figura 21G). A menor frecuencia de CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, se observa una mayor inestabilidad para producir citoquinas pro- y anti-inflamatorias en las fracciones celulares derivadas de los timocitos CD25<sup>neg</sup>.



**Figura 21. Expresión de citoquinas por las células derivadas del timo después de una re-estimulación o bajo condiciones de polarización hacia otros fenotipos de células T.** En el día 7, las CD25<sup>neg</sup> tratadas con TGF- $\beta$ 1 y las fracciones CD25<sup>+</sup> fueron re-estimuladas mediante *Dynabeads* (NT) como condición de control o se re-estimularon bajo condiciones de polarización hacia fenotipos Th1 o Th17. Histogramas con: (A) Frecuencias de células productoras de IFN- $\gamma$  (medido por citometría de flujo; media  $\pm$  SEM). N=3. (B) Niveles de IL-17 (pg/mL) del sobrenadante fueron medidos por ELISA (media  $\pm$  SEM). N=3. (C) Frecuencias de células productoras de IL-10 (medido por citometría de flujo; media  $\pm$  SEM). (D) Los porcentajes de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dentro de las células vivas (medido por citometría de flujo) (media  $\pm$  SEM). N=3. (E) Diagramas de puntos con la producción de citoquinas en células re-estimuladas sin un entorno polarizante. Ejemplo de la estrategia de análisis para seleccionar células productoras de citoquinas en la fracción CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, según la expresión de FOXP3. Las células productoras de IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  en las subpoblaciones FOXP3<sup>+</sup> y FOXP3<sup>neg</sup> se evaluaron mediante citometría de flujo. (F) Histogramas con el porcentaje de expresión de las citoquinas IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  detectadas en el total de células vivas (media  $\pm$  SEM). N=3. (G) Correlaciones entre la frecuencia de las células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dentro de las células vivas, frente al porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  (izquierda) y de IL-10 (derecha). Estadísticamente significativo \* cuando  $p < 0,05$ . Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor. Las correlaciones se determinaron mediante la correlación de rango de Spearman, correspondiendo cada símbolo a un individuo. Se consideraron estadísticamente significativas todas las comparaciones cuando  $p < 0,05$ . Figura publicada en Gallego et al., 2021 (187).

En resumen, tal y como se esperaba, las thyTreg CD25<sup>+</sup> mostraron una gran funcionalidad supresora y una evidente estabilidad fenotípica tanto en la expresión del CD25 y del FOXP3 a lo largo de los días de cultivo, como en la escasa producción de citoquinas pro-inflamatorias tras una re-estimulación, incluso a pesar de estar bajo entornos polarizantes Th1 y Th17. Sin embargo, al contrario a lo observado en los linfocitos T CD4 *naive* de periferia, ni el tratamiento con altas dosis de IL-2 y TGF- $\beta$ 1, ni la selección de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> más pura, ni la transducción con vectores lentivirales para forzar la expresión de un FOXP3 ectópico, avalan que se puedan usar los timocitos CD25<sup>neg</sup> como una fuente alternativa de thyTreg. Se puede asumir que la expresión del FOXP3 está estrechamente relacionada con la expresión del CTLA-4, con la función supresora y con la estabilidad celular a la hora de producir citoquinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, parece muy improbable utilizar de manera segura estos timocitos como una fuente alternativa de thyTreg para terapias celulares supresoras y se requieren futuros estudios para alcanzar ese fin.

## VI.2 Generación de células de línea antígeno-específicas: Detección del UniCAR y su capacidad de activación celular

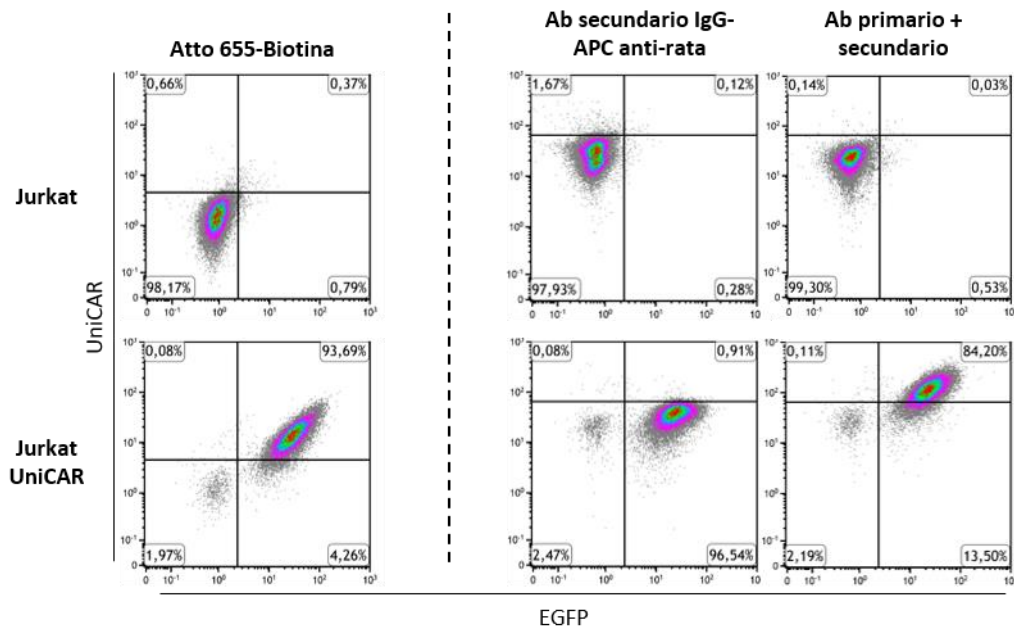
Como fue demostrado anteriormente por nuestro grupo y que también ha sido confirmado en el apartado VI.1 del presente estudio, las células thyTreg CD25<sup>+</sup> procedentes de timo y expandidas *ex vivo* son muy estables y presentan una alta capacidad supresora (112). Por ello, en esta segunda sección de resultados, nos centramos en estudiar la posibilidad de incrementar las habilidades supresoras de las células thyTreg CD25<sup>+</sup> convirtiéndolas en células específicas de Ag. Para ello, uno de los principales métodos para llevarlo a cabo es la modificación genética con CAR.

En nuestro laboratorio, nos hemos basado en la estructura del UniCAR cuyo dominio extracelular es una estreptavidina monomérica (mSA2). A diferencia de los CAR convencionales, que reconocen específicamente un Ag, este mSA2-CAR ha sido especialmente diseñado para reconocer la biotina de una forma mucho más específica, con menos uniones aberrantes y con menos potencial inmunogénico que otros análogos, como la avidina (179). Debido a la capacidad de reconocimiento de múltiples dianas con una sola estructura CAR, simplemente cambiando de intermediario biotinilado, este mSA2-CAR también ha sido denominado como CAR Universal o simplemente UniCAR.

### VI.2.1 El constructo UniCAR de 3<sup>a</sup> generación se expresa en la superficie de células de línea y activa las células que lo expresan.

Gracias a los vectores lentivirales codificantes del UniCAR generados, fuimos capaces de transducir eficazmente células de línea Jurkat, en las que observamos una alta expresión de la proteína EGFP tras la transducción. Aun así, aislamos las células EGFP<sup>+</sup> mediante el separador celular para obtener una población celular homogénea. Para confirmar que el constructo UniCAR estaba expresándose correctamente, junto con la EGFP, marcamos las células con dos compuestos biotinilados. Por un lado, usamos el fluorocromo Atto655

unido a una biotina (Figura 22, izquierda). Por otro lado, utilizamos un sistema de Ac primario biotinilado (IgG-Biotina de rata) más un Ac secundario fluorescente ( $\alpha$ IgG-APC frente a rata) (Figura 22, derecha). Mediante citometría de flujo, se puede observar que la proteína EGFP y la señal emitida en la longitud de onda de los fluorocromos co-expresan en las células Jurkat modificadas para expresar el UniCAR.



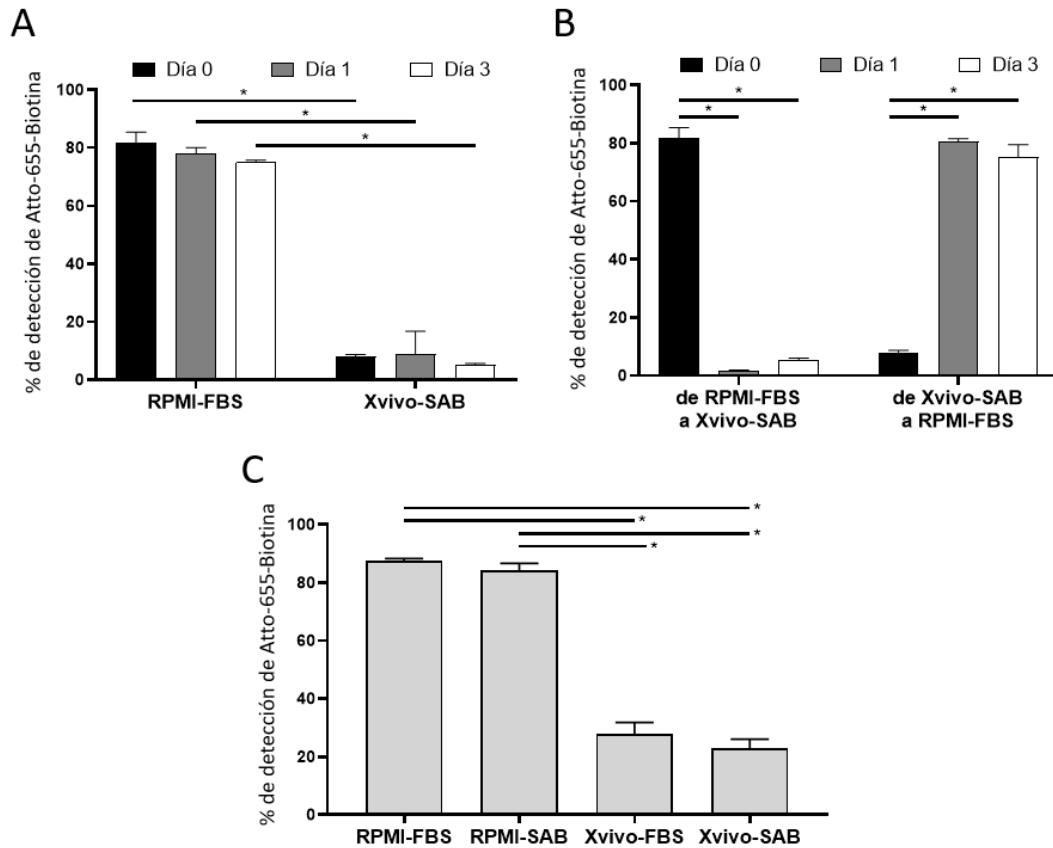
**Figura 22. Expresión superficial del UniCAR en células de línea Jurkat.** Células de línea Jurkat transducidas con lentivectores que codificaban la proteína UniCAR y EGFP. EGFP y UniCAR visualizado por citometría de flujo. Para marcar el UniCAR se usó: (izquierda) el fluorocromo Atto-655-Biotina; y (derecha) la combinación de un Ac isotópico primario IgG de rata biotinilado con un Ac secundario  $\alpha$ IgG-APC frente a rata procedente de asno. Estos diagramas de puntos suponen un ejemplo representativo de n=10.

### VI.2.2 Los medios de cultivo y su suplementación afectan al UniCAR.

El constructo UniCAR se ha generado con el objetivo de llegar a ser parte del arsenal inmunoterapéutico frente enfermedades humanas. El suero humano puede contener biotina o biomoléculas derivadas de la biotina, como la biocitina (190), pudiendo bloquear el contacto entre el UniCAR y el Ac biotinilado de interés y, así, impedir el efecto terapéutico deseado. Para analizar si el suero humano tiene moléculas bloqueantes del UniCAR, durante tres días, se cultivaron Jurkat-UniCAR en dos medios clásicos de cultivo, el

RPMI suplementado con 10% de FBS (RPMI-FBS) o el Xvivo-15 suplementado con 5% SAB (Xvivo-SAB).

Cuando las células están cultivadas en RPMI-FBS, la captación del Atto665-Biotina por parte del UniCAR se mantiene constante y sin interferencias. Por el contrario, si las células están cultivadas en Xvivo-SAB, la captación del Atto665-Biotina es bloqueada y esa neutralización se mantiene en todo momento durante el cultivo en este medio (Figura 23A). A continuación, se realizó un experimento en el que las Jurkat-UniCAR que estaban cultivadas en un medio se cambiaron al otro, y viceversa. Se puede observar que la neutralización del UniCAR ocurre en menos de 24 horas, ya que las células que estaban en RPMI-FBS al inicio del experimento y que se cambiaron al Xvivo-SAB pierden completamente la capacidad de captar el Atto655-Biotina. Por el contrario, cuando las células que estaban cultivadas Xvivo-SAB se cultivan en RPMI-FBS, esa captación de Atto665-Biotina por el UniCAR se restaura totalmente en 24 horas (Figura 23B). Finalmente, se estudió si el origen de esa neutralización residía en el medio de cultivo o en los sueros de suplementación. Según los resultados, este bloqueo es debido a las proteínas disueltas en el medio de cultivo y no es dependiente de la suplementación que reciben, ya que se observa la misma capacidad de detección del Atto665-Biotina en RPMI-FBS y RPMI-SAB, y en Xvivo-FBS y Xvivo-SAB (Figura 23C)



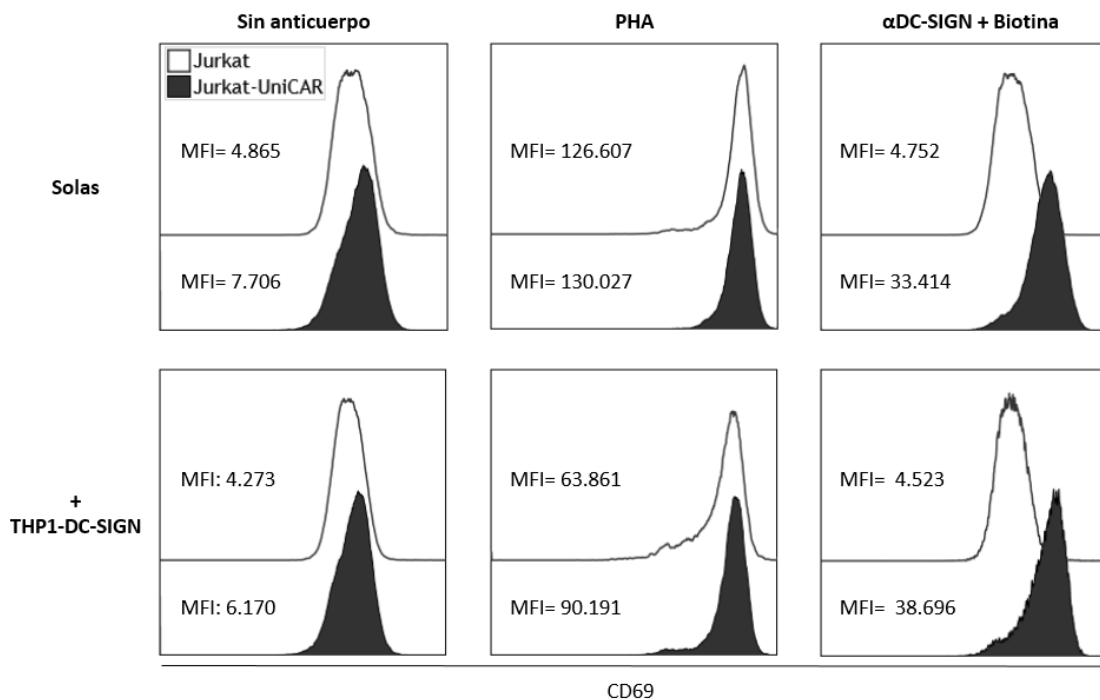
**Figura 23. Los medios de cultivo pueden neutralizar la capacidad de unión del UniCAR a la biotina.** (A) Histograma que representa la detección del UniCAR en células Jurkat-UniCAR cultivadas durante 3 días en RPMI + 10% FBS (RPMI-FBS) o en Xvivo + 5% SAB (Xvivo-SAB). Cada día, se analizan mediante citometría de flujo la señal del UniCAR tras marcar con Atto655-Biotina. Cada barra representa media  $\pm$  SEM de N=3 en cada condición. (B) Histograma que representa la detección del UniCAR en células Jurkat-UniCAR cultivadas hasta el día 0 en RPMI-FBS o en Xvivo-SAB. A día 0, se intercambian los tipos de medios en los que estaban y se cultivan en el nuevo medio durante 3 días. Cada día, se analizan mediante citometría de flujo la señal del UniCAR tras marcar con Atto655-Biotina. Cada barra representa media  $\pm$  SEM de N=3 en cada condición. \* Diferencia significativa cuando  $p < 0.05$ , proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores. (C) Histograma que representa la detección del UniCAR tras marcar con Atto655-Biotina en células Jurkat-UniCAR cultivadas en RPMI + 10% de FBS, RPMI + 5% de Suero AB humano, Xvivo + 10% de FBS y Xvivo + 5% de suero AB humano, mediante citometría de flujo. Cada barra representa media  $\pm$  SEM de N=5 en cada condición. \* Diferencia significativa cuando  $p < 0.05$ , proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

Teniendo en cuenta estos resultados, se pudo observar que la presencia de suero AB humano no impide el reconocimiento del UniCAR y así, se pudo optimizar y mejorar los protocolos de cultivo y transducción de las condiciones experimentales en los siguientes experimentos.

### **VI.2.3 El constructo UniCAR de 3<sup>a</sup> generación activa a las células de línea que lo expresan.**

A continuación, evaluamos la capacidad del UniCAR de estimular, mediante sus dominios de activación y co-estimuladores, a la célula que lo porta cuando se produzca la cascada de reconocimiento entre esta célula, el Ac intermediario biotinilado y el Ag diana. Para ello, medimos el porcentaje de expresión de una proteína asociada con la activación temprana, el CD69 (191), tras 24 horas de cultivo bajo diferentes condiciones. Por un lado, cultivamos ambos tipos de células de línea en solitario y estudiamos si la sola presencia de un Ac biotinilado ( $\alpha$ DC-SIGN-Biotina) sería suficiente para desencadenar la cascada de activación celular. Por otro lado, co-cultivamos las Jurkat-UniCAR con otras células de línea, las THP1 que expresaban la proteína DC-SIGN y con el intermediario  $\alpha$ DC-SIGN-Biotina necesario para el reconocimiento de la diana. Se emplearon diversos controles negativos, como los cultivos o co-cultivos de células sin ningún tipo de Ac biotinilado o las células Jurkat no transducidas, así como el control positivo de activación celular (+ PHA) (Ver apartado V.6.1).

Estudiando los niveles de activación según la intensidad media de fluorescencia del CD69 (MFI, por sus siglas en inglés), los resultados indican que las Jurkat-UniCAR incrementan su expresión del CD69 cuando reconocen la biotina del Ac intermediario, independientemente de si hay, o no, una célula expresando la proteína diana de interés. Estos niveles son muy superiores a los mostrados en las Jurkat sin transducir, aunque estos no alcanzan los niveles de activación de los controles positivos. Por otro lado, sin el Ac intermediario, las Jurkat-UniCAR no se estimulan y tienen unos niveles de expresión del CD69 similares a los de las Jurkat sin transducir (Figura 24).



**Figura 24. Activación mediada por UniCAR en células de línea Jurkat.** Tras 24 horas de cultivo, se estudió la MFI (Intensidad media de fluorescencia) de la expresión del CD69 en Jurkat sin transducir y Jurkat-UniCAR que fueron cultivadas solas, o con células de línea THP1-DC-SIGN. Estas condiciones fueron a su vez cultivadas sin Ac intermediario (control negativo), estimuladas con PHA (control positivo) o cultivadas con Ac intermediario  $\alpha$ DC-SIGN biotinilado. Estos histogramas suponen un ejemplo representativo de n=3 experimentos.

Por lo tanto, la estructura del UniCAR fue capaz de estimular eficazmente a la célula de línea que lo porta. Sin embargo, la sola presencia del Ac biotinilado fue suficiente para inducir esta activación en las Jurkat-UniCAR, sin que fuera necesario la presencia de la célula diana. Este fenómeno podría suponer un problema ya que las células que portan el UniCAR deberían ser capaces de activarse sólo bajo la combinación de la diana y del intermediario biotinilado adecuado.

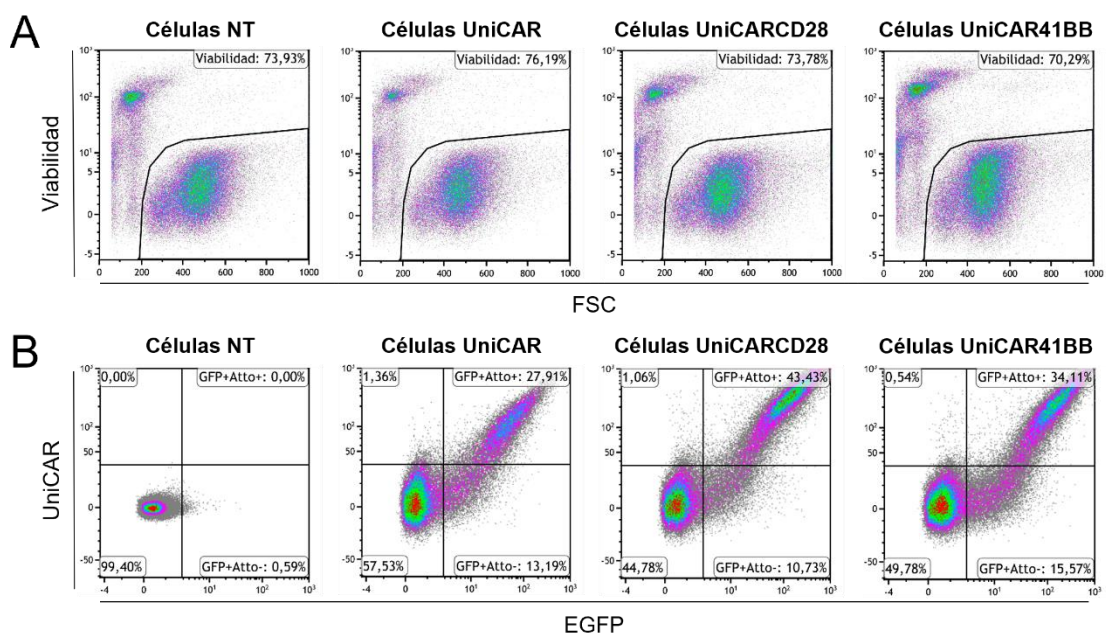
### VI.3 Generación de células primarias humanas específicas de antígeno: Expresión del UniCAR

Gracias a los conocimientos generados tras trabajar con las células de línea, se optimizaron las condiciones de cultivo celular y el protocolo de transducción con los diferentes constructos en las diferentes células primarias que se usaron para los siguientes experimentos (linfocitos Tconv y thyTreg).

### VI.3.1 Transducción de células primarias con los UniCAR y selección de las correctamente modificadas

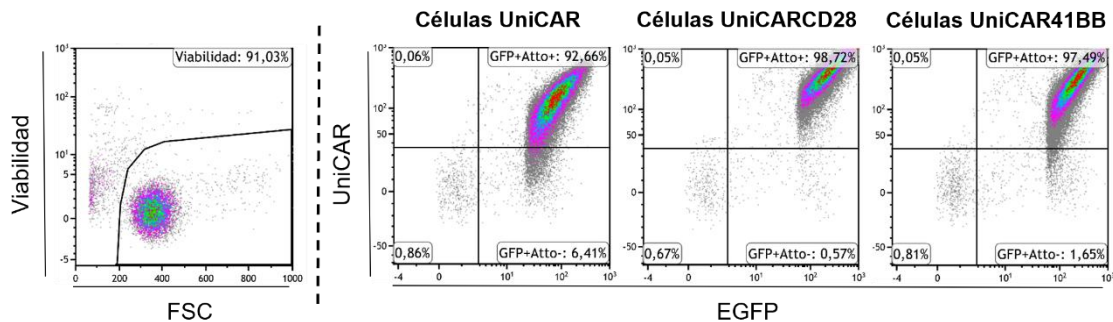
Tras la obtención de las células primarias, ya fueran células mononucleares de sangre periférica (CMSP) o thyTreg extraídas del timo (Ver apartados V.3.1 y V.3.2), estas fueron activadas mediante *Dynabeads* y transducidas con los vectores lentivirales correspondientes. En ambos casos, 3 días después del inicio de la activación se retiraron las *Dynabeads* y se lavaron las células (Ver apartados V.4.3 y V.4.4). En este mismo día, se valoró el porcentaje de viabilidad y, como resultado, no se observaron diferencias entre los constructos utilizados, siendo en la mayoría de los casos entorno al 70% (Figura 25A).

El mismo día 3, se estudiaron los niveles de expresión del EGFP y de UniCAR. Se pueden apreciar tres subpoblaciones según la expresión del EGFP, una negativa, una positiva intermedia y otra altamente positiva. Es remarcable el hecho de que, en todos los casos, la población EGFP positiva intermedia es negativa para el Atto665-Biotina y, por tanto, negativa también para el UniCAR. Esta población EGFP<sup>+</sup>UniCAR<sup>neg</sup> supone en torno al 10-15% del total de células vivas, mientras que la población con la expresión más alta de EGFP, que a su vez concordaba con la expresión más elevada de Atto665-Biotina y, por tanto, del UniCAR, suponía entre el 30 y el 40%. (Figura 25B).



**Figura 25. Viabilidad y expresión superficial del UniCAR y EGFP en células primarias.** (A) Diagramas de puntos que muestran la viabilidad de células primarias que fueron transducidas con lentivectores que codificaban la proteína UniCAR y EGFP, visualizados por citometría de flujo a día 3 desde el inicio del experimento. Para marcar la Viabilidad se usó 7AAD. (B) Diagramas de puntos que muestran las proteínas UniCAR y EGFP de células primarias, visualizados por citometría de flujo a día 3 desde el inicio del experimento. Para marcar el UniCAR se usó el fluorocromo Atto655-Biotina. Estos diagramas de puntos suponen un ejemplo representativo de lo observado con todas las células primarias de esta tesis, tanto las Tconv como las thyTreg modificadas genéticamente.

Para enriquecer la fracción celular que expresaba óptimamente el UniCAR, se aisló, mediante un separador celular (MACSQuant® Tyto®), la población EGFP<sup>alto</sup>, pues esta población era la que mostraba mayor expresión de UniCAR. Tal y como se puede observar, la población de células obtenidas tras el proceso de selección por EGFP, mostraron una viabilidad y una pureza superiores al 90% en la población EGFP<sup>alto</sup> y, por tanto, en UniCAR (Atto655-Biotina positivo) (Figura 26).



**Figura 26. Expresión superficial del UniCAR y EGFP en células primarias tras selección celular de la población EGFP<sup>alto</sup>.** Izquierda: Diagrama de puntos que muestra la viabilidad de Tconv tras el proceso de selección celular, visualizado por citometría de flujo. Derecha: Diagramas de puntos que muestran las proteínas UniCAR y EGFP en las Tconv que fueron transducidas con lentivectores tras el proceso de selección de la población EGFP<sup>alto</sup>, visualizados por citometría de flujo. Para marcar el UniCAR se usó el fluorocromo Atto655-Biotina. Estos diagramas de puntos suponen un ejemplo representativo de lo observado con todas las células primarias transducidas y aisladas, tanto las Tconv como las thyTreg modificadas genéticamente.

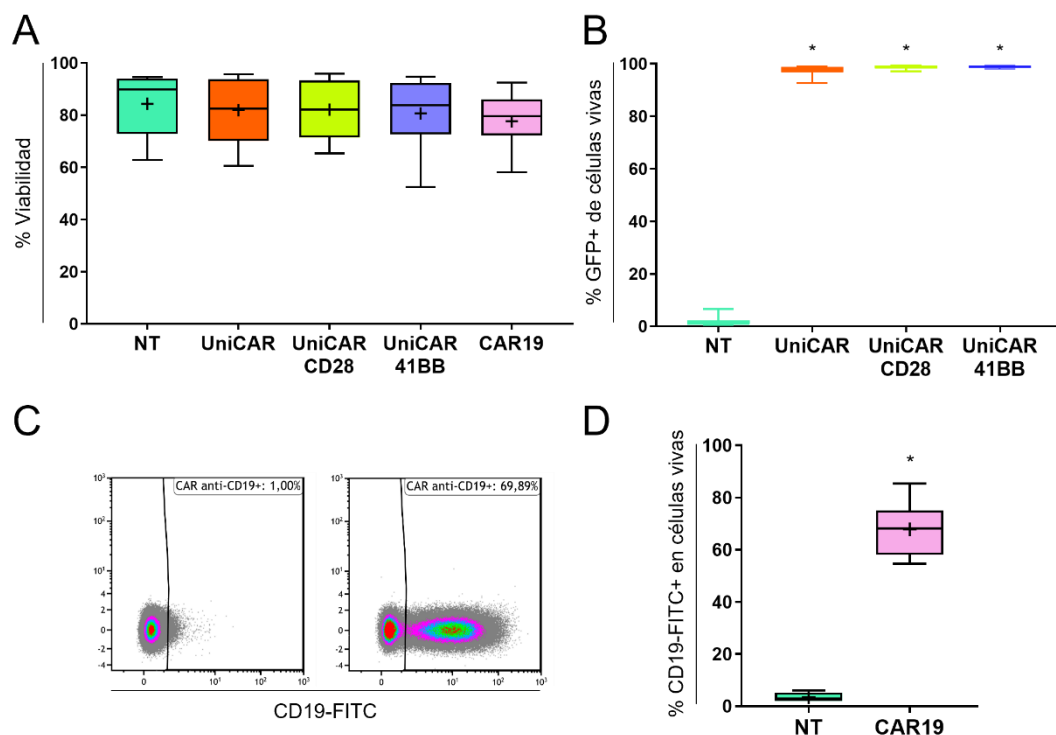
Paralelamente, y siguiendo los mismos protocolos descritos anteriormente, se transdujeron las células primarias con el vector que codificaba el CAR19 (CAR-T ARI-0001), cedido por el Hospital Clínic de Barcelona y ya utilizado en pacientes (192-194). Como este constructo no contenía en su estructura

secuencia codificante de la proteína EGFP, o cualquier otro marcador, no se pudieron purificar mediante el seleccionador celular.

### **VI.3.2 Viabilidad y porcentaje de transducción a día 7 de las células primarias**

El día 7 desde el inicio del experimento, se estudió la viabilidad de todas las células primarias modificadas genéticamente y su control no transducido (NT). Se puede apreciar que no existen diferencias significativas en la viabilidad entre las condiciones de células primarias modificadas para expresar alguna variedad del UniCAR o el CAR19, con respecto de la condición control NT (Figura 27A). También se estudió a día 7, transcurridas 24h desde el aislamiento, el porcentaje de la población de células vivas que seguían expresando la proteína EGFP, y se observó que la pureza de las células EGFP<sup>+</sup> era superior al 95% (Figura 27B).

Por otro lado, para poder cuantificar el porcentaje de las células correctamente transducidas con el CAR19, se usó una molécula de CD19 unida a un fluorocromo FITC (Figura 27C). El porcentaje de población que era CAR19 positiva a día 7 desde el inicio del experimento fue, de media, 70%, (alcanzando en algunos experimentos hasta el 90%) (Figura 27D), sin haber utilizado el aislador celular.



**Figura 27. Evaluación de la viabilidad y porcentaje de transducción de las células primarias (Tconv y thyTreg) a día 7.** (A) Diagrama de cajas y bigotes que representa la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de viabilidad de las células primarias no transducidas, tanto Tconv como thyTreg (NT) (N=9) y de las mismas células con expresión de alguna variedad del UniCAR (N=9 de cada condición) o el CAR19 (N=7) a día 7. (B) Diagrama de cajas y bigotes que representa la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de expresión del EGFP en las condiciones de células primarias no transducidas (NT) y transducidas con alguna variedad del UniCAR a día 7. N=9. Diferencia estadísticamente significativa \* cuando  $p < 0,05$ , proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor comparando las condiciones transducidas con la NT. (C) Diagramas de puntos que muestran células primarias que fueron transducidas con lentivectores que codificaban la proteína CAR19. Se usó una molécula de CD19-FITC para visualizar directamente el CAR19 por citometría de flujo. Estos diagramas de puntos suponen un ejemplo representativo de 7 experimentos. (D) Diagrama de cajas y bigotes que representa la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de expresión de la CD19-FITC en las condiciones de células primarias no transducidas (NT) y transducidas con el CAR19, a día 7. N=7. Diferencia estadísticamente significativa \* cuando  $p < 0,05$ , proporcionado por test de Mann-Whitney.

Por tanto, en este apartado se concluye que los diferentes tipos de UniCAR son capaces de ser introducidos y expresados correctamente en células

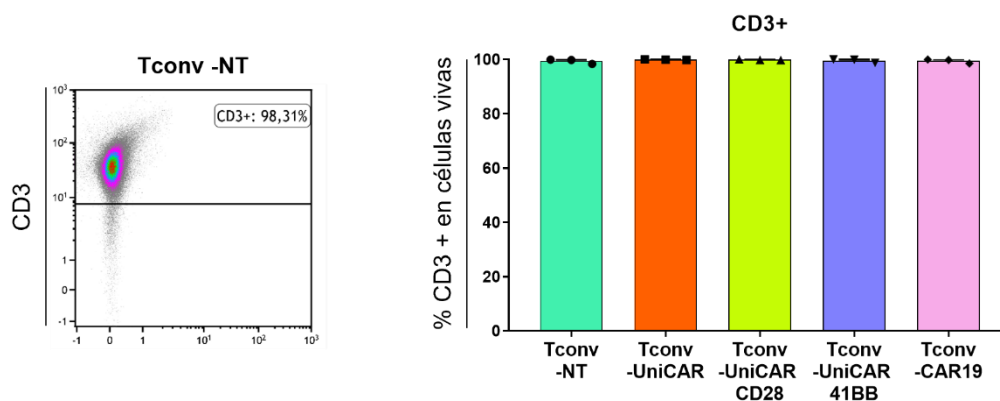
primarias. A su vez, gracias al separador celular, conseguimos enriquecer las poblaciones con mayor expresión de los UniCAR.

## VI.4 Fenotipo y funcionalidad de las Tconv-UniCAR

Hasta ahora, la mayoría de estrategias terapéuticas en preclínica o en ensayos clínicos basadas en construcciones CAR han utilizado linfocitos Tconv CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> (158). Del mismo modo, los constructos UniCAR principalmente se han usado como novedosas estrategias de inmunoterapia antitumoral en las células Tconv. Por ello, el siguiente paso de este estudio fue analizar si las Tconv modificadas genéticamente con nuestros constructos UniCAR o con el constructo CAR19, desarrollaban las mismas propiedades a lo observado en otros estudios.

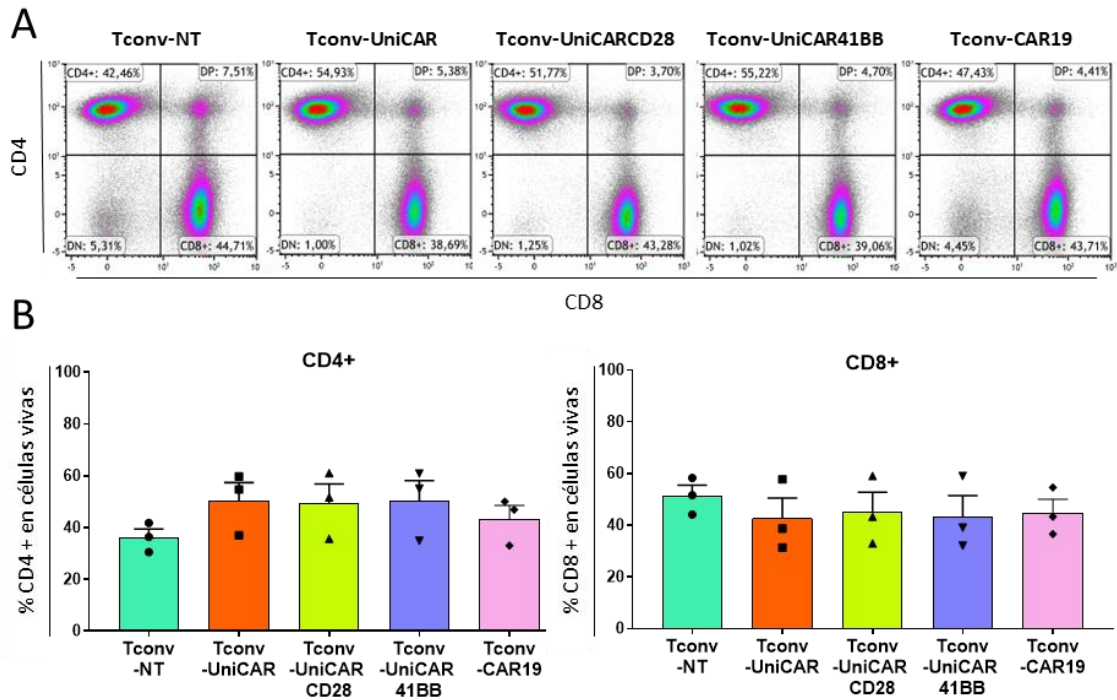
### VI.4.1 Fenotipo a día 7 de las Tconv transducidas

Tras comprobar que las células primarias tenían una gran viabilidad y porcentaje de transducción a día 7 (Ver apartado VI.3), se estudió la expresión de otros marcadores para determinar si la modificación genética podría generar cambios fenotípicos en las CMSP. Debido a que la mayor parte de la población de todas condiciones era CD3 positiva a día 7 (Ver apartado V.4.3), estas células se denominaron como Tconv (Figura 28).



**Figura 28. Expresión superficial del CD3 en CMSP tras el protocolo de activación, transducción y selección celular de la población EGFP<sup>alto</sup>.** (A) Diagrama de puntos que muestra la expresión de CD3 en las CMSP que fueron transducidas, visualizado por citometría de flujo a día 7. (B) Histograma que representa la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD3 en las condiciones de Tconv no transducidas (NT) y transducidas con alguna variedad del UniCAR o CAR19 a día 7. N=3. Diferencias no significativas, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

Dentro de estas CD3 positivas, se estudió la expresión de los marcadores CD4 y CD8. Los resultados muestran que las frecuencias de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron muy parecidas en todas las condiciones (Figura 29A). Tampoco se observó diferencias significativas en la expresión de estos marcadores entre ninguna de las condiciones de células modificadas genéticamente con respecto a las Tconv-NT (Figura 29B).



**Figura 29. Expresión superficial del CD4 y CD8 en Tconv tras la transducción y selección celular de la población EGFP<sup>alto</sup>.** (A) Diagramas de puntos que muestran la expresión de CD4 y CD8 en Tconv que fueron transducidas, o no, con lentivectores, visualizados por citometría de flujo a día 7. (B) Histogramas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD4 (izquierda) y CD8 (derecha) en las condiciones de Tconv no transducidas (NT) y transducidas con los diferentes constructos UniCAR o CAR19 a día 7. N=3. Diferencias no significativas, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

Por lo tanto, tras aplicar el protocolo de activación, transducción y selección en las CMSP, la mayor parte de las células resultantes son linfocitos Tconv

CD3<sup>+</sup> y la modificación genética no modificó el ratio CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en estas células.

#### **VI.4.2 Activación de células Tconv mediada por el UniCAR de tercera generación.**

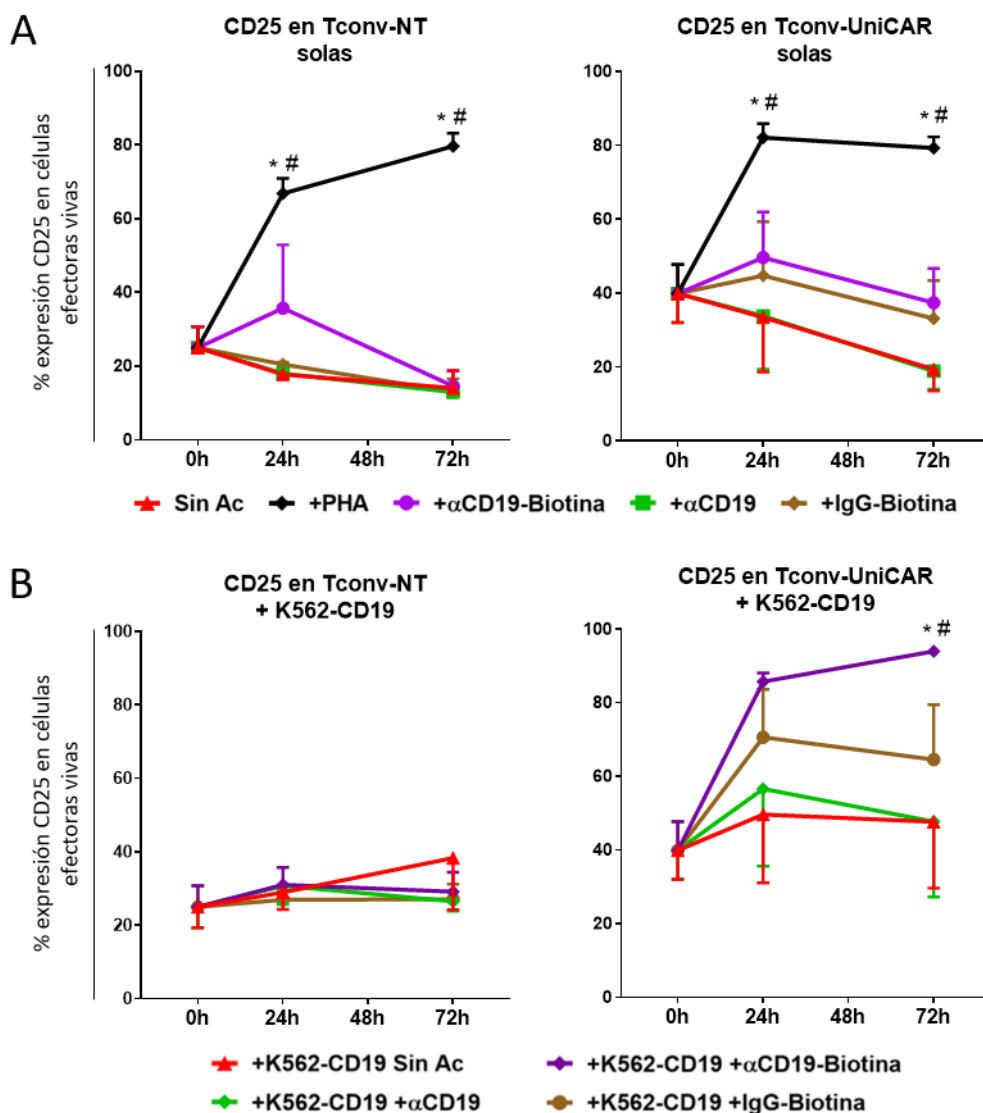
Una vez definido el fenotipo de las células Tconv modificadas genéticamente, se estudió *in vitro* si la proteína UniCAR de 3<sup>a</sup> generación actuaría en las Tconv con la misma especificidad parcial a la mostrada en las células Jurkat-UniCAR (Ver apartado VI.2.3).

Para ello, a día 7 se cultivaron las Tconv-NT y las Tconv-UniCAR en solitario con el Ac  $\alpha$ CD19-Biotina, con los Ac intermediarios controles, como el Ac Isotípico inespecífico biotinilado (IgG-Biotina) y el  $\alpha$ CD19 sin biotina, o en ausencia de Ac intermediario. Como control positivo de activación, las células en el cultivo fueron estimuladas con PHA (Ver apartado V.6.2).

Por otro lado, las Tconv-NT y las Tconv-UniCAR fueron también co-cultivadas con células de línea K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> junto con los Ac  $\alpha$ CD19-Biotina, IgG-Biotina y el  $\alpha$ CD19 sin biotina; o en ausencia de Ac intermediario. Tras 24 y 72 horas de co-cultivo, se analizó la activación celular en las células Tconv y la viabilidad de las células diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, mediante citometría de flujo (Ver apartado V.6.2).

Estudiando el marcador de activación CD25 en las Tconv cultivadas solas, podemos observar que no hay diferencias significativas en cuanto a la expresión del CD25 entre las distintas condiciones de las células Tconv-NT, exceptuando el control positivo (células + PHA), tal y como era de esperar. Remarcablemente, al contrario a lo observado en las Jurkat-UniCAR, las Tconv-UniCAR cultivadas solas con diferentes Ac intermediarios, incluso biotinilados, no muestran una expresión del CD25 significativamente superior a la mostrada por las Tconv-UniCAR cultivadas solas y sin Ac. Y, aunque en la mayoría de las condiciones de Tconv-UniCAR la expresión del CD25 es ligeramente superior a la de las Tconv-NT, incluso en la condición de ausencia de Ac intermediarios, tampoco se observan diferencias significativas entre ellas (Figura 30A).

Por otro lado, cuando se realiza el co-cultivo de las Tconv-UniCAR con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> y se le añade el  $\alpha$ CD19-Biotina, se puede observar que la expresión del CD25 en las Tconv-UniCAR es significativamente mayor al mostrado por las condiciones con Ac intermediarios control ( $\alpha$ CD19 sin biotina e IgG-Biotina) o la condición sin Ac e, incluso, ligeramente superior a la observada en el control positivo de activación con PHA a las 72 horas (Figura 30Ay B). Además, la expresión del CD25 en todas las condiciones de co-cultivo con las Tconv-UniCAR es también muy superior a la mostrada por todas las condiciones las células Tconv-NT co-cultivadas (Figura 30B). Esta aumentada expresión basal del CD25 en todas las condiciones Tconv-UniCAR con respecto a las Tconv-NT podría deberse al efecto de los dominios de co-estimulación del UniCAR sobre el estado de activación tónica celular.



**Figura 30. Evaluación de la expresión del marcador de activación CD25 en Tconv.** (A) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD25 en las células vivas tanto de las Tconv no transducidas (NT) (izquierda), como de Tconv-UniCAR (derecha) antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células que fueron cultivadas solas sin Ac intermediario, o en presencia de los Ac  $\alpha$ CD19-Biotina,  $\alpha$ CD19 sin biotina e IgG-Biotina. Como control positivo de activación, las células fueron estimuladas con PHA (N=3). (B) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD25 en las células vivas de las Tconv no transducidas (NT) (izquierda) y de Tconv-UniCAR (derecha) antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células co-cultivadas con K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia de Ac, o en presencia de los Ac  $\alpha$ CD19-Biotina,  $\alpha$ CD19 sin biotina e IgG-Biotina. Ratio de co-cultivo 1:1 (K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> : Tconv) (N=3). Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  con respecto a las condiciones en ausencia de Ac intermediarios. Diferencias estadísticamente significativas # cuando  $p < 0,05$  con respecto al resto de condiciones en el mismo día de análisis, excepto en el caso de Tconv-UniCAR + K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> +  $\alpha$ CD19-Biotina, diferencias significativas con todas las condiciones excepto a Tconv-UniCAR + K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> + IgG-Biotina, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

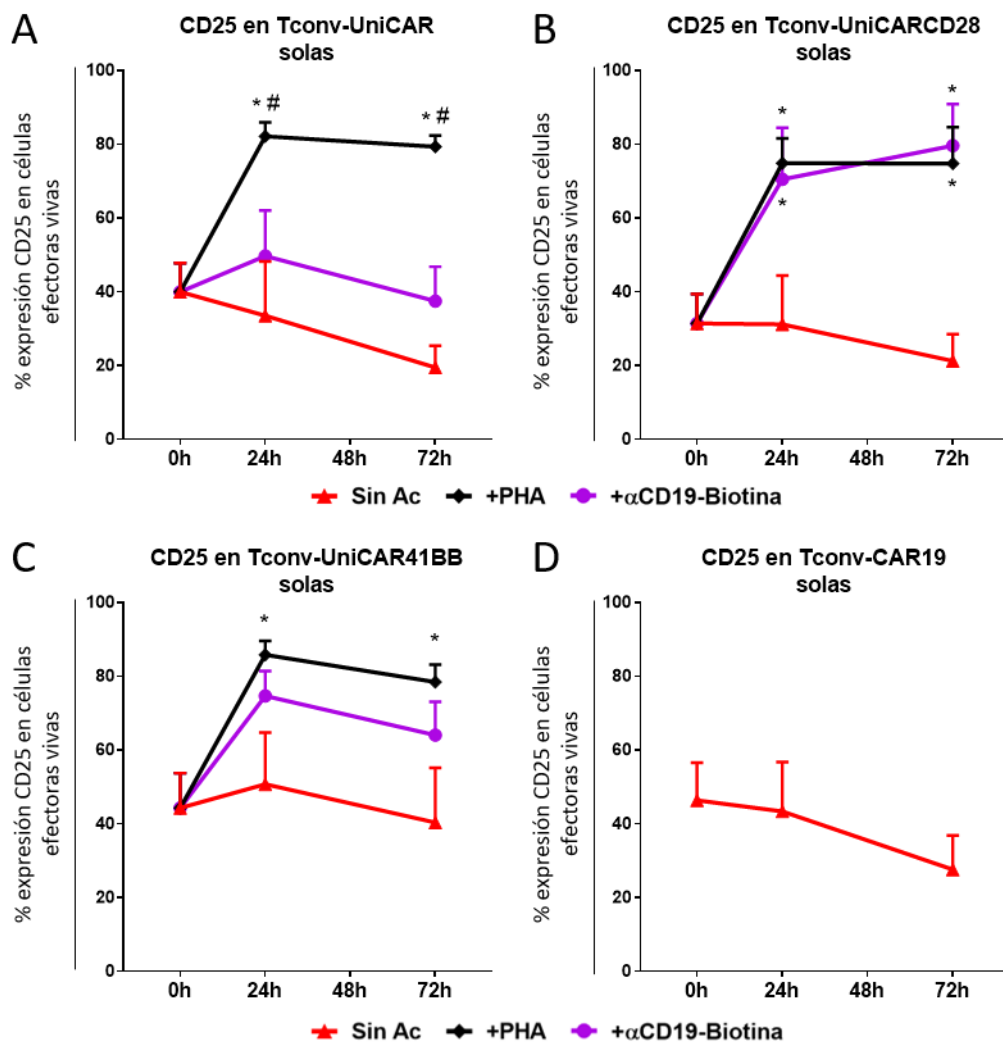
En resumen, el constructo UniCAR es capaz de estimular eficazmente a las células Tconv que lo portan cuando el Ac biotinilado adecuado es combinado junto con las células diana. Sin embargo, el UniCAR también induce una cierta activación basal en las Tconv tanto en co-cultivos sólo con células diana, como en presencia sólo de algún Ac biotinilado sin células diana.

#### **VI.4.3 Activación de las células Tconv mediada por los UniCAR de segunda generación**

Una vez comprobamos que el UniCAR de 3<sup>a</sup> generación actuaba de una manera más eficaz y específica en las Tconv que en las células de línea Jurkat-UniCAR, estudiamos si la alteración de los dominios de co-estimulación, dando lugar a los UniCARCD28 y UniCAR41BB, podía afectar a su capacidad de inducir activación en las Tconv y la función citolítica de estas. También estudiamos en paralelo el comportamiento de las Tconv transducidas con el CAR19

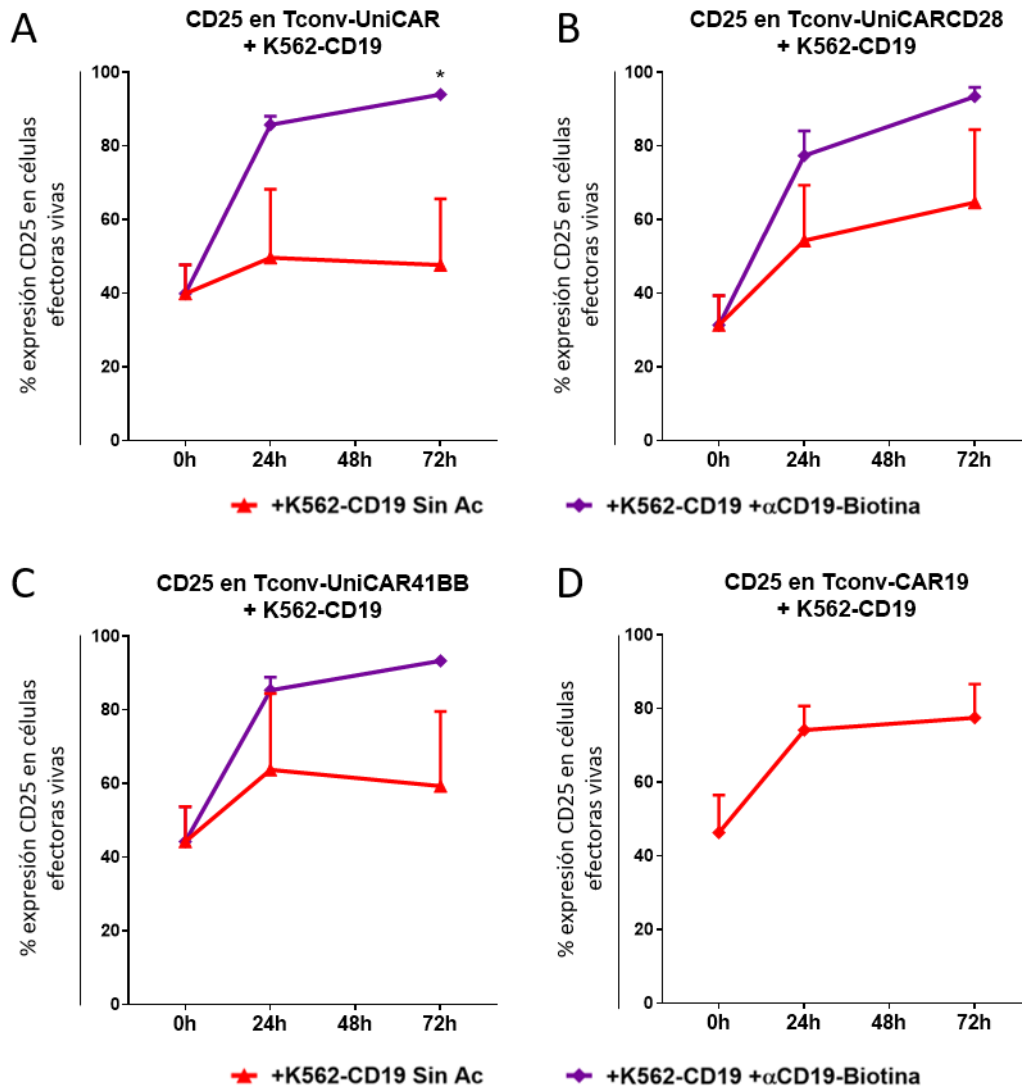
En las condiciones de Tconv-UniCAR cultivadas solas, el marcador CD25 se ve enormemente incrementado en las Tconv-UniCARCD28 cultivadas únicamente con el  $\alpha$ CD19-Biotina, alcanzando, incluso superando a las 72 horas, los valores del control positivo de activación con PHA. Este nivel de

activación celular es también muy superior al observado en la condición Tconv-UniCAR cultivadas con el  $\alpha$ CD19-Biotina (Figura 31A y B). En el caso de las Tconv-UniCAR41BB, la expresión del CD25 en la condición de células solas sin Ac es ligeramente superior a la mostrada por las Tconv-UniCAR. Al contrario que las Tconv-UniCARCD28, en la condición de Tconv-UniCAR41BB cultivadas con el  $\alpha$ CD19-Biotina, a pesar de que la expresión del CD25 se ve incrementada, esta no alcanza a la mostrada por el control positivo de activación (Figura 31C). Por último, la condición de células Tconv-CAR19 cultivadas solas, puesto que no necesitan Ac intermediarios, tienen la misma expresión basal del CD25 que las Tconv-UniCAR41BB sin Ac intermediario (Figura 31D).



**Figura 31. Evaluación de la expresión del marcador de activación CD25 en las Tconv modificadas genéticamente cultivadas en solitario.** Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD25 en las células vivas de las condiciones experimentales (A) Tconv-UniCAR, (B) Tconv-UniCARCD28, (C) Tconv-UniCAR41BB y (D) Tconv-CAR19 antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células que fueron cultivadas solas o en presencia de Ac  $\alpha$ CD19-Biotina. Como control positivo de activación, las células fueron estimuladas con PHA (N=3). Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  con respecto a las condiciones en ausencia de Ac intermediarios, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Por otra parte, se co-cultivaron las Tconv modificadas genéticamente con las células diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>. En la condición de co-cultivo sin Ac intermediario, las células Tconv-UniCAR muestran una expresión del CD25 reducida y estable a lo largo de los días de co-cultivo (Figura 32A). En el caso de las Tconv-UniCARCD28, tras 24 y 72h de co-cultivo en ausencia de Ac intermediarios, el porcentaje de CD25 aumenta progresivamente (Figura 32B), alcanzando la expresión del CD25 observada en la misma condición de co-cultivo con las Tconv-UniCAR41BB (Figura 32C), siendo esta expresión de ambos grupos de células superior a la de las Tconv-UniCAR. Sin embargo, las tres variedades de Tconv-UniCAR mostraron un patrón de activación muy similar cuando se co-cultivaron con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en presencia del  $\alpha$ CD19-Biotina, alcanzando todas ellas el máximo de expresión del CD25 (Figura 32A, B y C). Finalmente, las Tconv-CAR19 co-cultivadas con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia de Ac intermediarios, ya que estas células no los necesitan, presentan un alto porcentaje de activación, aunque este es ligeramente inferior al observado en las tres variedades de Tconv-UniCAR (Figura 32D).



**Figura 32. Evaluación de la expresión del marcador de activación CD25 en las Tconv modificadas genéticamente co-cultivadas con K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>.** Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD25 en las células vivas de las condiciones experimentales (A) Tconv-UniCAR, (B) Tconv-UniCARCD28, (C) Tconv-UniCAR41BB y (D) Tconv-CAR19 antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células que fueron co-cultivadas con células de línea K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia o en presencia de Ac  $\alpha$ CD19-Biotina. (N=3). Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  con respecto a las condiciones en ausencia de Ac intermediarios, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

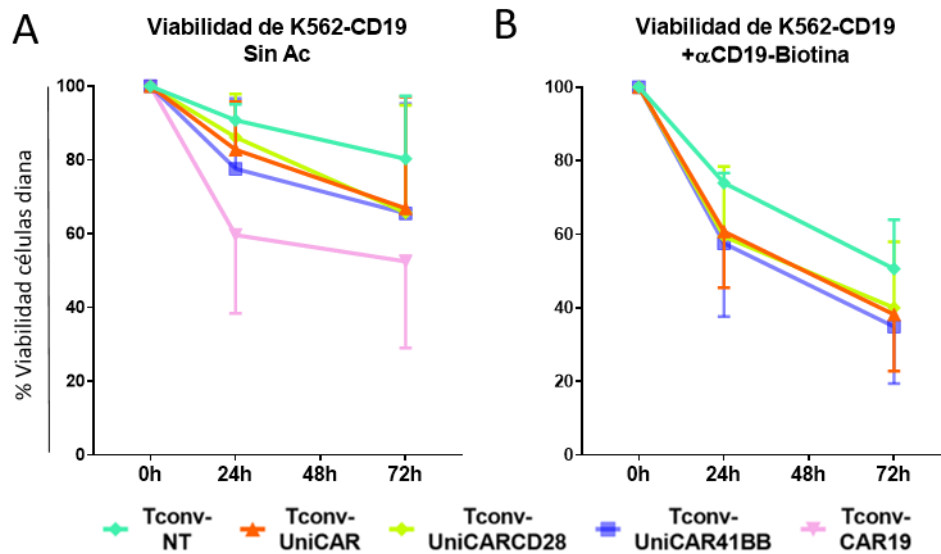
Por lo tanto, el UniCAR de tercera generación activan correctamente a las Tconv que lo portan en presencia de células dianas y del Ac intermediario biotilado adecuado, siendo superior esta activación a la inducida por el CAR19. Las células portadoras de ambos UniCAR de segunda generación también inducen una alta activación en presencia de células dianas y del Ac

intermediario biotinilado adecuado. Sin embargo, también se estimulan en gran medida en presencia únicamente del Ac biotinilado o de las células diana, por separado. Esta especificidad podría suponer un impedimento para su uso terapéutico.

#### VI.4.4 Diferencias en la lisis celular inducida según los UniCAR que porten las Tconv

Tras estudiar la activación mediada por las diferentes proteínas UniCAR en las células Tconv, analizamos si estos constructos tuvieron un impacto en la actividad citolítica de las Tconv sobre las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>. Para ello, estudiamos la viabilidad de estas células diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> tras ser co-cultivadas con las diferentes variedades de Tconv. Tal y como se esperaba, las células Tconv-CAR19 reducen mucho más la viabilidad de las células diana que las Tconv-NT y las diferentes Tconv-UniCAR en ausencia de Ac intermediarios, después de 24 y 72 horas de co-cultivo (viabilidad células diana en co-cultivo con Tconv-NT: 80,3% ± 17,09%; Tconv-UniCAR: 66,87% ± 30,2%; Tconv-UniCARCD28: 65,7% ± 29,15%; Tconv-UniCAR41BB: 65,55% ± 29,7%; Tconv-CAR19: 52,47% ± 23,48%, tras 72 horas de co-cultivo). De igual modo a lo mostrado anteriormente, las tres variedades de Tconv-UniCAR tienen un efecto citolítico sobre la viabilidad de las células diana superior al de las Tconv-NT, probablemente debido al superior estado de activación basal inducido por los UniCAR (Figura 33A).

Por otro lado, paradójicamente la presencia del Ac αCD19-Biotina afecta a la viabilidad de las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, incluso, en los co-cultivos con las Tconv-NT. Teniendo en cuenta este fenómeno, se puede observar que todas las condiciones de Tconv-UniCAR presentan una mayor capacidad citolítica de las células diana que las Tconv-NT e, incluso, que las Tconv-CAR19, cuando se añade αCD19-Biotina al co-cultivo (viabilidad células diana en co-cultivo con Tconv-NT: 50,62% ± 13,31%; Tconv-UniCAR: 38,2% ± 15,39%; Tconv-UniCARCD28: 40,03% ± 17,93%; Tconv-UniCAR41BB: 34,88% ± 15,49%, tras 72 horas de co-cultivo) (Figura 33B).



**Figura 33. Evaluación de la viabilidad de la población de células diana en los co-cultivos.** (A) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de viabilidad de las células de línea diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, cuando son co-cultivadas en ausencia de Ac intermediarios con las células Tconv no transducidas (NT), Tconv-UniCAR, Tconv-UniCARCD28, Tconv-UniCAR41BB y Tconv-CAR19 antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. N=3. (B) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de viabilidad de las células de línea diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, cuando son co-cultivadas en presencia del Ac intermediario  $\alpha$ CD19-Biotina con las células Tconv no transducidas (NT), Tconv-UniCAR, Tconv-UniCARCD28 y Tconv-UniCAR41BB antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. N=3. Para marcar la Viabilidad se usó 7AAD. Ratio de todas las condiciones 1:1 (Tconv : Cel. Diana). Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Gracias a estos resultados, concluimos en este apartado que: I) El UniCAR de 3<sup>a</sup> generación activa de una forma más específica a las células primarias Tconv que lo portan que a las células de línea Jurkat. II) Las células Tconv-UniCARCD28 tienen una activación específica de biotina, pero inespecífica de la presencia de la célula diana. Esto también se observa en las Tconv-UniCAR41BB, pero en menor medida, y no lo presentan las Tconv-UniCAR. Esta activación inespecífica podría suponer una limitación en la aplicación terapéutica de las Tconv con ambos UniCAR de segunda generación. III) Estas diferencias en la activación mediada por los diferentes UniCAR en las Tconv no afectan a su capacidad citolítica, que es incluso mayor a la observada por las Tconv-CAR19.

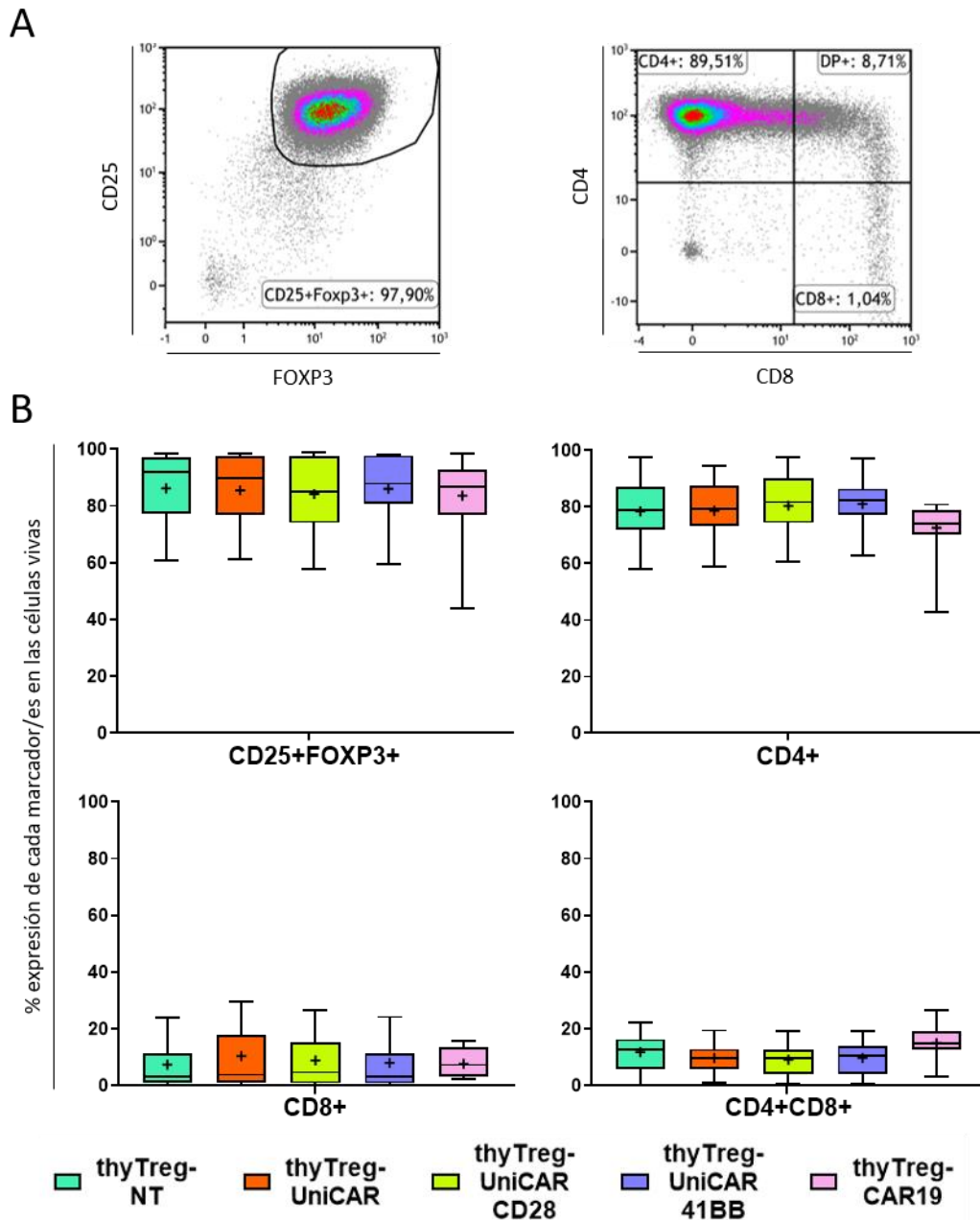
## VI.5 thyTreg-UniCAR

Hemos observado que los diferentes tipos de UniCAR inducen distintos perfiles de estimulación en las Tconv, siendo el UniCAR de tercera generación el que mostró mayor especificidad. Con el objetivo de elegir el mejor constructo para las thyTreg, y teniendo en cuenta que los dominios co-estimuladores actúan de una forma diferente en Tconv y en Treg (195, 196), decidimos continuar con el estudio de los tres tipos de UniCAR. De igual modo, se usaron thyTreg transducidas con el CAR19, constructo que ya está siendo usado en la clínica.

### VI.5.1 Fenotipo de las células thyTreg modificadas genéticamente

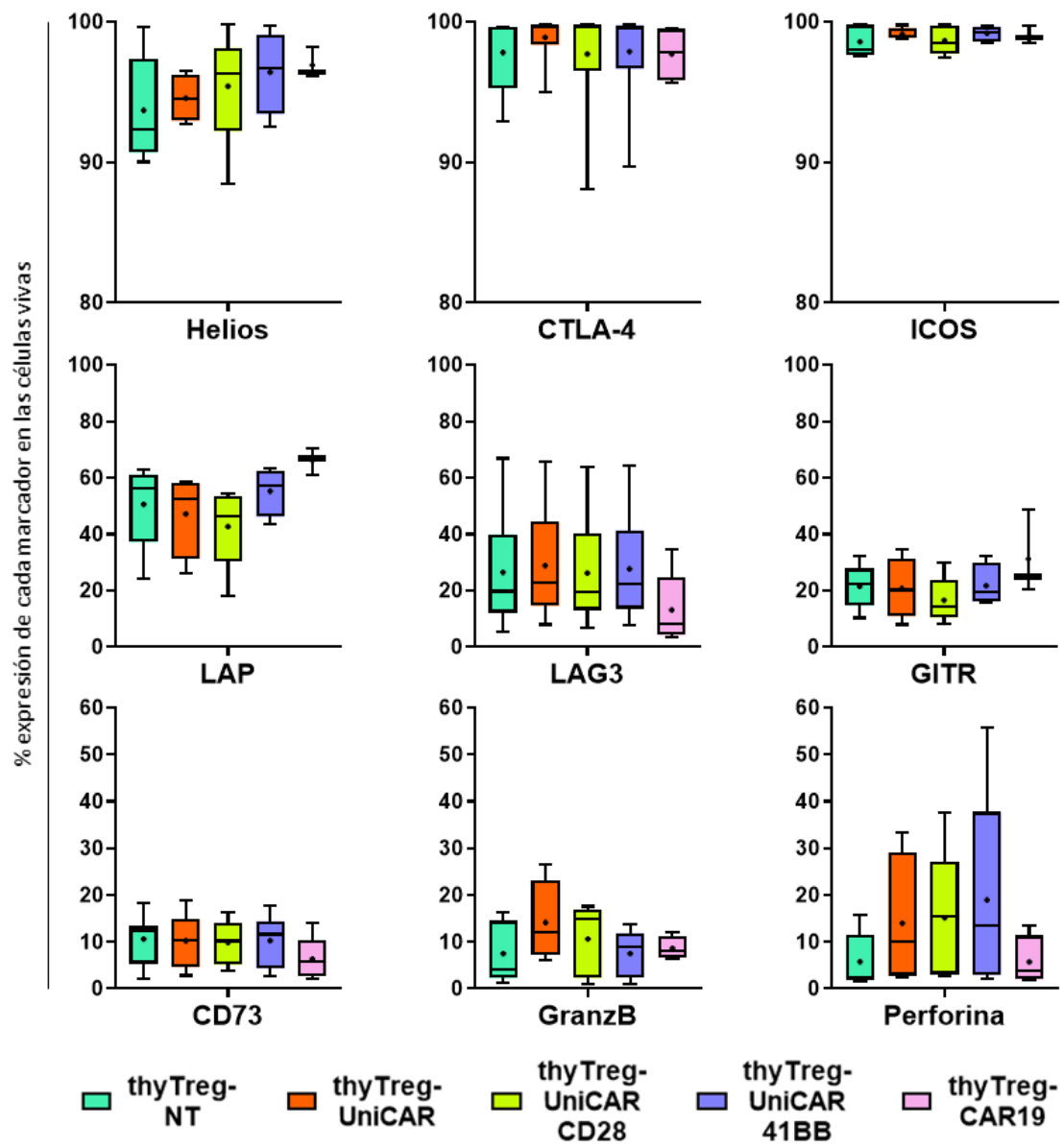
En primer lugar, se verificó si la modificación genética con los diferentes tipos de UniCAR podría afectar al fenotipo de las thyTreg. Para ello, tras el protocolo de activación, transducción y expansión (Ver apartado V.4.4), se estudiaron los marcadores celulares clásicos de las thyTreg, el CD25 y FOXP3.

Se puede observar que la población CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> dentro de las células vivas es superior al 90%, de media, y no varía entre las distintas condiciones de células modificadas genéticamente y tras el aislamiento de la población EGFP<sup>alto</sup>, con respecto a la condición NT. Además, las thyTreg también se han descrito clásicamente como CD4<sup>+</sup> (197, 198) o DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (112). La modificación genética de las thyTreg con los UniCAR tampoco altera la expresión del CD4, CD8 o el porcentaje de la población DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> con respecto a las thyTreg-NT (Figura 34A y B).



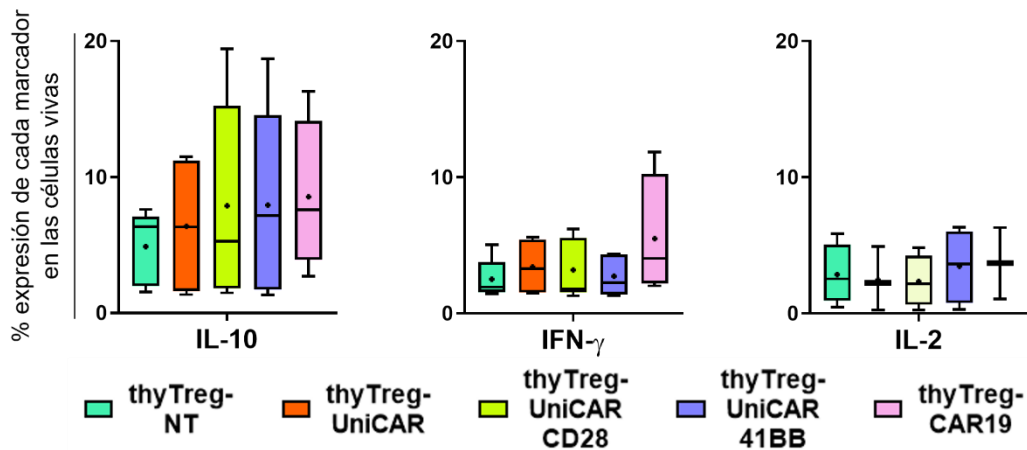
**Figura 34. Expresión de marcadores de las thyTreg a día 7 de cultivo.** (A) Diagramas de puntos que muestran la expresión de CD25, FOXP3, CD4 y CD8 en las células thyTreg, visualizados por citometría de flujo a día 7, tras el protocolo de activación, transducción y selección de la población EGFP<sup>alto</sup>. Estos diagramas de puntos suponen un ejemplo representativo de lo observado en las thyTreg. (B) Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de expresión de la población CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (arriba-izquierda), CD4<sup>+</sup> (arriba-derecha), CD8<sup>+</sup> (abajo-izquierda) y DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (abajo-derecha) en la población de células vivas de las condiciones thyTreg no transducidas (NT) (N=22), thyTreg-UniCAR (N=22), thyTreg-UniCARCD28 (N=22); thyTreg-UniCAR41BB (N=22) y thyTreg-CAR19 (N=16). Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

Igualmente, se analizó otros marcadores clásicos asociados activamente con la estabilidad fenotípica, como HELIOS (199, 200) y en la funcionalidad supresora de las Treg, como el CTLA-4 o ICOS, entre otros (42, 201). Se puede observar que la expresión de estos marcadores es elevadísima en todas las condiciones y no se observan diferencias significativas entre ninguna de ellas con respecto a las thyTreg-NT. En el caso de otras proteínas que intervienen en la función supresora, como el LAP y LAG3, la expresión media es cercana al 50% y al 30%, respectivamente, en todas las condiciones y no se observan diferencias significativas entre ninguna de ellas con respecto a las thyTreg-NT. Las proteínas GITR (de media 20%) y CD73 (de media 10%) apenas son expresadas por las thyTreg y tampoco se observan diferencias significativas entre las condiciones con respecto a las thyTreg-NT. Finalmente, a pesar de que las diferencias en la expresión de la GranzB y la Perforina no son significativas, se puede observar una diferencia en los porcentajes de expresión entre los diferentes tipos de las thyTreg. De hecho, la expresión de la GranzB en las thyTreg-UniCAR ( $14,15\% \pm 4,4\%$ ; media  $\pm$  SEM) es el doble a la mostrada por las thyTreg-NT ( $7,5\% \pm 2,9\%$ ; media  $\pm$  SEM). En el caso de la Perforina, la expresión de las thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28 y thyTreg-UniCAR41BB ( $13,98\% \pm 7,2\%$ ;  $15,15\% \pm 6,3\%$  y  $18,95\% \pm 9,7\%$ , respectivamente, media  $\pm$  SEM) triplica a la mostrada por las thyTreg-NT ( $5,76\% \pm 2,67\%$ , media  $\pm$  SEM). En el caso de las thyTreg-CAR19, no muestran estos incrementos en la expresión de estas dos proteínas y su porcentaje es muy similar al observado en las thyTreg-NT (Figura 35).



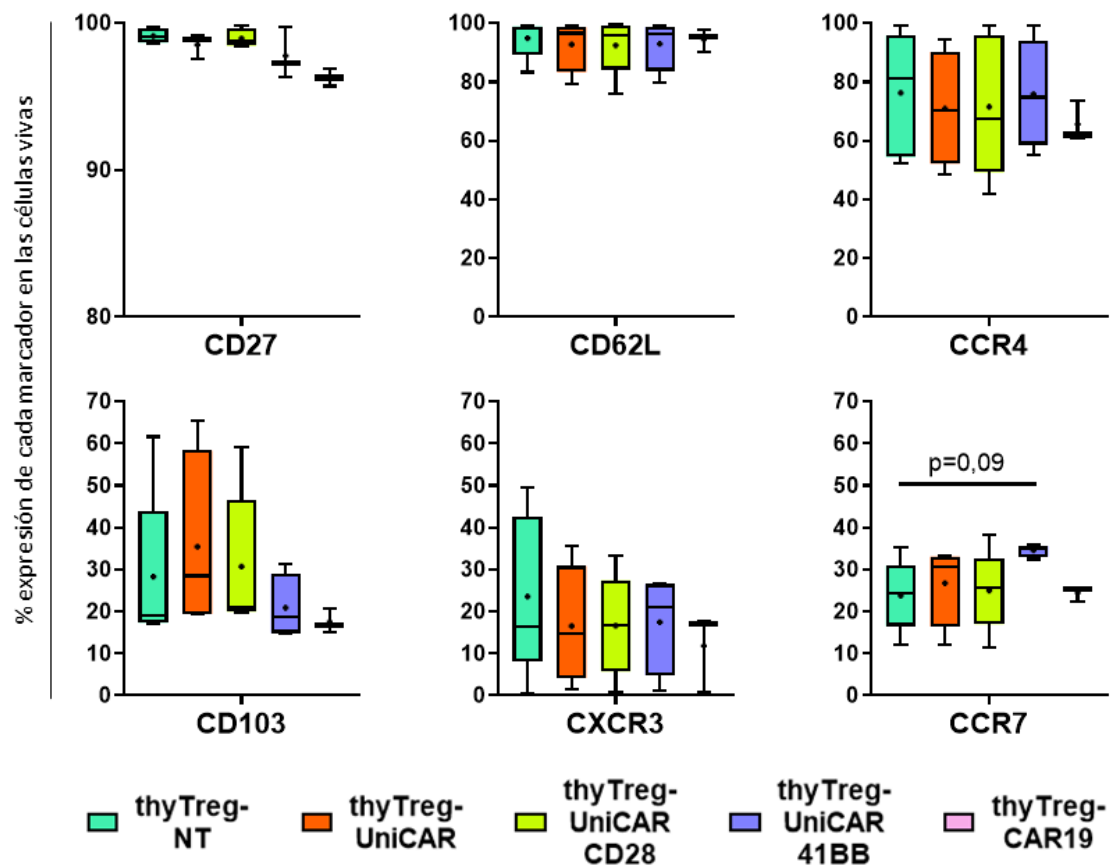
**Figura 35. Expresión de marcadores asociados a la estabilidad fenotípica o a la funcionalidad de las thyTreg, a día 7.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de expresión de la población HELIOS<sup>+</sup> (arriba-izquierda: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), CTLA-4<sup>+</sup> (arriba-medio: N=7 en thyTreg-NT; N=6 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCARCD28 y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=4 en thyTreg-CAR19), ICOS<sup>+</sup> (arriba-derecha: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), LAP<sup>+</sup> (medio-izquierda: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), LAG3<sup>+</sup> (medio-medio: N=7 en thyTreg-NT; N=6 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCARCD28 y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=4 en thyTreg-CAR19), GITR<sup>+</sup> (medio-derecha: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), CD73<sup>+</sup> (abajo-izquierda: N=7 en thyTreg-NT; N=6 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCARCD28 y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=4 en thyTreg-CAR19), Granzima B<sup>+</sup> (GranzB) (abajo-medio: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCAR41BB y en thyTreg-CAR19) y Perforina<sup>+</sup> (abajo-derecha: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCAR41BB y en thyTreg-CAR19) en la población de células vivas de las todas las condiciones, a día 7. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

Igualmente, hemos estudiado qué interleuquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias expresan basalmente estas células y si la modificación genética ha alterado ese perfil de alguna manera. Como interleuquinas anti-inflamatoria, estudiamos la frecuencia de las células productoras de la IL-10. Aunque las diferencias no son estadísticamente diferentes, la modificación genética con cualquier tipo de constructo eleva el porcentaje de células productoras de esta interleuquina, comparando con las thyTreg-NT. En el caso de las IFN- $\gamma$  o la IL-2, todos los tipos de thyTreg-NT muestran una baja producción de ellas, a pesar de ver un claro aumento de las células productoras IFN- $\gamma$  en la condición thyTreg-CAR19. Sin embargo, estas diferencias en la frecuencia de células productoras de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en ningún caso son significativas comparando con las thyTreg no transducidas (Figura 36).



**Figura 36. Frecuencia de las células productoras de interleuquinas pro- y anti-inflamatorias por parte de los diferentes tipos de thyTreg, a día 7.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de células que producen IL-10 (izquierda: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCAR41BB y en thyTreg-CAR19), IFN- $\gamma$  (medio: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR, en thyTreg-UniCAR41BB y en thyTreg-CAR19) e IL-2 (derecha: N=4 en thyTreg-NT, en thyTreg-UniCARCD28 y en thyTreg-UniCAR41BB; N=3 en thyTreg-UniCAR y thyTreg-CAR19) en la población de células vivas de todas las condiciones, a día 7. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

Por último, estudiamos la expresión de varios receptores de quimioquinas, integrinas y selectinas que son responsables de la capacidad de las thyTreg de reconocer y migrar a los tejidos (112). Observamos una altísima expresión de los marcadores CD27 y CD62L en todas las condiciones y sin diferencias significativas entre ellas. Tampoco se aprecian diferencias significativas en la expresión más baja, y variable, de los marcadores CCR4, CD103 o CXCR3. Por último, la expresión del CCR7 es muy parecida para la mayoría de condiciones, excepto la condición thyTreg-UniCAR41BB, que muestra un porcentaje casi significativamente superior comparándola con las thyTreg-NT (Figura 37)



**Figura 37. Marcadores de migración y adhesión en las thyTreg, a día 7.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del porcentaje de expresión de la población CD27<sup>+</sup> (arriba-izquierda: N=4 en thyTreg-NT; N=3 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=2 en thyTreg-CAR19), CD62L<sup>+</sup> (arriba-medio: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), CCR4<sup>+</sup> (arriba-derecha: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), CD103<sup>+</sup> (abajo-izquierda: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19), CXCR3<sup>+</sup> (abajo-izquierda: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19) y CCR7<sup>+</sup> (abajo-derecha: N=5 en thyTreg-NT y en thyTreg-UniCARCD28; N=4 en thyTreg-UniCAR y en thyTreg-UniCAR41BB; y N=3 en thyTreg-CAR19) en la población de células vivas de todas las condiciones a día 7. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de un factor.

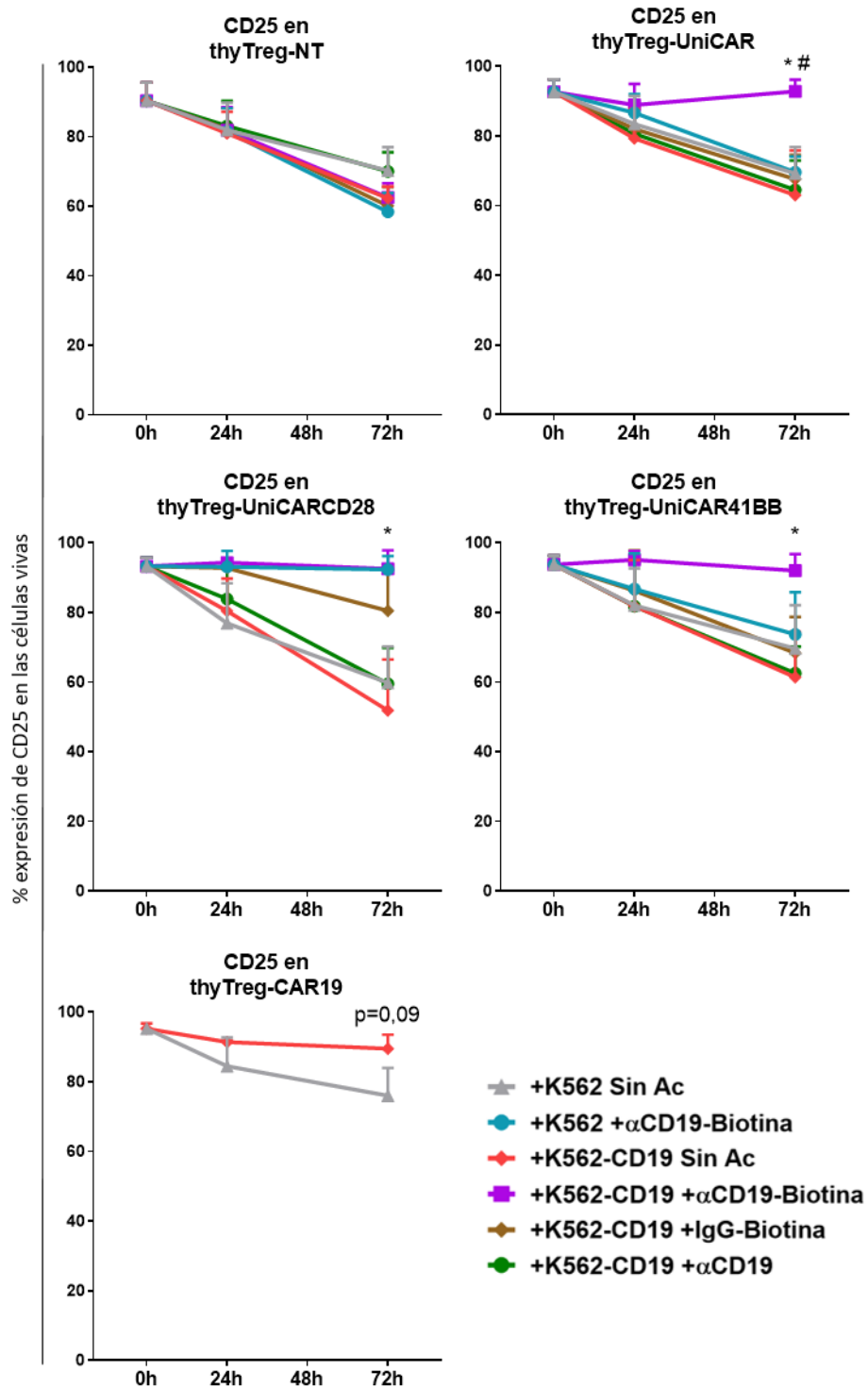
Por tanto, se ha verificado que la modificación genética para expresar las diferentes proteínas UniCAR, en general, no altera el fenotipo clásico, excepto por el aumento en la frecuencia de células que expresan la Granzima-B, la Perforina, la IL-10 o el CCR7, aunque estos aumentos no son significativos.

### VI.5.2 Estimulación de las thyTreg mediada por los UniCAR.

A continuación, se estudió si los diferentes constructos UniCAR eran capaces de desarrollar correctamente su función de activación de las thyTreg. Dada su importancia, decidimos estudiar en profundidad el fenotipo de activación de las thyTreg analizando un amplio abanico de marcadores de activación. También incluimos la condición de thyTreg que expresaban el CAR19. Para ello, tras el protocolo de activación, transducción y selección, co-cultivamos a día 7 los diferentes tipos de thyTreg con células de línea K562-CTVio<sup>+</sup> o con K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> y estudiamos múltiples marcadores de activación celular de las thyTreg a las 24 y 72 horas de co-cultivo (Ver apartado V.6.3).

Enfocándonos en el CD25, observamos una disminución progresiva de la expresión de este marcador en todas las condiciones de las células thyTreg-NT, aun partiendo de una elevadísima expresión al inicio del co-cultivo (Figura 38, arriba-izquierda). La alta expresión de este marcador al inicio del co-cultivo corresponde al propio fenotipo de las thyTreg CD25<sup>+</sup>. En el caso de las thyTreg-UniCAR, todas las condiciones, excepto una, también sufren esa pérdida progresiva de la expresión del CD25. Esta condición que no solo mantiene, sino que, incluso, incrementa el porcentaje de expresión del CD25, es la condición de co-cultivo entre las células thyTreg-UniCAR y K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> a las que se añadió el Ac intermediario  $\alpha$ CD19-Biotina. Al contrario que las células Jurkat y que las Tconv, las thyTreg modificadas genéticamente con el UniCAR de tercera generación no muestran ni un ligero incremento de activación en las condiciones control en contacto con el IgG-Biotina o solas con las células dianas sin intermediario (Figura 38, arriba-derecha). Del mismo modo, observamos que esta condición de co-cultivo entre las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> +  $\alpha$ CD19-Biotina con las células thyTreg-UniCAR41BB o thyTreg-UniCARCD28 también se mantienen unos altísimos niveles de expresión de CD25 en estas células. Sin embargo, en las thyTreg-UniCARCD28, el CD25 también se ve incrementado en las condiciones de co-cultivo con K562-CTVio<sup>+</sup> sin el CD19, pero en presencia del Ac  $\alpha$ CD19-Biotina, o en el co-cultivo con K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, pero en presencia del IgG-Biotina, resultados no observados en el caso de las thyTreg-UniCAR41BB

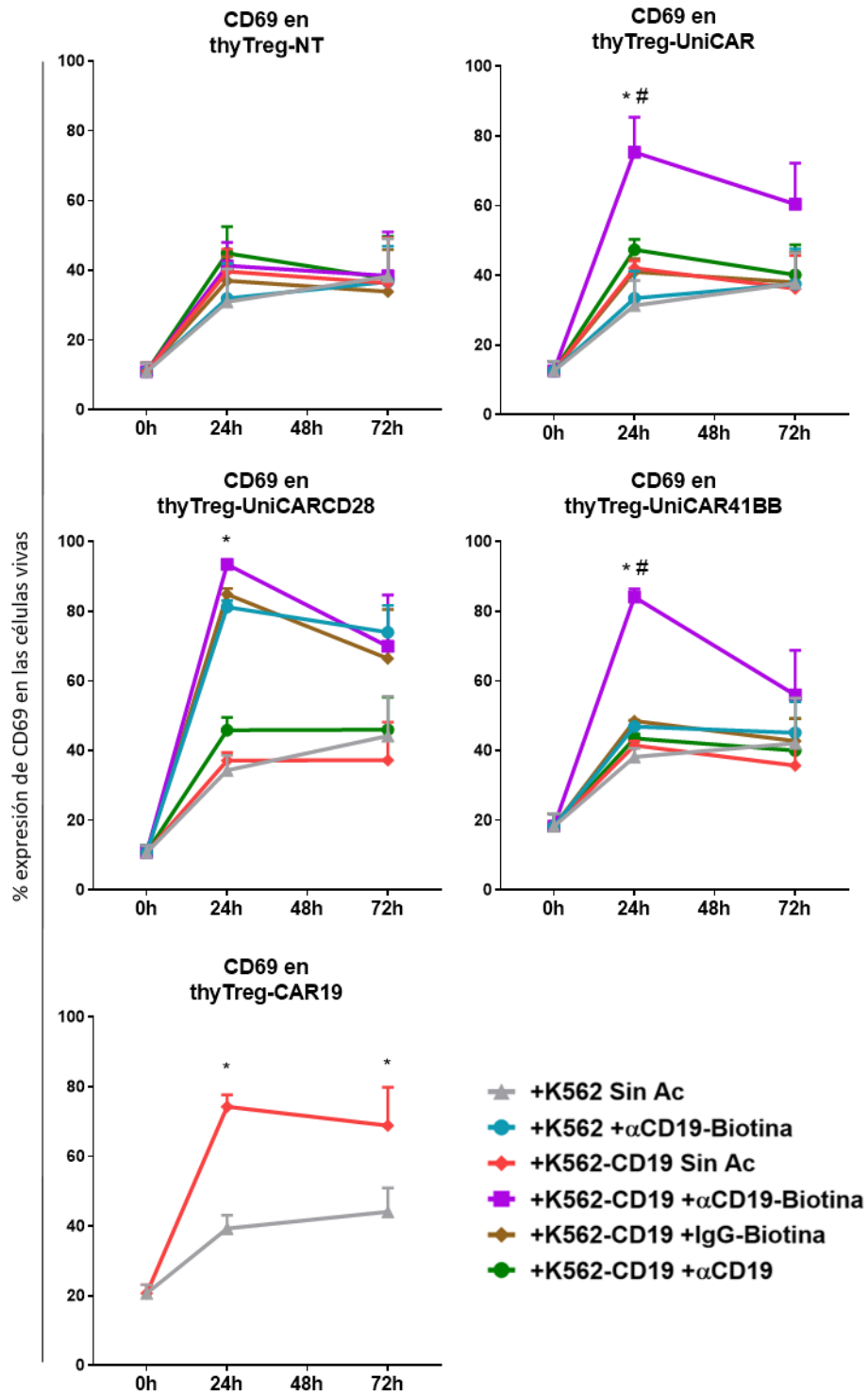
(Figura 38, medio-izquierda y medio-derecha). Por último, como era de esperar, la expresión del CD25 en las thyTreg-CAR19 co-cultivadas con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> se mantiene alta a lo largo de los días, comparándola con la pérdida progresiva de este marcador en las thyTreg-CAR19 co-cultivadas con K562-CTVio<sup>+</sup> sin expresión del CD19 (Figura 38, abajo-izquierda).



**Figura 38. Evaluación de la expresión del marcador de activación CD25 en las thyTreg modificadas genéticamente.** Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD25 en células vivas de cada una de las condiciones experimentales de las thyTreg-NT (arriba-izquierda), thyTreg-UniCAR (arriba-derecha), thyTreg-UniCARCD28 (medio-izquierda), thyTreg-UniCAR41BB (medio-derecha) y thyTreg-CAR19 (abajo-izquierda) antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células que fueron co-cultivadas con células de línea K562-CTVio<sup>+</sup> o K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>. A su vez, fueron co-cultivadas en presencia, o ausencia, de los Ac  $\alpha$ CD19-Biotina,  $\alpha$ CD19 e IgG-Biotina (N=3). Ratio 1:1. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  con respecto a la condición de co-cultivo + K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia de Ac intermediarios. Diferencias estadísticamente significativas # cuando  $p < 0,05$  con respecto al resto de condiciones control de cada tipo celular en el mismo día co-cultivo, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

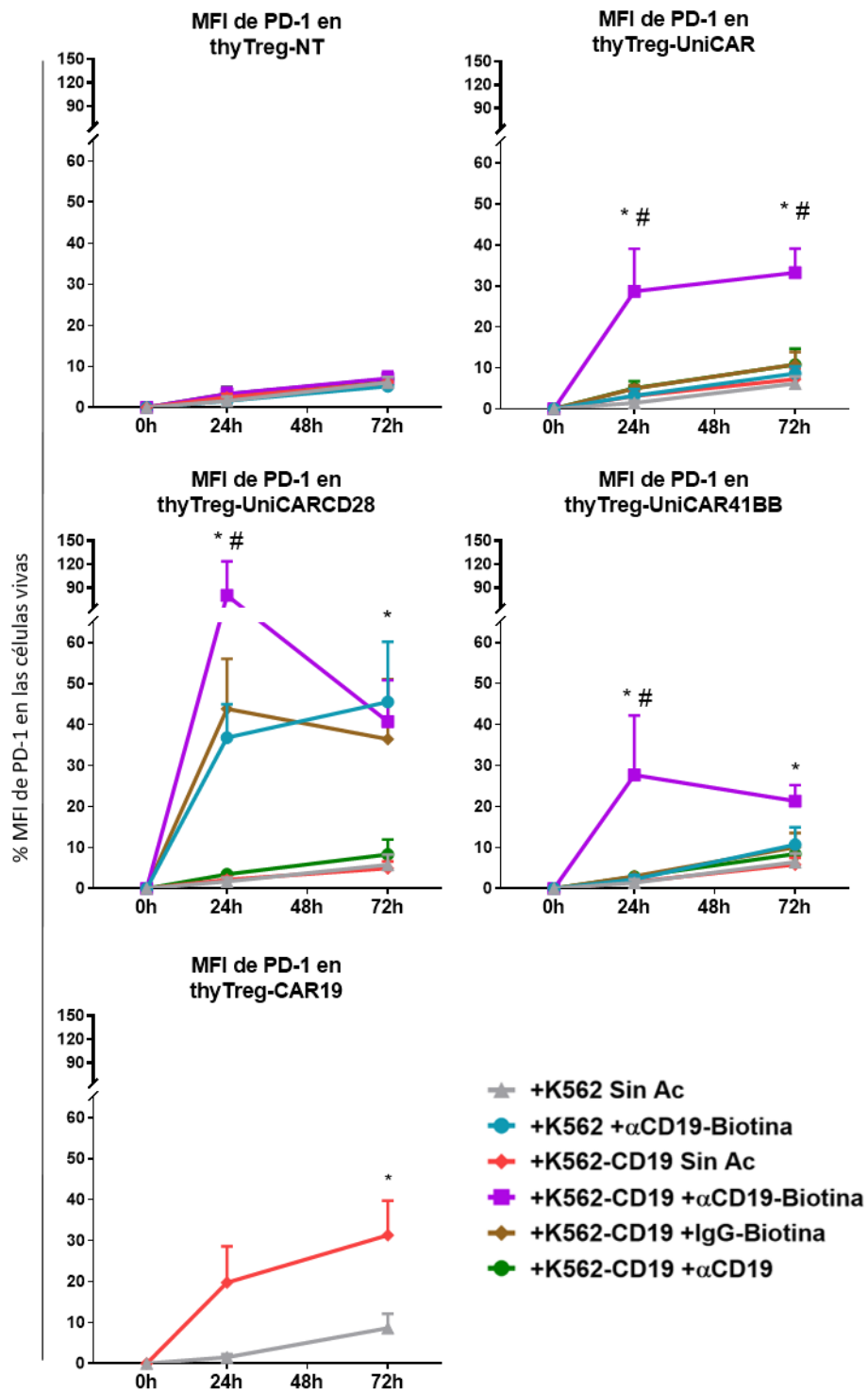
Junto con el CD25, cuyas principales diferencias son observables tras 72h de co-cultivo, decidimos estudiar el perfil de expresión de un marcador de activación temprana. Para ello, elegimos el CD69. Este marcador es rápidamente expresado por la mayoría de leucocitos que sufren una activación, entre ellos las Treg (191). Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la baja expresión de este marcador entre las diferentes condiciones en las que las thyTreg-NT están involucradas (Figura 39, arriba-izquierda). Por el contrario, tras las primeras 24 horas de co-cultivo, la expresión del CD69 sufre un aumento únicamente en las células thyTreg-UniCAR co-cultivadas con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> y en presencia del Ac  $\alpha$ CD19-Biotina. Además, como era de esperar en un marcador de activación temprana, tras el pico de expresión máxima en las primeras 24 horas de co-cultivo, su expresión celular disminuye cuando se mide a las 72h de co-cultivo (Figura 39, arriba-derecha). En las condiciones de co-cultivo entre las thyTreg-UniCARCD28 y las thyTreg-UniCAR41BB con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> +  $\alpha$ CD19-Biotina, la expresión del CD69 tras 24h de co-cultivo es incluso más elevada a la observada en las thyTreg-UniCAR (Figura 39, medio-izquierda y medio-derecha). Sin embargo, como ocurría con el CD25, las thyTreg-UniCARCD28 que están en contacto con cualquier Ac biotinilado, independientemente del Ac y de las células diana presentes en el co-cultivo, la expresión de CD69 también se ve muy incrementada tras las primeras 24h de co-cultivo, resultados no observados en las thyTreg-UniCAR41BB. Por

último, en el caso de las thyTreg-CAR19 co-cultivadas con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, la expresión del CD69 se incrementa significativamente en las primeras 24 horas de co-cultivo, comparado con el co-cultivo de estas células con K562-CTVio<sup>+</sup> sin expresión del CD19, y se mantiene elevado hasta el final del co-cultivo (Figura 39, abajo-izquierda).



**Figura 39. Evaluación de la expresión del marcador de activación CD69 en las thyTreg modificadas genéticamente.** Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión del CD69 en células vivas de cada una de las condiciones experimentales de las thyTreg-NT (arriba-izquierda), thyTreg-UniCAR (arriba-derecha), thyTreg-UniCARCD28 (medio-izquierda), thyTreg-UniCAR41BB (medio-derecha) y thyTreg-CAR19 (abajo-izquierda) antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células que fueron co-cultivadas con células de línea K562-CTVio<sup>+</sup> o K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>. A su vez, fueron co-cultivadas en presencia, o ausencia, de los Ac  $\alpha$ CD19-Biotina,  $\alpha$ CD19 e IgG-Biotina (N=3). Ratio 1:1. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  con respecto a la condición de co-cultivo + K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia de Ac intermediarios. Diferencias estadísticamente significativas # cuando  $p < 0,05$  con respecto al resto de condiciones control de cada tipo celular en el mismo día co-cultivo, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Además de los marcadores de activación anteriores, hemos estudiado la MFI del marcador de activación PD-1 (Figura 40), y el porcentaje de expresión de otros marcadores de activación, como el CD71, HLA-DR y de la combinación de ICOS y PD-1 (resultados no mostrados).



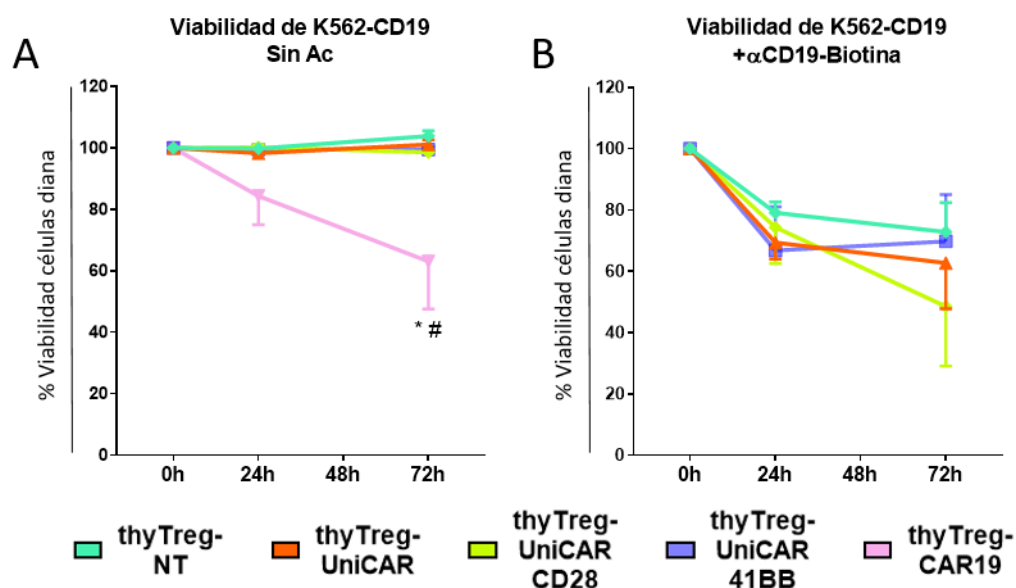
**Figura 40. Evaluación de la MFI del marcador de activación PD-1 en los diferentes tipos de thyTreg modificadas genéticamente.** Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM de la Media de la Intensidad de Fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de la expresión del PD-1 en las células vivas de las thyTreg-NT (arriba-izquierda), thyTreg-UniCAR (arriba-derecha), thyTreg-UniCARCD28 (medio-izquierda), thyTreg-UniCAR41BB (medio-derecha) y thyTreg-CAR19 (abajo-izquierda) antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Células que fueron co-cultivadas con células de línea K562-CTVio<sup>+</sup> o K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>. A su vez, fueron co-cultivadas en presencia, o ausencia, de los Ac  $\alpha$ CD19-Biotina,  $\alpha$ CD19 e IgG-Biotina (N=3). Ratio 1:1. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  con respecto a la condición de co-cultivo + K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia de Ac intermediarios. Diferencias estadísticamente significativas # cuando  $p < 0,05$  con respecto al resto de condiciones control de cada tipo celular en el mismo día co-cultivo, proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

La conclusión de este apartado es que la presencia de Ac, sin biotinar o biotinilados, no inducen una activación basal en las thyTreg sin modificar genéticamente. Además, los constructos UniCAR y UniCAR41BB proporcionan una estimulación altamente específica a las thyTreg que los portan únicamente en presencia de la célula diana adecuada y con el Ac biotinilado correcto. Los niveles de activación mostrados por las células modificadas con estos dos constructos son muy similares a los mostrados por las thyTreg modificadas con el CAR19, constructo control en este estudio y ya usado en la clínica. Por el contrario, la estimulación de las células thyTreg-UniCARCD28 es elevadísima y específica de biotina, pero inespecífica de célula diana. Estos resultados difieren a lo observado cuando se modificaron las células de línea Jurkat o Tconv con los diferentes constructos. Eso demuestra que la activación celular resultante a la acción de los diferentes dominios de co-estimulación de cada tipo de UniCAR afectan de diferente forma según las células utilizadas.

### VI.5.3 Viabilidad de las K562-CD19 en los co-cultivos con thyTreg-UniCAR.

Por último, estudiamos la viabilidad de las células diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> co-cultivadas con las diferentes variedades de thyTreg. En la condición de las thyTreg co-cultivadas con las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> en ausencia de Ac intermediarios, la viabilidad de las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> no se ve afectada por ninguna variedad de thyTreg, excepto en el caso de las thyTreg-CAR19, cuya

viabilidad tras 72h de co-cultivo se vio muy reducida ( $63,05\% \pm 15,53\%$ , media  $\pm$  SEM) (Figura 41A). Por otro lado, tal y como ocurría con las Tconv, la viabilidad de las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> se ve reducida cuando se añade el Ac  $\alpha$ CD19-Biotina, incluso por las thyTreg-NT. Suponemos que la presencia del Ac  $\alpha$ CD19 aumenta la susceptibilidad de las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, induciendo en ellas la muerte celular. Sin embargo, teniendo en cuenta este fenómeno, y a pesar de que las diferencias entre las thyTreg-NT y las condiciones de células UniCAR no son significativas, se pueden observar diferencias en la viabilidad de las células diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> co-cultivadas en presencia del  $\alpha$ CD19-Biotina con cualquier tipo de UniCAR con respecto de las thyTreg-NT (viabilidad de las células diana co-cultivadas con: thyTreg-NT:  $72,82\% \pm 9,6\%$ ; thyTreg-UniCAR:  $62,7\% \pm 14,94\%$ ; thyTreg-UniCARCD28:  $48,55\% \pm 19,45\%$ ; thyTreg-UniCAR41BB:  $69,75\% \pm 15,28\%$ ) tras 72 horas de co-cultivo (Figura 41B).



**Figura 41. Evaluación de la viabilidad de la población de células diana en los co-cultivos.** (A) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de viabilidad de las células de línea diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, cuando son co-cultivadas en ausencia de Ac intermediarios con las células thyTreg no transducidas (NT), thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28, thyTreg-UniCAR41BB y thyTreg-CAR19 antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. N=3. (B) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de viabilidad de las células de línea diana K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>, cuando son co-cultivadas en presencia del Ac intermediario  $\alpha$ CD19-Biotina con las células thyTreg no transducidas (NT), thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28 y thyTreg-UniCAR41BB antes del co-cultivo, tras 24 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. N=3. Para marcar la Viabilidad se usó 7AAD. Ratio de todas las condiciones 1:1 (thyTreg : K562-CD19-CTVio<sup>+</sup>). Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Aunque las células K562-CD19 son muy sensibles a la presencia de un Ac  $\alpha$ -CD19, se observa una cierta capacidad citolítica por parte de las thyTreg modificadas genéticamente. Sin embargo, esta capacidad es menor que la inducida por las correspondientes Tconv en sus condiciones de acción óptimas cuando se analiza el porcentaje de viabilidad de las K562-CD19-CTVio<sup>+</sup> tras 72h de co-cultivo (Figuras 33 y 41).

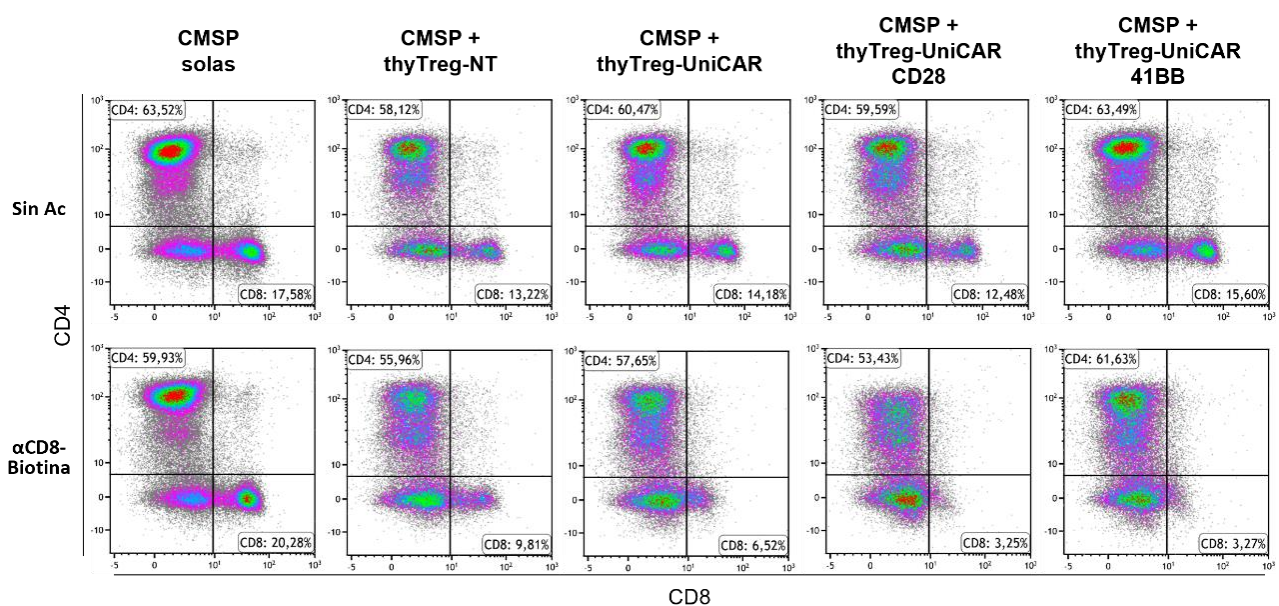
Estos resultados muestran que a pesar de que los UniCAR aumenta la capacidad citolítica de las thyTreg sobre células de línea, superando incluso a la ejercida por las thyTreg-CAR19, en ningún caso esta alcanza a la mostrada por las mismas condiciones en Tconv.

#### **VI.5.4 Las thyTreg modificadas genéticamente reducen la frecuencia y la concentración de las células diana en los co-cultivos con CMSP.**

Una vez demostrado que las thyTreg-UniCAR y thyTreg-UniCAR41BB se activan de una manera específica, estudiamos el comportamiento de las diferentes thyTreg-UniCAR en modelos *in vitro* más fisiológicos. Las Treg tienen como función principal la de limitar la activación y proliferación de células inflamatorias activadas. Por ello, con el objetivo de verificar si la modificación genética afectaba a la capacidad de supresión de las thyTreg se llevó a cabo un ensayo derivado de la reacción de linfocitos mixtos (MLR, por sus siglas en inglés). Este consistió en una re-estimulación durante 24 horas de todos los tipos de thyTreg con *Dynabeads*. Paralelamente, también se

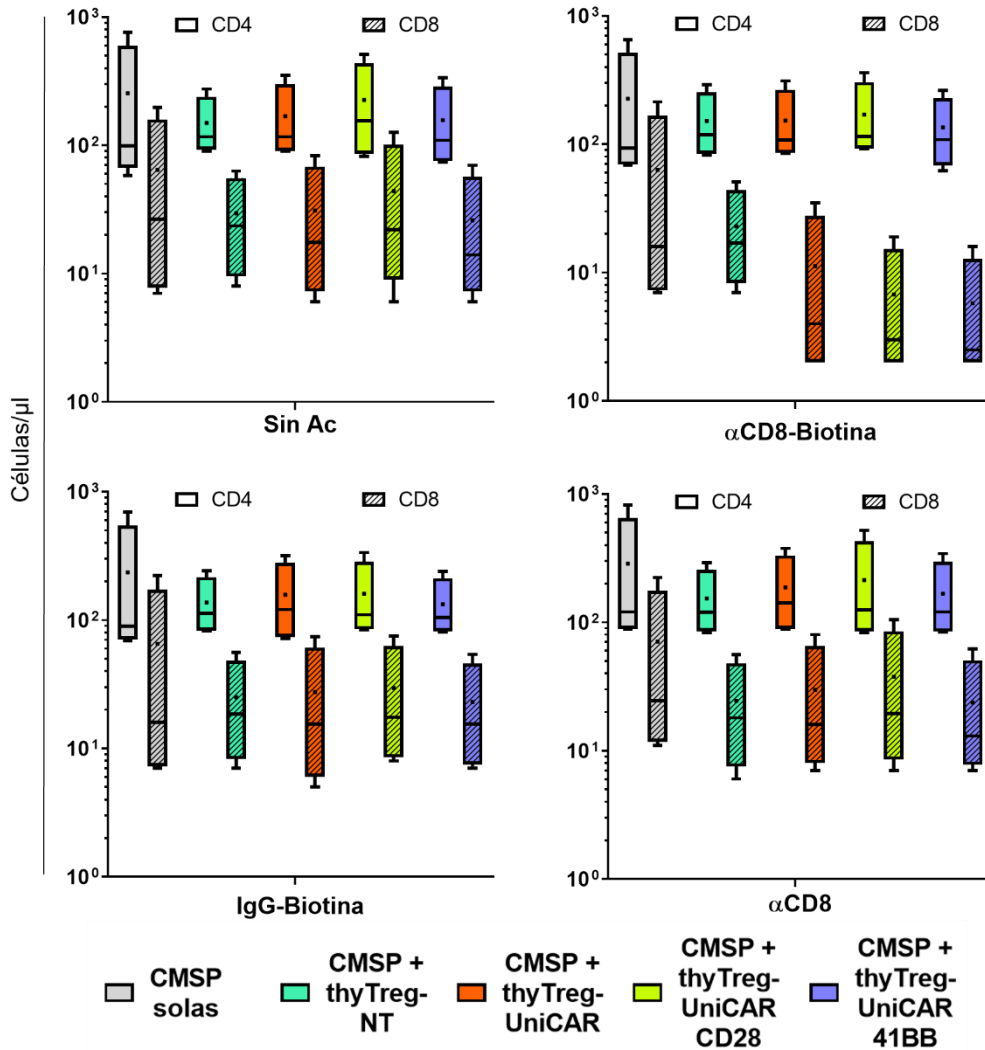
estimularon con *Dynabeads* durante esas 24h CMSP, marcadas previamente con CTVio. Tras estas 24 horas en ambos casos, se retiraron las partículas de activación y se co-cultivaron durante 72 h. Para este co-cultivo, se eligió un Ac biotinilado  $\alpha$ CD8 como intermediario funcional para desencadenar la acción del UniCAR. De esta forma, se pudo estudiar un posible efecto directo ejercido por las thyTreg-UniCAR sobre las células CD8 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, y un posible efecto indirecto sobre otras células no diana, como las CD4. Además, como controles se utilizaron su correspondiente Ac isotípico IgG-Biotina y el mismo  $\alpha$ CD8, pero sin biotina (Ver apartado V.7.2).

Primeramente, las thyTreg-NT alteran un poco la frecuencia de las subpoblaciones celulares CD4 y CD8 de las células CMSP-CTVio<sup>+</sup> al compararlas con lo observado en la condición control de CMSP-CTVio<sup>+</sup> solas. Sin embargo, es remarcable destacar que todos los tipos de thyTreg-UniCAR reducen en gran medida la frecuencia de la subpoblación de células CD8 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> en las condiciones de co-cultivo en las que se añadió el  $\alpha$ CD8-Biotina, si se comparan con los mismos co-cultivos sin presencia del Ac o con las subpoblaciones de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas o co-cultivadas con thyTreg-NT. Por el contrario, las frecuencias de la subpoblación CD4 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> apenas se ven alteradas entre unas condiciones y otras (Figura 42).



**Figura 42. Frecuencias de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) en las CMSP.** Diagramas de puntos que muestran el porcentaje de las subpoblaciones CD4 y CD8 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo tras 72h de cultivo en solitario o de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, en ausencia o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina. Estos diagramas de puntos suponen un ejemplo representativo de lo observado en todos los experimentos de cultivo en solitario o de co-cultivo CMSP + thyTreg a Ratio 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>), N=4.

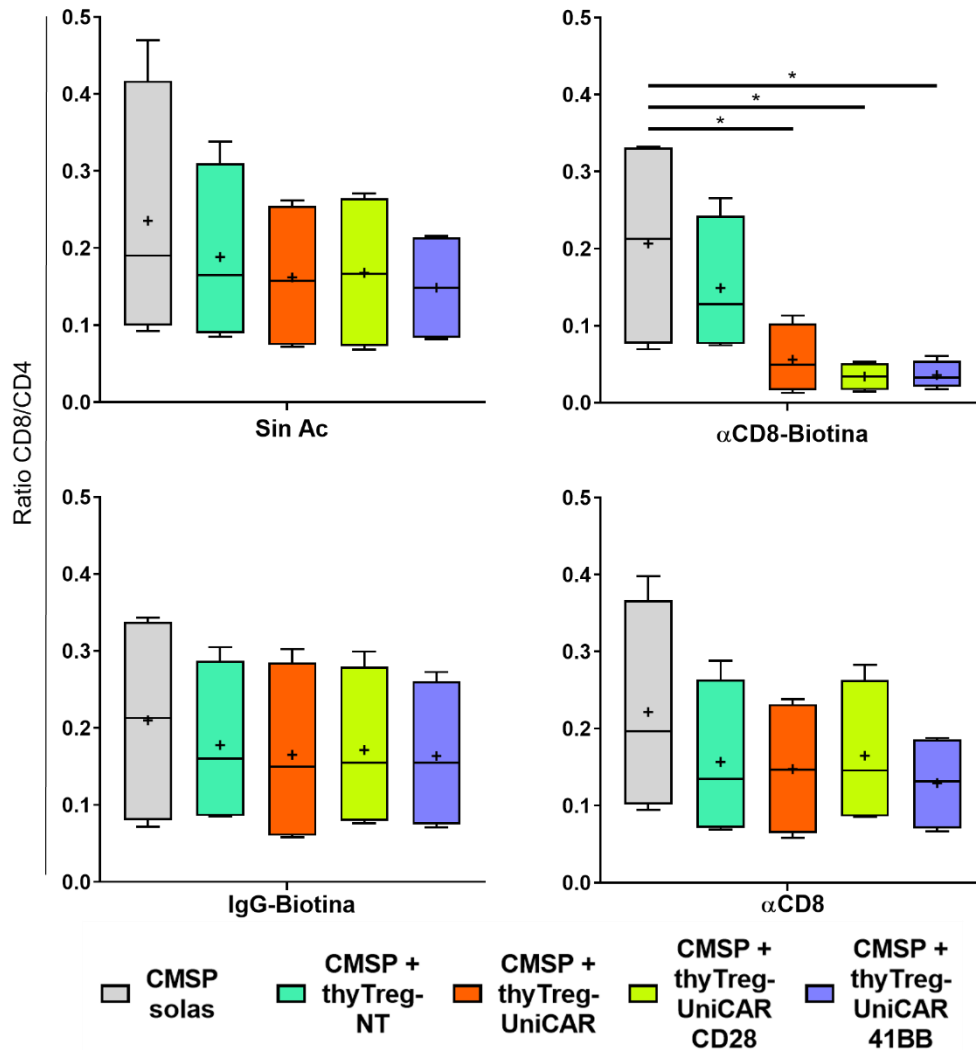
Analizando la concentración (células/ $\mu$ l) de las subpoblaciones dentro de las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, podemos ver que, si no se añade ningún Ac intermediario, no hay diferencias en las concentraciones de las células CD4 ni CD8 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> entre ninguna de las condiciones con respecto a las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas (Figura 43). Por el contrario, a pesar de no ser significativas las diferencias, se puede apreciar que, cuando se añade el Ac  $\alpha$ CD8-Biotina, la concentración de la subpoblación de células CD8 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> diana se ve muy reducida en los co-cultivos con todos los tipos de las thyTreg-UniCAR, mientras que en los cultivos de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> en solitario o en los co-cultivos con las thyTreg-NT no se observan diferencias (CD8 dentro de CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas con el Ac  $\alpha$ CD8-Biotina:  $63 \pm 50$  cel/ $\mu$ l; CD8 dentro de CMSP-CTVio<sup>+</sup> co-cultivadas con el Ac  $\alpha$ CD8-Biotina y con thyTreg-NT:  $23 \pm 10$  cel/ $\mu$ l; con thyTreg-UniCAR:  $11 \pm 8$  cel/ $\mu$ l; con thyTreg-UniCARCD28:  $7 \pm 4$  cel/ $\mu$ l y con thyTreg-UniCAR41BB:  $5 \pm 3$  cel/ $\mu$ l). En el caso de la subpoblación CD4 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> diana, esta subpoblación no se ve afectada en ninguna condición tras añadir el  $\alpha$ CD8-Biotina. En las condiciones control en las que está presente el Ac IgG-Biotina o el Ac  $\alpha$ CD8 sin biotina, tampoco se observan diferencias en la concentración en ninguna de las subpoblaciones celulares de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> (Figura 43).



**Figura 43. Concentración Células/μl de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) dentro de las CMSP.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo de la concentración de las subpoblaciones CD4 y CD8 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo tras 72h en cultivo solas o en co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (arriba-izquierda) o en presencia de Ac αCD8-Biotina (arriba-derecha), IgG-Biotina (abajo-izquierda) o αCD8 sin biotina (abajo-derecha). Ratio 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en el co-cultivo en todas las condiciones. N=4. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

De igual forma, calculando el ratio entre los porcentajes de las subpoblaciones CD8 y las CD4 procedentes de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, no se ve que haya diferencias significativas en las condiciones en ausencia de Ac, con el IgG-Biotina o con el αCD8 sin biotina, con respecto a la condición de CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas. Por el contrario, cuando las diferentes condiciones celulares

fueron co-cultivadas en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina, la reducción del ratio CD8/CD4 en las CMSP-CTVio<sup>+</sup> por parte de las thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28 y thyTreg-UniCAR41BB es estadísticamente significativo cuando se comparan con el ratio en las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas bajo la misma condiciones (Figura 44).



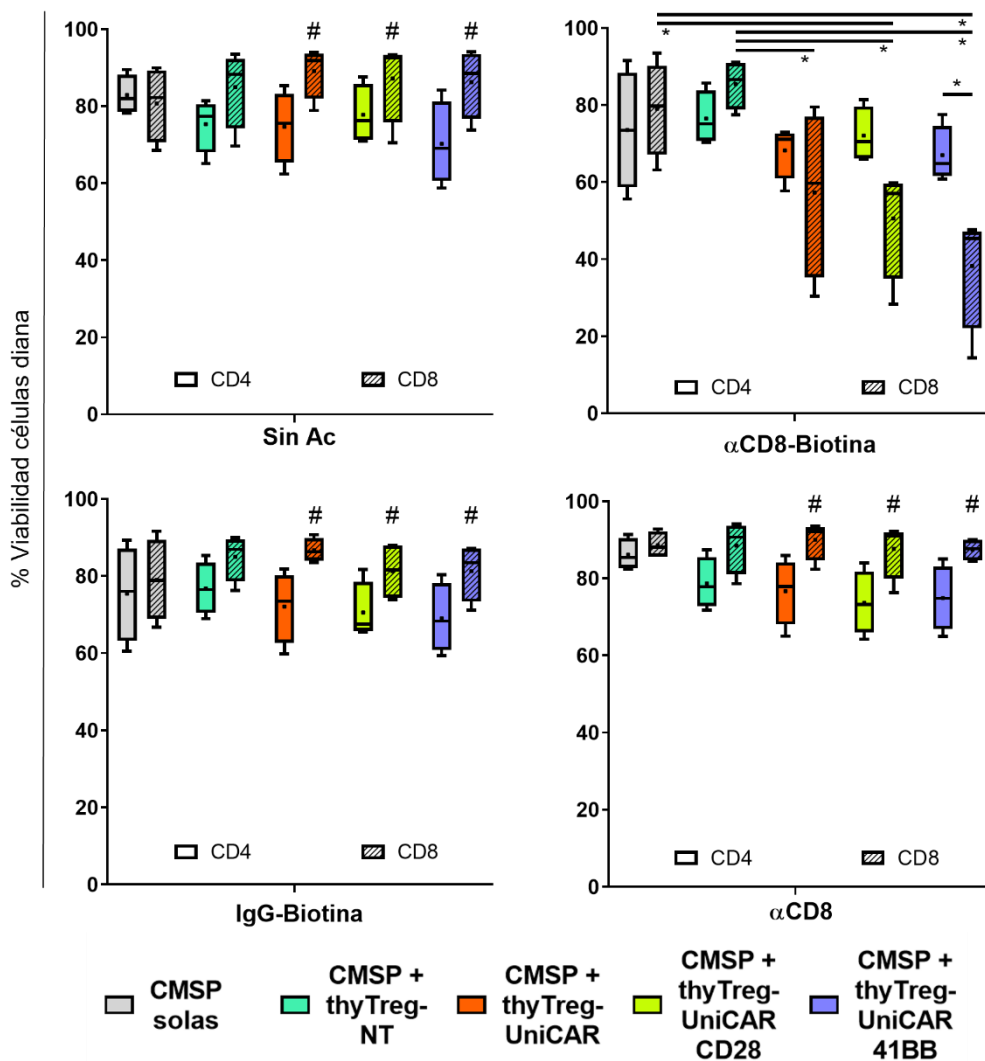
**Figura 44. Ratio entre los porcentajes de las subpoblaciones CD8/CD4 dentro de las CMSP.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo del ratio CD8/CD4 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo tras 72h de cultivo en solitario o en co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (arriba-izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (arriba-derecha), IgG-Biotina (abajo-izquierda) o  $\alpha$ CD8 sin biotina (abajo-derecha). Ratio en el co-cultivo 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$ , proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Es destacable el hecho de que las thyTreg modificadas genéticamente inducen una disminución de las células CD8 diana dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> de manera específica (únicamente con el Ac de interés biotinilado). Esta circunstancia no se observa en la población CD4 no diana dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, en los co-cultivos con las thyTreg-NT ni en los cultivos de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> en solitario. Esta disminución de la población de células CD8 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> podría estar relacionada (I) con un aumento de la muerte celular de estas células CD8 o (II) con una supresión de la proliferación de dichas células, mientras que, en ambos casos, las CD4 dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> no se verían tan afectadas.

#### **VI.5.5 Las thyTreg-UniCAR reducen específicamente la viabilidad de las células diana CD8 dentro de las CMSP, mientras que las CD4 no se ven afectadas.**

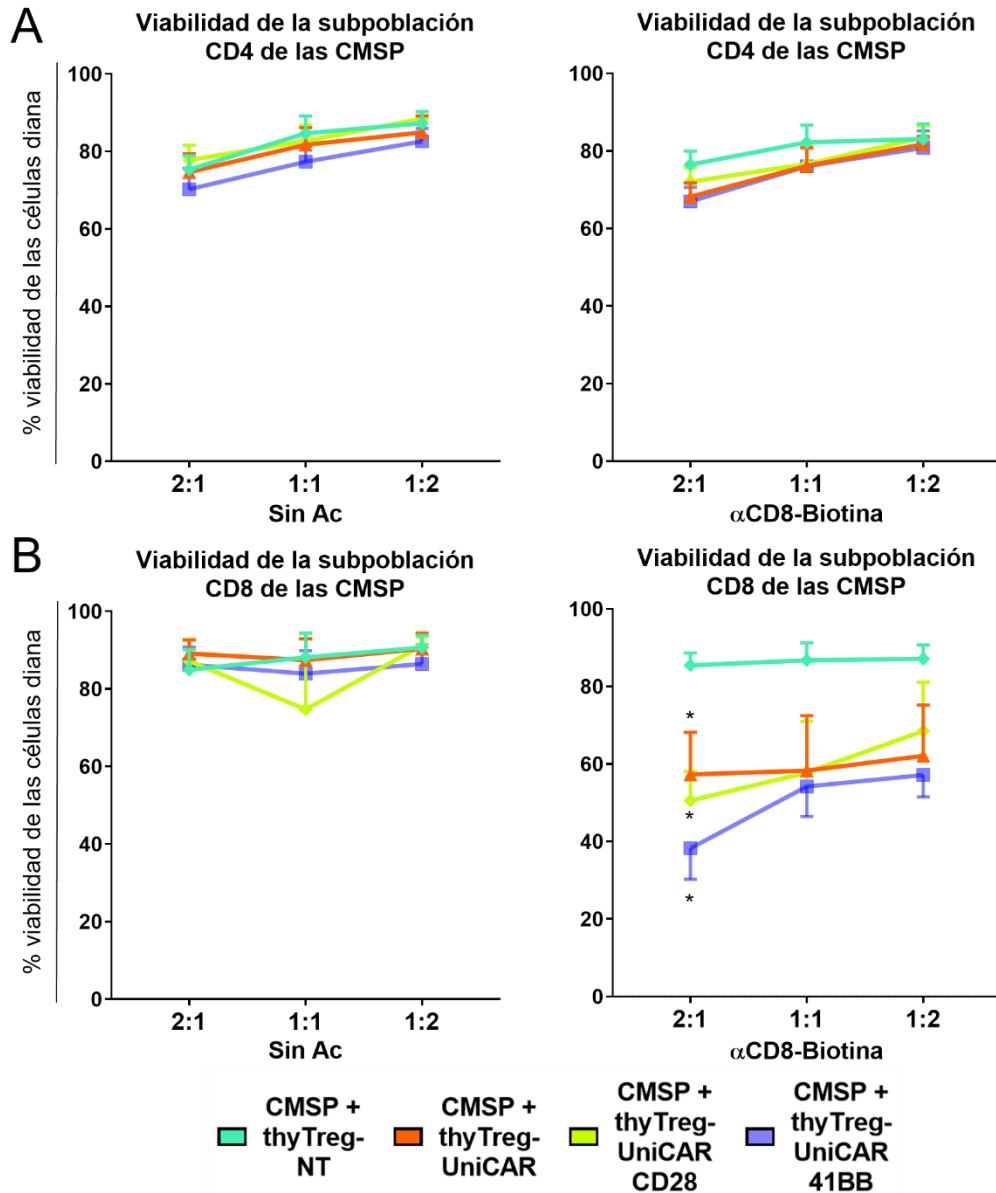
Tras estos sorprendentes resultados en los que la subpoblación de células CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> fue específica y altamente disminuida por todos los tipos de thyTreg-UniCAR, se estudió la posible causa. La primera hipótesis fue que las thyTreg modificadas genéticamente estaban ejerciendo una capacidad citolítica sobre las células CD8 diana dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, pero no así sobre las CD4 (no diana). Para resolver esta hipótesis, estudiamos la viabilidad de ambas fracciones CD4 y CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre la viabilidad de las células CD4 y CD8 dentro las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cuando fueron co-cultivadas con cualquier tipo de thyTreg-UniCAR, comparándolas con las subpoblaciones de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas o co-cultivadas con las thyTreg-NT, ya sea en ausencia de Ac intermediarios o en presencia del IgG-Biotina o del  $\alpha$ CD8 sin biotina (Figura 45). Sin embargo, cuando se co-cultivaron en presencia del  $\alpha$ CD8-Biotina, únicamente la viabilidad de las células diana CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> disminuye significativamente en todos los co-cultivos con cualquier tipo de thyTreg-UniCAR, siendo la disminución más notable la observada en las thyTreg-UniCAR41BB. Por el contrario, la viabilidad de la subpoblación de células no diana, las CD4 de las

CMSP-CTVio<sup>+</sup>, no se vio alterada, a pesar de que la de las CD8 fue ampliamente reducida.



**Figura 45. Viabilidad de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) dentro de las CMSP.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo de la viabilidad de las subpoblaciones CD4 y CD8 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo con 7AAD, tras 72h de cultivo en solitario o de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (arriba-izquierda) o en presencia de Ac αCD8-Biotina (arriba-derecha), IgG-Biotina (abajo-izquierda) o αCD8 sin biotina (abajo-derecha). Ratio en el co-cultivo 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando p<0,05 entre las condiciones indicadas. Diferencias estadísticamente significativas # si p<0,05 cuando se comparan las condiciones de co-cultivo indicadas con respecto a la condición en presencia del αCD8-Biotina. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

De igual modo, no se observa ningún tipo de diferencia significativa en la viabilidad de las células CD4 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cuando se co-cultivaron con las thyTreg-NT o con cualquier variedad de las thyTreg-UniCAR a diferentes ratios (2:1 - 1:1 - 1:2; thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>), ya fuera en ausencia o en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (Figura 46A). Tampoco se observan diferencias significativas en la viabilidad de las células CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cuando se co-cultivaron a diferentes ratios con cualquier variedad de thyTreg en ausencia de Ac intermediarios. Por el contrario, cuando se añade el  $\alpha$ CD8-Biotina, se puede apreciar una disminución progresiva de la viabilidad de las células CD8 diana de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> a medida que el ratio de co-cultivo (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) aumenta en los co-cultivos con las thyTreg-UniCARCD28 y con las thyTreg-UniCAR41BB. Estas diferencias en la viabilidad de las células CD8 entre los diferentes ratios de co-cultivo no se observan con las thyTreg-NT (Figura 46B).



**Figura 46. Viabilidad de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) dentro de las CMSP con diferentes ratios de co-cultivo.** (A) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de viabilidad de la subpoblación CD4 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo con 7AAD tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (derecha). Ratios en el co-cultivo 2:1, 1:1 y 1:2 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4. (B) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de viabilidad de la subpoblación CD8 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo con 7AAD tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (derecha). Ratios en el co-cultivo 2:1, 1:1 y 1:2 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  entre las condiciones indicadas con respecto a la condición de co-cultivo con las thyTreg-NT. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

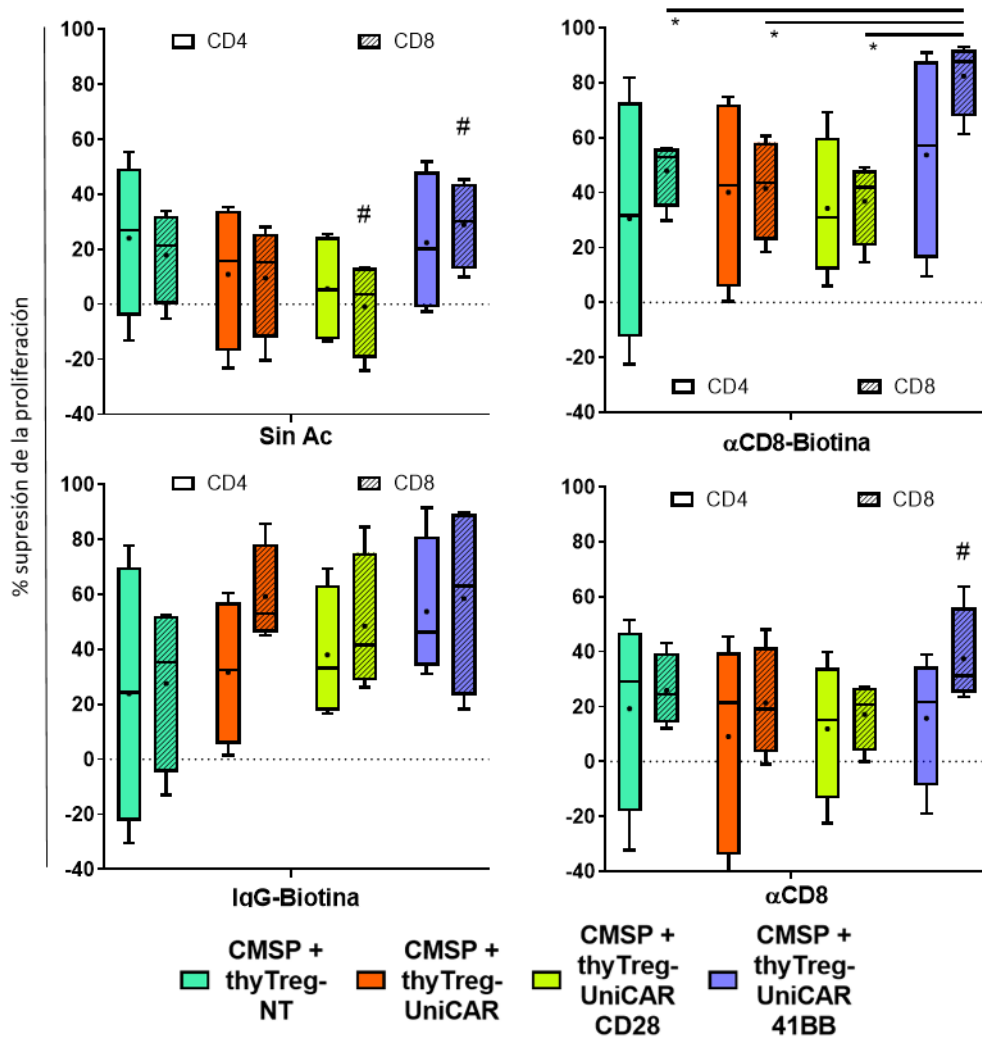
### **VI.5.6 Los dominios de co-estimulación influyen en la capacidad supresora de las thyTreg-UniCAR sobre las células diana.**

Una vez comprobado que las thyTreg modificadas genéticamente disminuyen específicamente la viabilidad de las células CD8 diana dentro de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, pero no la de las CD4, se continuó el estudio y se comprobó la segunda hipótesis. Esta hipótesis relaciona la disminución del número de CD8 y del ratio de las células CD8/CD4 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> con la capacidad de las thyTreg-UniCAR de suprimir la proliferación de estas células diana. Así, al suprimir su proliferación también se reduciría su frecuencia y su concentración durante el co-cultivo con respecto a las CD4 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, que continuarían proliferando. Por lo tanto, para comprobar esta hipótesis, se estudió la capacidad de supresión de la proliferación de los diferentes tipos de thyTreg tras 72 horas de co-cultivo con las CMSP-CTVio<sup>+</sup>.

Los resultados indican que el UniCARCD28 y el UniCAR de 3<sup>a</sup> generación afectan negativamente a la capacidad basal de supresión de la proliferación ejercida por las thyTreg en comparación con las thyTreg-NT en ausencia de Ac intermediarios (Figura 47). Estas diferencias, a pesar de no ser significativas, sobre todo se ven más acusadas en las thyTreg-UniCARCD28. Por el contrario, el UniCAR41BB no solo no disminuye, si no que mantiene la función supresora basal sobre la población de células CD4 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> e, incluso, la incrementa ligeramente sobre la población CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> en el co-cultivo en ausencia de Ac, aunque estos resultados no sean significativos.

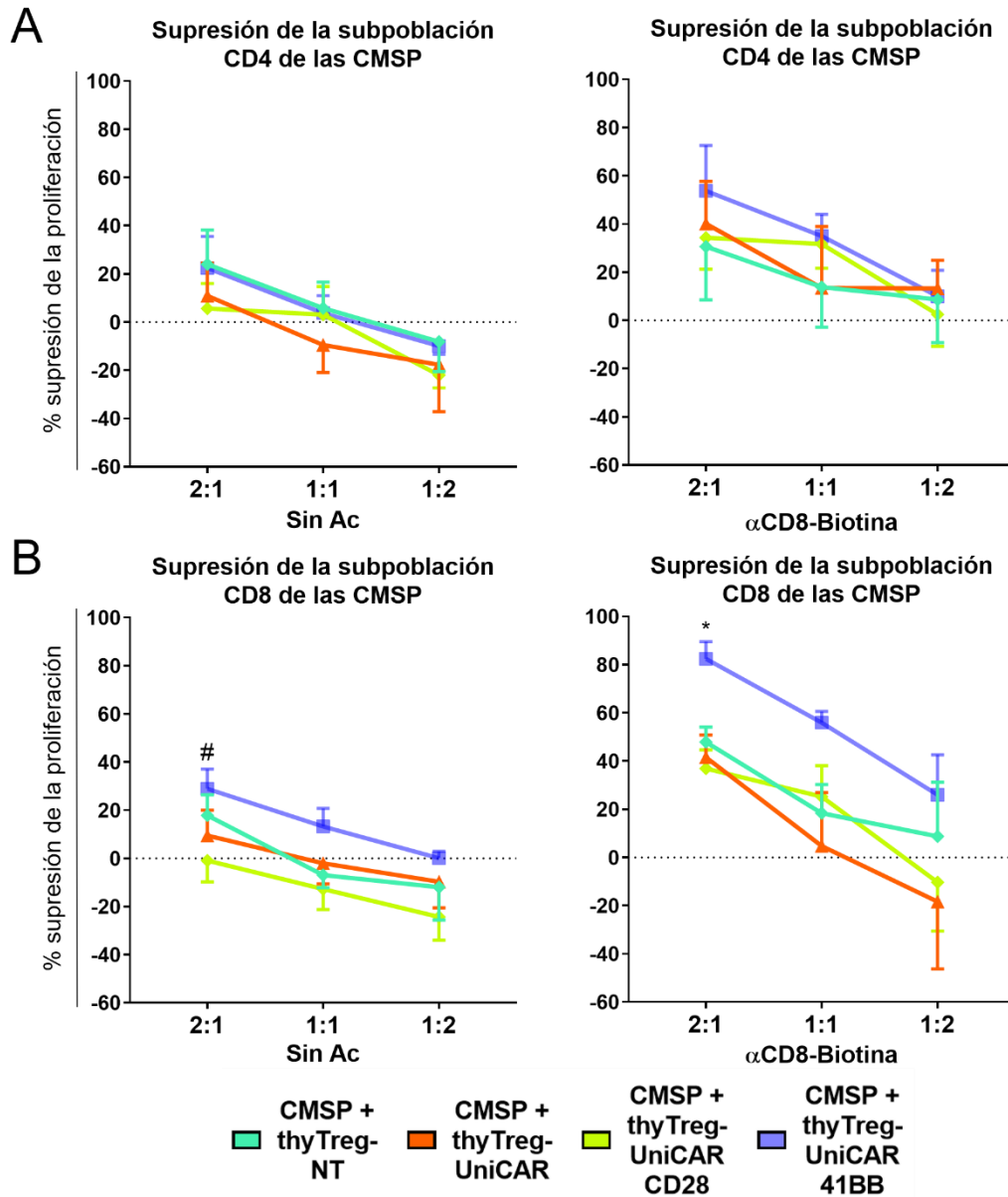
Cuando se co-cultivaron las células en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina, todas las fracciones de las thyTreg mostraron un ligero aumento de la capacidad de supresión de la proliferación tanto de las CD4 como de las CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> (Figura 47). Sin embargo, las thyTreg-UniCAR41BB no solo mostraron una capacidad supresora de la proliferación de las células CD8 (diana) significativamente mayor a la observada en ausencia de Ac o en presencia del  $\alpha$ CD8 sin biotina, sino que, además, esta también era significativamente superior a la desarrollada por el resto de variedades de thyTreg en presencia de  $\alpha$ CD8-Biotina. Además, esta condición también es la que mostró más

capacidad de supresión de las células CD4 (no diana) de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>. En el caso de todos los co-cultivos en presencia del IgG-Biotina, se observa unas capacidades de supresión que, a pesar de ser superiores a las observadas en las condiciones en ausencia de Ac o con el  $\alpha$ CD8 sin biotina, esta no alcanza a la desarrollada por las thyTreg-UniCAR41BB en presencia del  $\alpha$ CD8-Biotina sobre la proliferación de las CD4 ni de las CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> (Figura 47).



**Figura 47. Supresión de la proliferación de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) dentro de las CMSP.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo de la supresión de la proliferación de las subpoblaciones CD8 y CD4 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup> diana, visualizados por citometría de flujo, mediante la pérdida gradual del marcador CTVio con el que fueron teñidas las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (arriba-izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (arriba-derecha), IgG-Biotina (abajo-izquierda) o  $\alpha$ CD8 sin biotina (abajo-derecha). Ratio en el co-cultivo 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  entre las condiciones indicadas. Diferencias estadísticamente significativas # si  $p < 0,05$  cuando se comparan las condiciones de co-cultivo indicadas con respecto a la condición en presencia del  $\alpha$ CD8-Biotina. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Así mismo, a medida que se aumenta el ratio de co-cultivo de las thyTreg con respecto a las CMSP (2:1-1:1-1:2; thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>), se puede observar un incremento equivalente de la capacidad supresora de todas las thyTreg. Este efecto ratio dependiente es remarcable en las células thyTreg-UniCAR41BB cuando están en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina, pues es la condición que muestra la mayor capacidad supresora de la proliferación de las células CD8 (diana) de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> y de las células CD4 (no diana) de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> (Figura 48A y B, respectivamente).

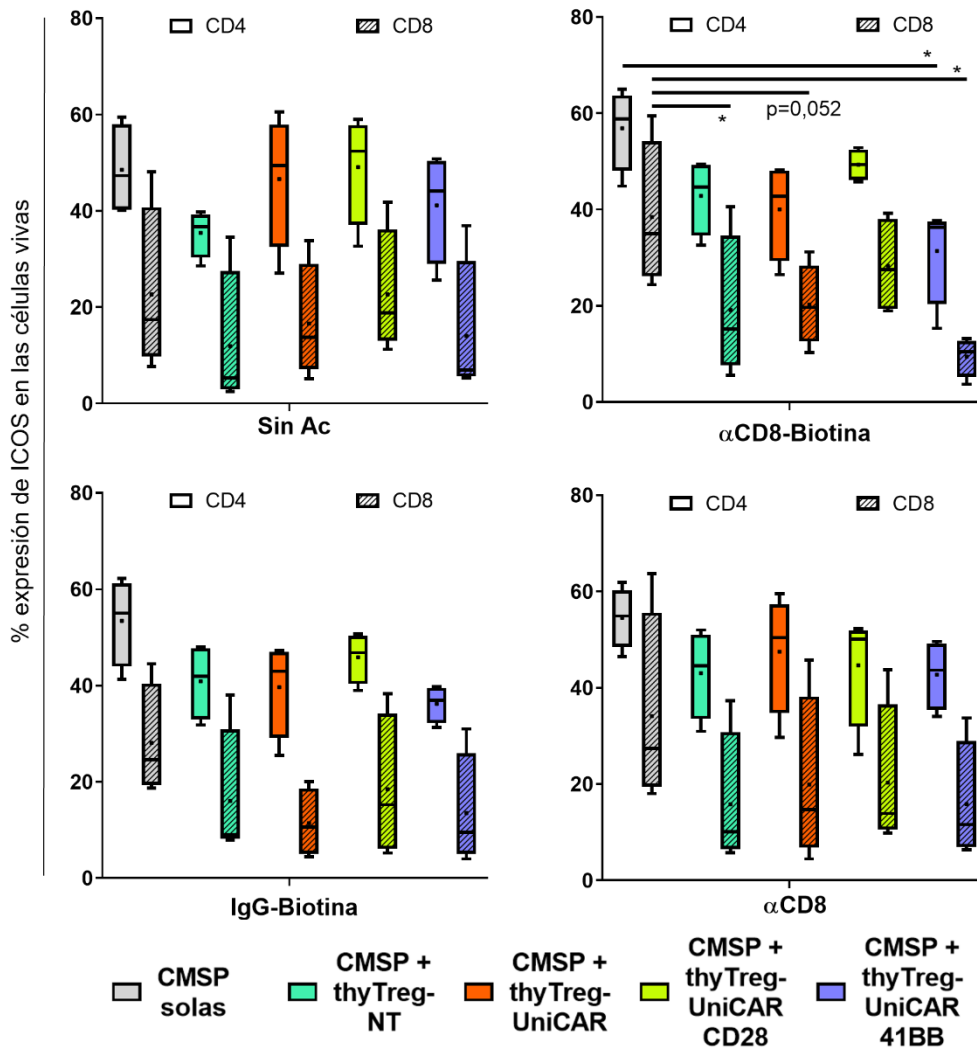


**Figura 48. Supresión de la proliferación de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) dentro de las CMSP a diferentes ratios de co-cultivo.** (A) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de supresión de la proliferación de la subpoblación CD4 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados mediante la pérdida gradual del marcador CTVio, tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (derecha). Ratio en los co-cultivos de 2:1, 1:1 o 1:2 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4 en ratio 2:1 y N=3 en ratio 1:1 y 1:2. (B) Diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM del porcentaje de supresión de la proliferación de la subpoblación CD8 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (derecha). Ratio en los co-cultivos de 2:1, 1:1 o 1:2 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4 en ratio 2:1 y N=3 en ratio 1:1 y 1:2. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  entre la condición de co-cultivo con las thyTreg-UniCAR41BB con respecto al resto de condiciones en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina. Diferencias estadísticamente significativas # si  $p < 0,05$  cuando se comparan la condición de co-cultivo con las thyTreg-UniCAR41BB en ausencia de Ac con respecto a la misma condición en presencia del  $\alpha$ CD8-Biotina. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Para verificar el efecto supresor ejercido por las thyTreg-UniCAR41BB sobre las subpoblaciones CD4 y CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup>, no solo estudiamos la inhibición de la capacidad proliferativa de estas, sino también su expresión de marcadores de activación celulares. Concretamente, estudiamos el marcador de activación ICOS, esencial para la correcta activación y función de las células T (202).

Como se puede observar, no hay diferencias significativas en la expresión de este marcador en las células CD4 ni CD8 entre las condiciones de CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas. Cuando se co-cultivan con las thyTreg-NT, se puede ver una ligera disminución no significativa del porcentaje de expresión de ICOS en las CD4 y CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> tanto en ausencia como en presencia de cualquier tipo de Ac, con respecto a las CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas (Figura 49). Este fenómeno se puede deber al efecto supresor natural de las células thyTreg. Esta disminución también se observa en ambas subpoblaciones de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> co-cultivadas con las thyTreg-UniCAR y thyTreg-UniCARCD28 solo cuando están en presencia de algún Ac. Sin embargo, las thyTreg-UniCAR41BB, en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina, reducen significativamente la expresión de este marcador tanto en las CD4 como en las CD8 de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> con respecto a las CMSP-CTVio<sup>+</sup>

cultivadas solas, y alcanzando unos niveles muy inferiores a los de las otras thyTreg. Por el contrario, este incremento del efecto supresor sobre la expresión de ICOS ejercido por las thyTreg-UniCAR41BB no se aprecia en ausencia de Ac o en presencia de los Ac control IgG-Biotina ni  $\alpha$ CD8 sin biotina (Figura 49).



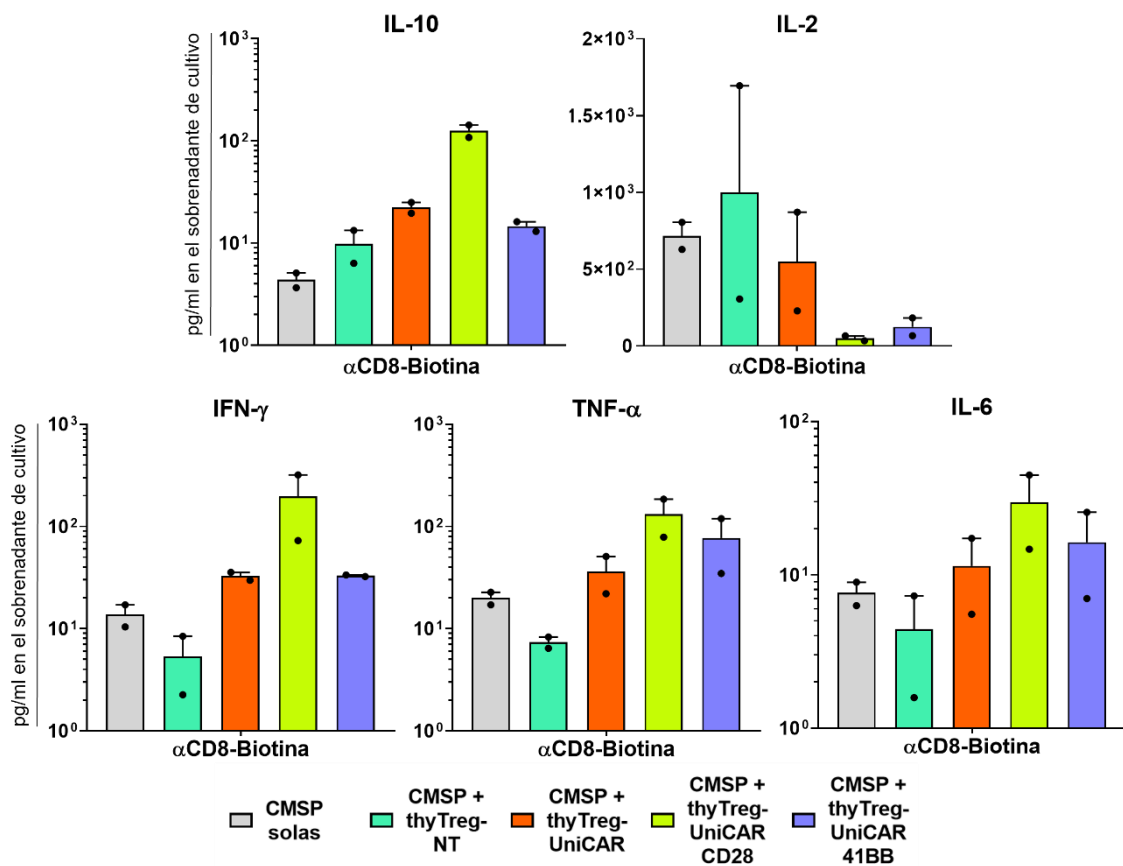
**Figura 49. Supresión de la expresión de ICOS de las subpoblaciones CD8 (diana) y CD4 (no diana) dentro de las CMSP.** Diagramas de cajas y bigotes que representan la media (+), la mediana (línea negra horizontal) y las barras de error del valor mínimo al máximo de la supresión de la expresión del marcador de activación ICOS de la subpoblación CD4 en las células CMSP-CTVio<sup>+</sup>, visualizados mediante la citometría de flujo, tras 72h de cultivo en solitario de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> o en co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg; en ausencia de Ac (arriba-izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (arriba-derecha), IgG-Biotina (abajo-izquierda) o  $\alpha$ CD8 sin biotina (abajo-derecha). Ratio en el co-cultivo 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=4. Diferencias estadísticamente significativas \* cuando  $p < 0,05$  entre las condiciones indicadas. Estadística proporcionada por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Por último, medimos las principales citoquinas pro y anti-inflamatorias presentes en los sobrenadantes de los co-cultivos anteriores. Como citoquinas anti-inflamatorias medimos la IL-10. Como pro-inflamatorias analizamos el IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. También evaluamos la citoquina IL-2 presente en los sobrenadantes.

En el caso de la IL-10, los resultados muestran una mayor, pero no significativamente, presencia de la IL-10 en el sobrenadante de los co-cultivos en presencia del  $\alpha$ CD8-Biotina entre las CMSP-CTVio<sup>+</sup> y las thyTreg-NT, comparándolas con el cultivo de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> solas (Figura 50). A su vez, en los co-cultivos con thyTreg-UniCAR y thyTreg-UniCAR41BB, se aprecia una mayor concentración de la IL-10. Sin embargo, es la condición thyTreg-UniCARCD28 la que muestra una mayor concentración de esta citoquina en el sobrenadante del co-cultivo.

Por otro lado, estudiando la IL-2, a pesar de que se observa una heterogeneidad muy grande entre los experimentos, no hay diferencias entre el cultivo de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> en solitario con respecto al co-cultivo de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> con las thyTreg-NT y las thyTreg-UniCAR. Sin embargo, la IL-2 presente en el sobrenadante de las condiciones con las thyTreg-UniCARCD28 y thyTreg-UniCAR41BB es muy inferior con respecto a la observada en la condición de CMSP-CTVio<sup>+</sup> cultivadas solas y a la de CMSP-CTVio<sup>+</sup> + thyTreg-NT (Figura 50). En el caso de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 presentes en los sobrenadantes de los co-cultivos, se aprecia un comportamiento muy similar entre las diferentes

condiciones en las tres citoquinas. En primer lugar, en el sobrenadante de las thyTreg-NT hay menos cantidad de estas citoquinas pro-inflamatorias que en el del cultivo de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> en solitario, seguramente debido a su capacidad supresora natural. En los sobrenadantes de los co-cultivos de las CMSP-CTVio<sup>+</sup> con las thyTreg-UniCAR y con las thyTreg-UniCAR41BB hay una concentración de estas citoquinas muy parecida, siendo esta superior a la medida en las condiciones de co-cultivo con las thyTreg-NT, pero a la vez inferior a la de las thyTreg-UniCARCD28. Estas últimas son las células que muestran una mayor concentración de todas estas citoquinas pro-inflamatorias (Figura 50).



**Figura 50. Concentración de citoquinas anti y pro-inflamatorias en el sobrenadante de los cultivos y co-cultivos de las CMSP con los diferentes tipos de las thyTreg.** Histogramas que representa la media  $\pm$  SEM de la concentración (pg/ml) en el sobrenadante de los cultivos y co-cultivos entre las CMSP-CTVio<sup>+</sup> y los diferentes tipos de las thyTreg en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina. Las citoquinas analizadas han sido la IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Ratio en el co-cultivo 2:1 (thyTreg : CMSP-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=2.

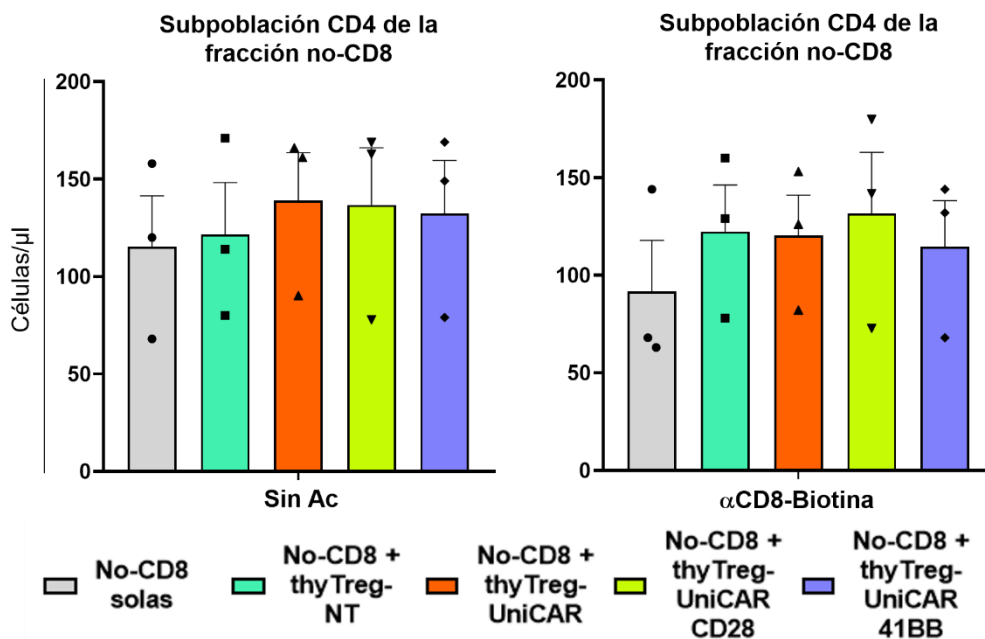
En resumen, se ha observado cómo, en los co-cultivos con las CMSP, las thyTreg modificadas genéticamente tienen un efecto directo sobre la fracción de las células diana CD8, reduciendo su cantidad y su viabilidad. Sin embargo, son las thyTreg-UniCAR41BB las únicas que, además de alterar la cantidad y viabilidad de las células diana CD8, también inhiben su capacidad proliferativa y estado de activación. Además, este efecto supresor es específico, ya que sólo se da cuando el Ac intermediario correcto está presente. De manera muy interesante, las thyTreg-UniCAR41BB también afectan a la subpoblación de células CD4<sup>+</sup> dentro de la fracción de células no diana de las CMSP. Este fenómeno, a diferencia que el efecto directo observado sobre las CD8, solo se caracteriza por reducir la capacidad proliferativa y el estado de activación de esas células CD4.

#### **VI.5.7 Co-cultivos de las thyTreg-UniCAR con las subpoblaciones de las CMSP por separado: Estudio del efecto directo e indirecto**

Para estudiar el efecto directo e indirecto desarrollado por las thyTreg-UniCAR sobre las células diana y no diana de las CMPS, observados en los apartados VI.5.4, VI.5.5 y VI.5.6 anteriores, decidimos aislar la población CD8 de las CMSP, para, por un lado, establecer co-cultivos con la fracción CD8 enriquecida (células dianas) y, por otro lado, con la fracción conjunta no-CD8 sobrante tras el enriquecimiento (células no diana). Al igual que en el apartado anterior, se estimularon todos los tipos celulares durante 24h por separado (la fracción aislada de células CD8<sup>+</sup>, la fracción de células no-CD8, las thyTreg-NT y las células modificadas genéticamente). Transcurridas estas 24h, y tras quitar la activación, se co-cultivaron los diferentes tipos de thyTreg con las fracciones CD8<sup>+</sup> o no-CD8 durante 72 horas (Ver apartado V.7.3).

Se estudió la concentración (células/ $\mu$ l) de las células CD4 de la fracción no-CD8 en el cultivo en solitario y en los co-cultivos con los diferentes tipos de thyTreg. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre las células cultivadas solas o co-cultivadas con las thyTreg en ausencia de Ac intermediarios. De igual modo, tampoco se observan diferencias en la

concentración de las células CD4 de la fracción celular no-CD8 en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (Figura 51).

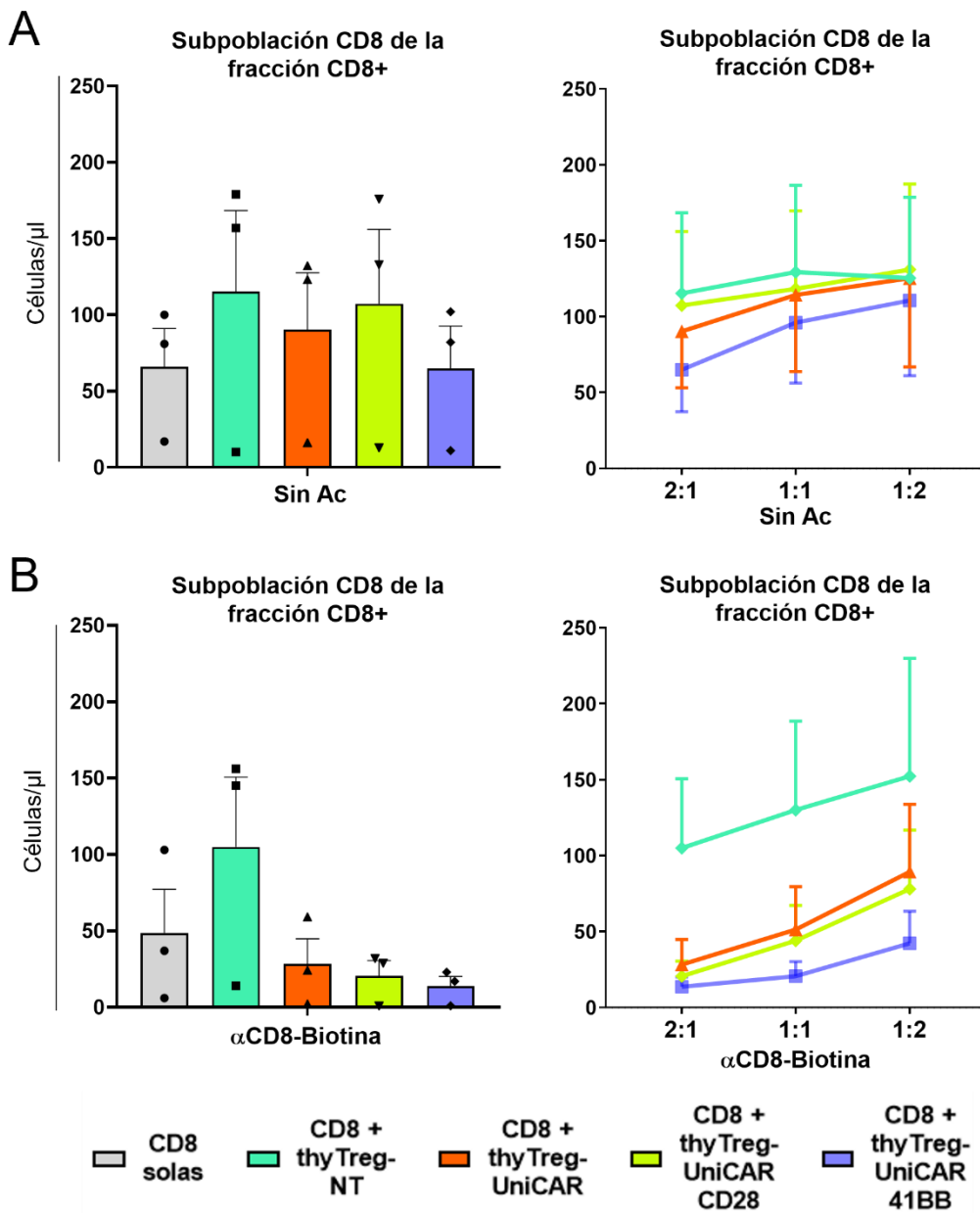


**Figura 51. Concentración células/μl de la subpoblación de células CD4 (no diana) dentro de la fracción de no-CD8.** Histogramas que representa la media  $\pm$  SEM de la concentración de la subpoblación T CD4<sup>+</sup> en la fracción de células no-CD8, visualizados por citometría de flujo tras 72h de cultivo en solitario o de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (derecha). Ratio 2:1 (thyTreg : no-CD8) en el co-cultivo en todas las condiciones. N=3. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

En el caso de la fracción aislada CD8<sup>+</sup>, podemos observar que en los co-cultivos de estas células con cualquier thyTreg en ausencia de Ac, no hay diferencias significativas en la concentración de las células diana entre las diferentes condiciones con respecto a las células CD8<sup>+</sup> cultivadas en solitario (Figura 52A). Tampoco se observan diferencias entre las condiciones cuando se co-cultivan las thyTreg-UniCAR a diferentes ratios con las células CD8<sup>+</sup> (Figura 52A).

Sin embargo, cuando a estos cultivos o co-cultivos celulares se les añade el Ac  $\alpha$ CD8-Biotina, se aprecia una drástica disminución de la concentración de células CD8<sup>+</sup> en los co-cultivos con todos los tipos de thyTreg-UniCAR, alcanzando la mínima concentración observada en los co-cultivos con las thyTreg-UniCAR41BB (Figura 52B). Por el contrario, la concentración de

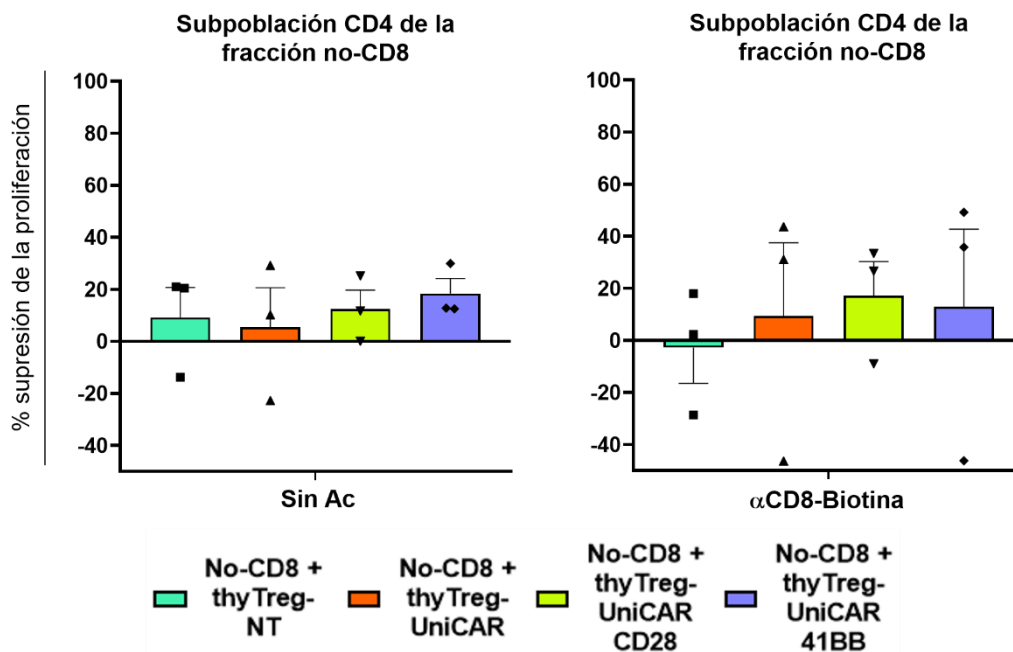
células CD8<sup>+</sup> cultivadas en solitario, o en las co-cultivadas con las thyTreg-NT, no se ve afectada por la presencia de este Ac intermediario. Además, a medida que se aumentan los ratios de los co-cultivos (thyTreg-UniCAR : CD8<sup>+</sup>), se hace más remarcable el hecho de que las thyTreg-UniCAR41BB son las más eficaces reduciendo la concentración de las células CD8 a cualquier ratio estudiado, comparándola con thyTreg-UniCARCD28 o thyTreg-UniCAR (Figura 52B). En esta sección, demostramos que el efecto sobre las células T CD8<sup>+</sup> es específico del CAR.



**Figura 52. Concentración células/ $\mu$ l de la subpoblación de células CD8 (diana) dentro de la fracción de CD8<sup>+</sup>.** (A) Histogramas y diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM de la concentración de la subpoblación CD8 en la fracción de enriquecimiento de células CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, en ausencia de Ac. Histogramas a ratio 2:1 y diagramas de líneas a ratios 2:1, 1:1 y 1:2 (thyTreg : CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>) en los co-cultivos de todas las condiciones. N=3. (B) Histogramas y diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM de la concentración de la subpoblación CD8 en la fracción de enriquecimiento de células CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>, visualizados por citometría de flujo tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina. Histogramas a ratio 2:1 y diagramas de líneas a ratios 2:1, 1:1 y 1:2 (thyTreg : CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>) en los co-cultivos de todas las condiciones. N=3. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

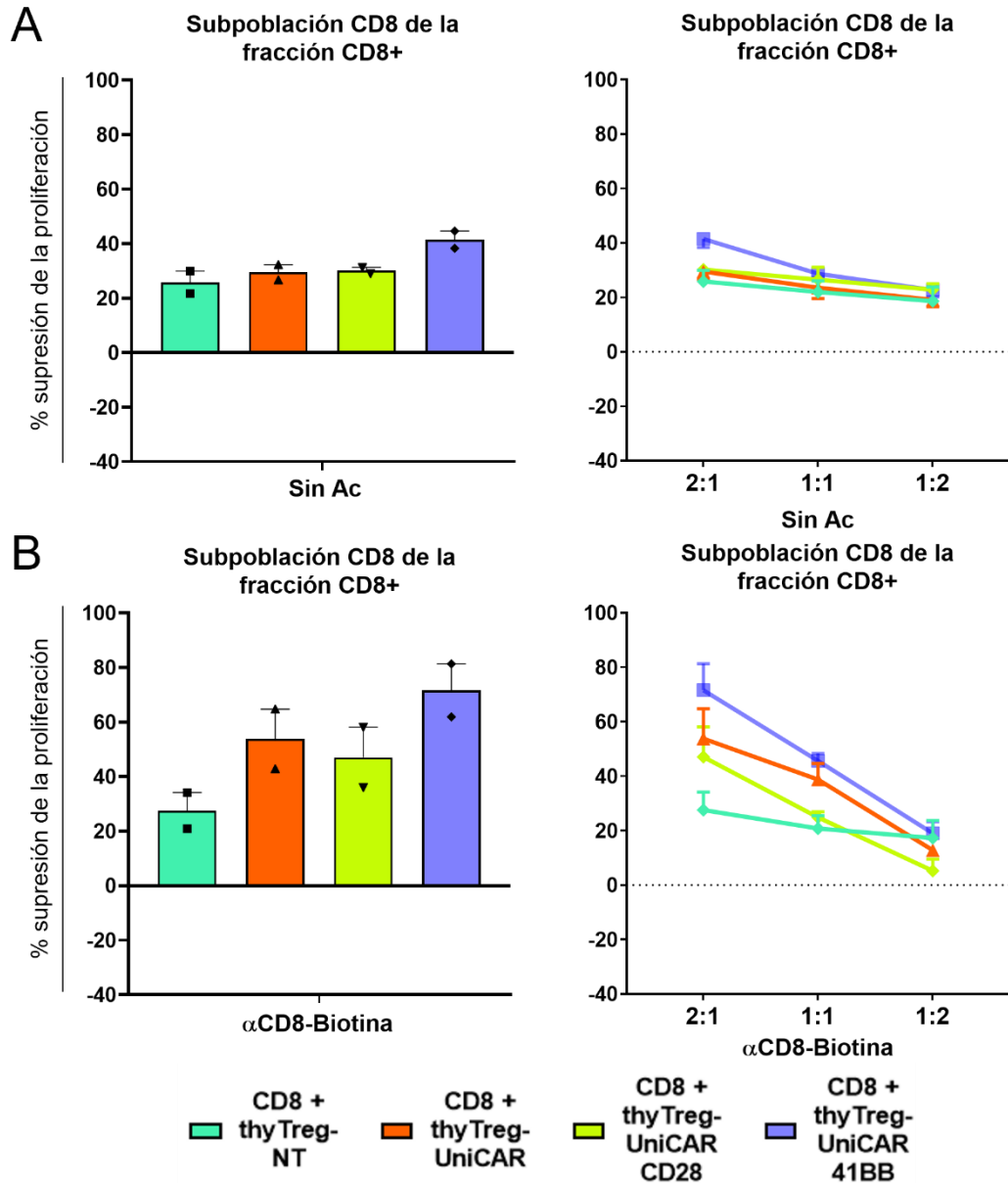
Junto a la disminución de la concentración de las células CD8<sup>+</sup>, se analizó la capacidad supresora de los diferentes tipos de thyTreg sobre la proliferación de las células CD4 de la fracción no-CD8 por un lado y, por otro, la ejercida sobre la proliferación de las CD8<sup>+</sup>.

En el caso de las células CD4 de la fracción no-CD8-CTVio<sup>+</sup>, no se ven diferencias significativas en la capacidad supresora ejercida por las diferentes thyTreg sobre la proliferación de estas células cuando están co-cultivadas en ausencia de Ac intermediarios o en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (Figura 53).



**Figura 53. Supresión de la proliferación de la subpoblación CD4 (no diana) dentro de la fracción no-CD8.** Histogramas que representan la media  $\pm$  SEM de la supresión de la proliferación de la subpoblación CD4 en la fracción de células no-CD8-CTVio<sup>+</sup>, visualizados mediante la pérdida gradual del marcador CTVio con el que fueron teñidas las no-CD8, tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac (izquierda) o en presencia de Ac  $\alpha$ CD8-Biotina (derecha). Ratio en el co-cultivo 2:1 (thyTreg : no-CD8-CTVio<sup>+</sup>) en todas las condiciones. N=3. Diferencias no significativas proporcionado por el test de comparaciones múltiples ANOVA de dos factores.

Cuando se co-cultivaron la fracción enriquecida CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> con los diferentes tipos de thyTreg en ausencia de Ac intermediarios, no se ve una diferencia clara en la capacidad de supresión de la proliferación de las células CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> entre las condiciones con thyTreg-NT o con thyTreg modificadas genéticamente. Además, en ausencia de Ac intermediario, tampoco hay diferencias en la capacidad supresora entre los diferentes ratios de co-cultivo (thyTreg : CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>) (Figura 54A). Contrariamente, cuando estas mismas condiciones se cultivaron en presencia del  $\alpha$ CD8-Biotina, la capacidad de supresión de la proliferación de las CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> ejercida por las thyTreg-UniCAR (53,78  $\pm$  10,97; Media  $\pm$  SEM) y por las thyTreg-UniCARCD28 (47,09  $\pm$  11,01; Media  $\pm$  SEM) aumentan a casi el doble con respecto a la ejercida por las thyTreg-NT (27,55  $\pm$  6,63; Media  $\pm$  SEM) y con respecto a sus mismas condiciones en ausencia de Ac. Sin embargo, este aumento es más remarcado en el caso de las thyTreg-UniCAR41BB, alcanzando el valor más alto de supresión (71,60  $\pm$  9,7; Media  $\pm$  SEM). Además, esta supresión es ratio-dependiente, pues a media que se ven disminuidos los ratios thyTreg : CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup> en los co-cultivos y, por lo tanto, la presencia de las diferentes células thyTreg, la capacidad de supresión disminuye escalonadamente (Figura 54B).



**Figura 54. Supresión de la proliferación de la subpoblación CD8 (diana) dentro de la fracción CD8<sup>+</sup>.** (A) Histogramas y diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM de la supresión de la proliferación de la subpoblación CD8 en la fracción CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>, visualizados mediante la pérdida gradual del marcador CTVio con el que fueron teñidas las células CD8<sup>+</sup>, tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg, y en ausencia de Ac. Histogramas a ratio 2:1 (izquierda) y diagramas de líneas a ratios 2:1, 1:1 y 1:2 (thyTreg : CD8-CTVio<sup>+</sup>) (derecha) en los co-cultivos de todas las condiciones. N=2. (B) Histogramas y diagramas de líneas que representan la media  $\pm$  SEM de la supresión de la proliferación de la subpoblación CD8 en la fracción CD8<sup>+</sup>-CTVio<sup>+</sup>, tras 72h de co-cultivo con los diferentes tipos de thyTreg en presencia del Ac  $\alpha$ CD8-Biotina. Histogramas a ratio 2:1 (izquierda) y diagramas de líneas a ratios 2:1, 1:1 y 1:2 (thyTreg : CD8-CTVio<sup>+</sup>) (derecha) en los co-cultivos de todas las condiciones. N=2.

Por lo tanto, al igual que en los co-cultivos con las CMSP sin aislar, todos los tipos del thyTreg-UniCAR, siendo especialmente remarcable las células thyTreg-UniCAR41BB, presentan una gran capacidad de supresión de proliferación de las células CD8 aisladas, comparándolas con las thyTreg-NT. Por lo tanto, se confirma que las thyTreg-UniCAR, y en especial las thyTreg-UniCAR41BB, tienen un múltiple efecto directo sobre las células diana, también observado en los co-cultivos con las CMSP sin aislar.

Por el contrario, a diferencia de lo observado en las células no diana de las CMSP sin aislar, ningún tipo de thyTreg-UniCAR disminuye la concentración celular o la capacidad de proliferación de las células CD4 de la fracción no-CD8 durante los co-cultivos. El efecto indirecto observado sobre las células no diana de las CMSP sin aislar (Ver apartados VI.5.4, VI.5.5 y VI.5.6), solo ocurre cuando las células diana están presentes en el medio. Por lo tanto, las thyTreg, tras una cascada de reconocimiento específico y activación celular mediada por los UniCAR, reducen la cantidad, la viabilidad, la proliferación y el estado de activación de las células diana; y la proliferación y el estado de activación de las células no diana, destacando especialmente las thyTreg-UniCAR41BB.



## VII. Discusión



## VII.1 Exploración del uso de timocitos como fuente alternativa de obtención de thyTreg

En este estudio hemos demostrado que la combinación de la estimulación del TCR/CD28, altas concentraciones de IL-2 y el tratamiento con TGF- $\beta$ 1, así como la inducción de la expresión de un FOXP3 ectópico, han sido capaces de inducir una sobre-expresión del FOXP3 en los timocitos. Sin embargo, estas estrategias, mediante las cuales ya se logró inducir iTreg con capacidad supresora desde células T de periferia (203, 204), fueron insuficientes para conferir un fenotipo estable y una funcionalidad similar a las thyTreg en las células CD25<sup>neg</sup> de origen tímico.

### [Papel del microambiente, de la regulación genética y epigenética en la generación de Treg funcionales](#)

Algunos autores han remarcado el papel microambiente de citoquinas, como el eje de la IL-2/IL-2R (receptor de la IL-2) y otras citoquinas esenciales para el mantenimiento de la integridad, funcionalidad y estabilidad de las células Treg, como el TGF- $\beta$  o la IL-15 (205-207). Se ha descrito que los progenitores tímicos de las thyTreg, las subpoblaciones CD25<sup>neg</sup>FOXP3<sup>bajo</sup> y CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>neg</sup>, se pueden diferenciar en tTreg CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en presencia de altas concentraciones de IL-2 (51) y que las Tconv de periferia, bajo las mismas circunstancias, pueden dar lugar a células iTreg funcionales (68, 69, 71). Sin embargo, simulando esas condiciones, a pesar de que en los timocitos CD25<sup>neg</sup> se indujo una elevada expresión del FOXP3, ésta no fue estable ni, consecuentemente, su capacidad supresora *in vitro*.

Nuestros resultados muestran no solo una pérdida progresiva del FOXP3, sino que también una reducción inexorable del CTLA-4 en las CD25<sup>neg</sup> en cualquiera de las condiciones probadas. Esta reducción de ambas proteínas también estuvo correlacionada con una menor capacidad supresora y con un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, concordando con los estudios previos en los que la inestabilidad en la expresión de los principales marcadores de Treg pueden estar relacionados con la inestabilidad funcional. Similar a estos resultados, varios estudios han

demostrado que la expresión aislada del FOXP3 no es suficiente para inducir Treg funcionales. Para que se consiga una expresión estable del FOXP3 y se desencadene una capacidad supresora, se han descrito otros marcadores relacionados con las Treg que también juegan un papel muy importante en este contexto, como el *TSDR* o el *CTLA-4*. Algunos estudios indican que la altísima calidad de las tTreg o de las thyTreg, se debe a la hipometilación (muy bajo nivel de metilación) del promotor *TSDR* del *FOXP3* (77, 112, 208). Además, algunos autores han sugerido que el FOXP3 puede actuar directamente sobre la remodelación de la cromatina de los genes del *CTLA-4*, *IL-2* o *IFN- $\gamma$* , promoviendo o silenciando la expresión de los mismos (209, 210). Ohkura et al., demostraron que era necesario disponer de un elevado estado de demetilación no solo en las regiones promotoras del FOXP3, entre ellas el *TSDR*, sino que también en los promotores y en los genes que dan lugar a otros marcadores, como el *CTLA-4*, para adquirir la estabilidad y la plena capacidad supresora propia del linaje celular Treg (207, 211-213). Además del estado de metilación de los genes, también se ha descrito que una deactiliación de las histonas circundantes al promotor y al gen *FOXP3* podría ser el causante de su silenciamiento (212, 214). A pesar de que en el presente estudio aún no tenemos resultados de los niveles de regulación epigenética de las diferentes regiones promotoras y genes implicados en la capacidad reguladora de las Treg, ese estudio será realizado en el futuro para verificar si la falta de estabilidad y funcionalidad observada se debe al estado de metilación de estas regiones en los timocitos.

Paralelamente, transdujimos timocitos CD25<sup>neg</sup> con el gen *FOXP3* junto con el tratamiento con TGF- $\beta$ 1/IL-2. La presencia de este *FOXP3* ectópico debería haber permitido superar las limitaciones supuestamente derivadas de la regulación epigenética, ya que este *FOXP3* ectópico no estaría controlado por el estado de metilación de sus promotores reguladores habituales. Sin embargo, a pesar de estar regulado por un promotor de expresión constitutiva, la expresión del FOXP3 se redujo considerablemente tras varios días de cultivo *in vitro*. Por lo tanto, además del estado de metilación de los genes y/o de las regiones reguladoras, en estas células modificadas genéticamente para forzar una sobre-expresión del FOXP3 deben estar

ocurriendo otros mecanismos que, finalmente, acaban desestabilizando la expresión de este factor de transcripción.

#### Regulación postranscripcional de los marcadores clásicos de las Treg

Una hipótesis que puede explicar la inestabilidad de la expresión del FOXP3 y de la capacidad supresora de los timocitos es que, aunque se ha forzado una expresión de FOXP3 endógeno o ectópico en los timocitos CD25<sup>neg</sup>, estas células pueden tener patrones de expresión diferentes a las thyTreg de otros factores reguladores postranscripcionales esenciales para el mantenimiento o la inhibición del fenotipo y funcionalidad de las Treg. Por ejemplo, el motivo  $\alpha$  estéril y el dominio histidina-aspartato contenidos en la proteína 1 (SAMHD1, por sus siglas en inglés) favorece la degradación del FOXP3 y, por tanto, su expresión desestabiliza la función supresora de las células que los expresan (215). Otro factor importante es el FOXP1, cuya tarea es la de crear un heterodímero con el FOXP3 que estabiliza su unión al ADN y desencadena el fenotipo y funcionalidad Treg (216). Se ha demostrado que el FOXP1, conjuntamente con el FOXP3, regula de manera positiva las rutas de señalización del CD25, CTLA-4, CD39 y CD73, marcadores clásicos de las Treg (217).

También se ha descrito el fenómeno de la translocación del FOXP3 hacia el citoplasma (218, 219). Se ha visto que las células Tconv CD4 activadas pueden mostrar un aumento de la expresión del CD25 y del FOXP3. De hecho, en las Tconv, en lugar de mantenerse en el núcleo para que pueda llevar a cabo su función, este factor de transcripción es exportado hacia el citoplasma y, debido a esa localización citoplasmática, el FOXP3 no puede ejercer su función. Este fenómeno podría explicar por qué las células Tconv estimuladas muestran un aumento transitorio de la expresión del FOXP3, pero no así una posterior adquisición de un fenotipo o capacidad supresora, fenómeno que nosotros también observamos en los timocitos tras tres días de estimulación. Sin embargo, en nuestro estudio hemos demostrado que la expresión del FOXP3 en los timocitos CD25<sup>neg</sup> tratados con TGF- $\beta$ 1 e IL-2 estaba localizada en el núcleo, donde debería de haber llevado a cabo su función [resultados no presentados en esta memoria, pero publicados en (187)].

Existen otros mecanismos que también podrían modular que una proteína adquiriera funcionalidad, como la fosforilación, o que la pierda, como los mecanismos de degradación proteica. Uno de estos mecanismos de degradación de proteínas está basado en la ubiquitinación de las mismas. Se ha demostrado que la enzima deubiquinasa USP7 está ampliamente expresada en las células Treg, pues mantiene y estabiliza al FOXP3. De hecho, la ausencia de esta enzima está asociada con una disminución del FOXP3 y el consecuente decrecimiento de la capacidad supresora de las Treg *in vitro* (220). Adicionalmente, el dominio en caja U tipo E3 de la ubiquitin ligasa STUB1 ha demostrado que es capaz de degradar el FOXP3, provocando una reducción de otros marcadores asociados a las Treg y de su capacidad supresora, y de inducir la expresión de la IL-2 y el IFN- $\gamma$  (221). Por lo tanto, a pesar de la presencia del FOXP3 en el núcleo de las células, su degradación por parte de estas enzimas podría explicar la reducción de él mismo, del CTLA-4, el incremento de la IL-2 y el IFN- $\gamma$ ; y la inestabilidad en la capacidad supresora que hemos observado en los timocitos CD25<sup>neg</sup> utilizados en este trabajo.

Finalmente, no se puede excluir que estos resultados se puedan deber al estado muy inmaduro de los timocitos. Por lo tanto, se debe profundizar en el conocimiento de ambientes genéticos favorables, de los mecanismos de regulación epigenética y de los mecanismos de degradación del FOXP3 para poder llegar al mantenimiento de una expresión estable del FOXP3 y de su capacidad inmunosupresora. Además, también es necesario aumentar el entendimiento de la generación de las Treg en el timo, para poder reproducir las condiciones necesarias *in vitro* y aprovechar la enorme cantidad de timocitos como fuente alternativa de thyTreg.

## VII.2 UniCAR en las Tconv

Desarrollados para combatir tumores hematológicos, los CAR han demostrado una amplia funcionalidad *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y en humanos, hasta el punto en el que la FDA (administración de alimentos y drogas americana, por sus siglas en inglés) y la EMA (agencia europea del medicamento, por sus siglas en inglés) han aprobado tratar a pacientes con

leucemias y linfomas con esta estrategia terapéutica (222). Debido a su potencial, se han desarrollado numerosas estrategias que intentan superar las limitaciones observadas en los CAR convencionales, pero manteniendo, o incluso mejorando, el rendimiento anti-tumoral de estos. Una de estas aproximaciones es el uso de los denominados UniCAR, aquellos CAR que necesitan un intermediario para el reconocimiento del Ag diana y para la activación de las células que portan a los UniCAR en su superficie. Utilizando tres UniCAR con diferentes combinaciones de dominios de co-estimulación, hemos estudiado en Tconv si nuestros UniCAR podrían reproducir el efecto anti-tumoral descrito en los CAR convencionales.

#### Diferencias entre los dominios de co-estimulación en la activación y funcionalidad de las Tconv con UniCAR de segunda generación

Los UniCAR utilizados en este estudio corresponden a un UniCAR-mSA2 de tercera generación con los dominios CD28 y 4-1BB en su estructura, y dos UniCAR de segunda generación, cada uno con un solo dominio de co-estimulación unidos al CD3- $\zeta$ . Un factor muy importante a tener en cuenta es que, para que las aproximaciones terapéuticas con cualquier CAR utilizado sean eficaces, se debe elegir el dominio de co-estimulación del CAR, o la combinación de ellos, más adecuado para cada estrategia.

En este estudio, se ha observado que la sola presencia de un anticuerpo biotinilado, incluso sin la célula diana, induce en las Tconv-UniCARCD28 unos porcentajes de activación superiores a las Tconv-UniCAR41BB y a las Tconv-CAR19, cuyo constructo CAR-T ARI-0001 también está basado en el 4-1BB (223). Por otro lado, en los ensayos de citotoxicidad sobre células diana tumorales K562-CD19, los resultados indican que no hay diferencias en la capacidad citotóxica de las Tconv-UniCARCD28 y de las Tconv-UniCAR41BB, siendo, en ambos casos, ligeramente superior a la de las Tconv con el CAR19 convencional. Estos resultados son contrarios a los mostrados por Lohmueller et al., en cuya investigación también se co-cultivaron Tconv-UniCAR-mSA2 con las células diana K562-CD19. Observaron que el UniCAR-mSA2 con el CD28, en presencia de un anticuerpo intermediario biotinilado, presentaba una ligera mayor citotoxicidad hacia células diana que el UniCAR-

mSA2 con el 4-1BB, aunque en ambos casos era inferior a la mostrada por un CAR convencional que no necesitaba del anticuerpo intermediario (179).

Estas diferencias se podrían deber a las variaciones en los dominios de co-estimulación de los constructos CAR. En las Tconv, los CAR convencionales basados en el CD28 están caracterizados por una intensa activación celular que, consecuentemente, genera una rápida capacidad citotóxica y la eliminación del tumor, ambas muy superiores a las ejercidas por los CAR41BB (224, 225). Sin embargo, se ha descrito que esta intensa activación celular mediada por el CD28 también está asociada a un elevado agotamiento celular, que hace que las células desarrollen más rápidamente un fenotipo senescente y anérgico (226-229). Por el contrario, los CAR basados en el 4-1BB median una menor, pero más sostenida, activación celular, aumentando la proliferación y mitigando el agotamiento de las células efectoras. Esto favorece una mayor persistencia en el paciente y una eliminación de las células tumorales (148, 225-227, 230). Sun et al. describieron que el origen de las diferencias entre estas dos señales de co-estímulo podría deberse a la quinasa LCK, reclutada por la acción conjunta del CAR y los co-receptores CD4 o CD8. Este grupo describió que los sitios de fosforilación que esta quinasa LCK tiene en la cadena CD3- $\zeta$  se encuentran basalmente fosforilados en los **constructos CAR con la secuencia CD28**, lo que desencadena una señal de **activación tónica muy elevada y permanente**. Esta gran activación que induce el CARCD28 aumenta la ruta metabólica de la glucólisis y de la ruta de activación de la quinasa fosfatidilinositol 4-5 bifosfato 3 (PI3K, por sus siglas en inglés). Desafortunadamente, también aumenta la expresión de genes y factores de transcripción relacionados con el agotamiento celular, como *NFATC1*, *NR4A2*, and *PDCD1* (gen que da lugar a la proteína PD-1) (231, 232). Por el contrario, observaron que los constructos **CAR con la secuencia 4-1BB** reclutaban a un complejo proteico que impedía la acción quinasa LCK, manteniendo una fosforilación basal menor y, por tanto, una **señal de activación tónica reducida** (231). Así, el dominio de co-estimulación 4-1BB desencadena un metabolismo más oxidativo y la acción de la cascada de activación del factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés), de TRAF1 y TRAF3 (231, 233), favoreciendo la supervivencia de la célula. Por

lo tanto, este superior estado de activación tónico podría explicar por qué se induce la intensa cascada de activación celular tras el contacto sólo del anticuerpo biotinilado en las Tconv-UniCARCD28, mientras que las Tconv-UniCAR41BB muestran una menor activación inespecífica. Finalmente, para poder demostrar esta hipótesis, se necesitarán los resultados de los futuros experimentos que realicemos acerca del estado de agotamiento celular de ambos tipos de poblaciones.

#### [UniCAR de tercera generación en las Tconv](#)

Por otro lado, con la intención de combinar la potente citotoxicidad de los CARCD28 con el escaso agotamiento y la persistencia a largo plazo de los CAR41BB, se crearon los CAR de tercera generación en cuya estructura están incluidos el CD28, el 4-1BB y el CD3- $\zeta$ . Los CAR convencionales de tercera generación han demostrado una elevada tasa de éxito en estudios pre-clínicos (234-236) y en ensayos clínicos de tumores hematológicos, donde demostraron tener más expansión y persistencia que un CARCD28 (237). En nuestros resultados, hemos observado que las Tconv portadoras del UniCAR de tercera generación se activaban en gran medida únicamente ante la combinación del anticuerpo intermediario biotinilado correcto y las células diana adecuadas, mientras que en presencia solamente del anticuerpo intermediario no mostró ninguna activación inespecífica, al contrario que las Tconv-UniCARCD28 y las Tconv-UniCAR41BB. Sin embargo, a pesar de que esta estructura de UniCAR ejerce una activación mucho más específica que los otras dos UniCAR de segunda generación, la capacidad citotóxica de estas células Tconv-UniCAR no mejora a la ejercida por ambos de segunda generación, tal y como han reportado algunos autores en los resultados de sus estudios en modelos animales (238-241) o incluso en ensayos clínicos (242). En estos estudios se sugirió que la acumulación de varias señales de co-estímulo adicionales podrían no solo no inducir una mayor capacidad citotóxica, sino que incluso podrían generar un detrimento en la funcionalidad de las células.

En resumen, las estructuras UniCAR-mSA2 de segunda y tercera generación utilizadas en el presente trabajo no han demostrado unas mejores cualidades de versatilidad o especificidad para utilizarlas en las Tconv como terapia anti-

tumoral, comparándolas con el CAR19 convencional. Por lo tanto, se continuarán explorando nuevas estrategias y aproximaciones para intentar aprovechar el potencial de los UniCAR en las Tconv.

### VII.3 Diferente patrón de estimulación de las thyTreg mediado por los UniCAR

Numerosos estudios pre-clínicos han demostrado que las Treg antígeno-específicas son más eficaces que las Treg policlonales para desarrollar una gran capacidad supresora (113-115, 127). En este contexto, uno de los primeros estudios de CAR en pTreg para tratar la colitis en ratones (119) demostró resultados muy alentadores. Posteriormente, se investigó con estas pTreg-CAR en contextos de enfermedades autoinmunes en numerosos modelos animales (243-249); para proteger frente a la EICH tras un trasplante de células hematopoyéticas (195, 250, 251) e incluso para prevenir el asma (252).

#### [Los UniCAR no alteran el fenotipo de las thyTreg](#)

A pesar de toda la investigación previa sobre el efecto de los dominios de co-estimulación en las Tconv-CAR en el ámbito oncológico, poco se sabe de cómo actúan los dominios de co-estimulación en las Treg modificadas con CAR, ya que los mismos dominios de co-estimulación afectan de formas muy diferentes a las Tconv y a las Treg, dando como resultados respuestas celulares distintas (222). Tampoco se ha investigado todavía el efecto sinérgico de dos dominios de co-estimulación (como el 4-1BB y el CD28) utilizados conjuntamente en un CAR de tercera generación en las Treg. Además, se desconocen los efectos de los diferentes dominios de co-estimulación en las thyTreg de timo, pues la mayoría de las investigaciones actuales se han basado en pTreg-CAR de sangre periférica.

Para aportar conocimiento a este respecto, en el presente trabajo se han evaluado thyTreg modificadas genéticamente con tres UniCAR con diferente combinación de dominios co-estimuladores. Los resultados de este trabajo demuestran que ninguna variedad de nuestras thyTreg-UniCAR vio alterada su expresión de los principales marcadores de Treg, como el CD25 y el FOXP3, o marcadores de estabilidad, como el HELIOS, con respecto a las thyTreg sin

transducir. Tampoco observamos que la transducción con los diferentes UniCAR alteren la expresión de proteínas implicadas en el trasvase o migración de estas células por la sangre y los tejidos; ni de marcadores de funcionalidad asociados con las Treg, como el CTLA-4, ICOS, LAG3 o CD73, con respecto a las thyTreg sin transducir. Estos resultados se ven avalados por otros estudios basados en pTreg modificadas genéticamente con otros UniCAR, cuyos resultados han sido similares (253). Además, la expresión de todos estos marcadores concuerda con lo observado anteriormente en estas células thyTreg (112) o en tTreg (77, 254). Sin embargo, a pesar de no ser significativo, las thyTreg modificadas genéticamente mostraban un aumento de los niveles basales de expresión de IL-10, de Granzima B y de Perforina, comparándolas con las thyTreg-NT. Por lo tanto, la modificación genética con los constructos UniCAR no altera en gran medida el extraordinario fenotipo celular thyTreg.

Otros autores que han comparado el CD28 frente al 4-1BB en pTreg con CAR convencionales dirigidas también frente al HLA-A2, tampoco observaron diferencias en la frecuencia de la población CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, ni en la metilación en los genes del *TSDR* o del *CTLA-4*. Sin embargo, el CARCD28 indujo una mayor expresión del CTLA-4 y del LAP (181). Otro estudio más amplio sobre el efecto de los dominios intracelulares de CAR convencionales en el fenotipo y la estimulación de las células pTreg fue el realizado por Dawson et al.,. Ellos testaron un CAR frente el HLA-A2 de segunda generación con 10 tipos de combinaciones diferentes de dominios co-estimuladores, todos ellos asociados a los mecanismos naturales de activación las Treg (195, 196). Así, compararon el uso de varios dominios de co-estimulación de la superfamilia del CD28, entre los que destacan el mismo CD28, ICOS, CTLA-4 o PD-1, con la superfamilia de los receptores del TNF (TNFR), entre los que se encuentran el 4-1BB, OX40 o GITR. Al igual que nuestros resultados, no observaron que ninguna estructura CAR con los diferentes dominios alterara la expresión del FOXP3 o el HELIOS en las pTreg, y tampoco su estado de demetilación del *TSDR*. Sin embargo, al contrario que nuestros resultados, también observaron que las pTreg-CARCD28 tenían una expresión más elevada proteínas

asociadas con la capacidad supresora, como el CTLA-4 y el LAP (195), probablemente debido a la combinación de los dominios de co-estimulación.

### Diferencias en la activación celular de las thyTreg según los dominios de co-estimulación

Estudiando la activación celular ejercida por nuestros UniCAR sobre las thyTreg, nuestros resultados muestran diferencias en el perfil y características de la estimulación de las thyTreg entre los diferentes UniCAR.

Similar a lo que hemos observado en las Tconv-CAR, las thyTreg-UniCARCD28 mostraron unos niveles de activación celular muy superiores a los del resto de células. Sin embargo, a pesar de que el UniCARCD28 es el constructo que indujo la mayor activación celular en las thyTreg, este fue también más inespecífico que el del resto de constructos, pues ante intermediarios biotinilados no específicos en presencia e, incluso, en ausencia de las células diana, este constructo estimuló enormemente a las thyTreg. Estos resultados sugieren que el UniCARCD28 induce un estado de activación tónico superior al del UniCAR o UniCAR41BB en las thyTreg, al igual que en las Tconv. Este estado de activación superior haría posible que el detonante que necesitaran estas células para que se estimulen sea menor y que esa activación se desencadene, tan solo, con el reconocimiento de la biotina del intermediario por el UniCARCD28, fenómeno también descrito en otros estudios (253). Además, también explicaría que cuando se dan las señales de reconocimiento conjunto de la biotina del intermediario correcto y la célula diana adecuada, la activación que se desencadene sea muy superior a la del resto de thyTreg-UniCAR. En sintonía con nuestros resultados, estudios previos observaron que la mayor expresión de los marcadores de activación CD69 y CD71 se daba en las pTreg con el CAR convencional basado en el CD28 con respecto al resto, incluidas las pTreg-CAR41BB (181, 195).

Por el contrario, la estimulación celular mediada por el UniCAR de 3ª generación y por el UniCAR41BB en las thyTreg es menor que la de las thyTreg-UniCARCD28, pero mucho más específica, pues únicamente se desencadena la activación celular en presencia del anticuerpo biotinilado correcto y la célula diana adecuada. Además, vemos que no hay diferencias

en el perfil de activación de las thyTreg en el caso del UniCAR41BB y el CAR19, CAR convencional también basado en el 4-1BB.

## VII.4 Potenciales mecanismos de la elevada capacidad supresora de las thyTreg-UniCAR

En el presente estudio, se ha demostrado que las thyTreg modificadas genéticamente con diferentes UniCAR son capaces de suprimir muy eficientemente a las células diana T CD8<sup>+</sup>, elegidas mediante el uso de un anticuerpo  $\alpha$ CD8 biotinilado, disminuyendo su concentración, viabilidad, proliferación y estado de activación. En paralelo, y únicamente cuando las células diana estaban presentes, también suprimieron de una forma indirecta la proliferación y el estado de activación de las células no diana, como las T CD4<sup>+</sup>, sin que su viabilidad se viera afectada. En estudios previos, también se ha reportado que las células pTreg-CAR específicas de un Ag no solo pudieron suprimir la proliferación de las células T efectoras específicas de dicho Ag, sino que también de otras células T efectoras con una especificidad por un antígeno distinto, ejerciendo una supresión directa e indirecta (123, 124, 126, 127). Esta supresión directa sobre las células diana, e indirecta sobre las células no diana, alcanzó en nuestro estudio su máximo exponente en las thyTreg-UniCAR41BB, comparado con las otras variedades de thyTreg-UniCAR. Esa supresión fue, además, ratio-dependiente, resultados comparables a los de otros estudios tanto de pTreg-CAR (122, 123), como de thyTreg policlonales (112).

Para determinar los principales mecanismos con un papel relevante en la supresión ejercida por las thyTreg-UniCAR41BB, se han evaluado las vías de supresión comúnmente empleadas por las Treg para poder llevar a cabo su función supresora (42):

### [Degradación del ATP](#)

Una de ellas es la capacidad de interrupción del metabolismo de las células efectoras, mediante varias vías diferentes de acción (201). Para ello, las Treg pueden llevar a cabo la vía de la degradación del ATP por las proteínas CD73 y CD39 (254) como mecanismo de interrupción metabólica. Sin embargo, la baja

expresión del CD73 en todos los tipos de thyTreg del presente estudio nos hacen pensar que no es el principal mecanismo de la acción supresora ejercida por las thyTreg modificadas genéticamente, aunque tampoco podemos descartar que esté participando.

### Consumo de la IL-2

Otro mecanismo de supresión mediante la disrupción metabólica es la vía de la captación de la IL-2 disponible en el medio gracias a la elevada expresión del CD25 propio de las Treg, reduciendo su disponibilidad para las células inflamatorias o activadas (255). En este contexto, observamos que todos los tipos de thyTreg de nuestro estudio tienen una altísima expresión del CD25. Además, en las condiciones con mayor capacidad de supresión de la proliferación de CMSP activadas, la ejercida por las thyTreg-UniCAR41BB, la cantidad de IL-2 disponible en el medio es mínima y muy inferior a la observada en la condición de control positivo de proliferación. Esta disminución de la IL-2 en el medio concordaría con el mecanismo inmunosupresor de la deprivación por consumo de la IL-2 por parte de las thyTreg. Sin embargo, a pesar de que también podemos observar que la condición de co-cultivo con thyTreg-UniCARCD28 presenta una reducida cantidad de IL-2 disponible en el medio, esta condición muestra una capacidad de supresión equivalente a las thyTreg-UniCAR, e inferior en ambos casos a las thyTreg-UniCAR41BB.

Estos resultados contravienen a los observados en pTreg modificadas con CAR, en los que otros autores han observado que la función supresora ejercida por Treg con un CARCD28 es dependiente del mecanismo de deprivación de la IL-2, mientras que el CAR41BB no muestra este mecanismo aumentado (181). Una hipótesis que podría explicar esta discordancia sería que la cantidad de IL-2 se ve reducida en el medio de cultivo, pero no se asocia a una función supresora, probablemente debido al superior estado de activación tónico de las células thyTreg-UniCARCD28. Debido a este elevado estado de activación basal, las thyTreg-UniCARCD28 consumirían la IL-2 como un mecanismo de supervivencia celular, pero sin aumentar su capacidad supresora. De hecho, algunos estudios sugieren que el consumo de

la IL-2 por parte de las Treg no desencadena necesariamente un aumento de su capacidad supresora (256, 257), y, por lo tanto, podría estar asociando a un fuerte estado de activación y de demanda de nutrientes, como ocurre en las Tconv (258).

#### [Supresión por contacto célula-célula](#)

Otro mecanismo de supresión es el causado por el contacto directo entre las proteínas que median la supresión de las Treg y sus dianas (201). Dentro de este mecanismo, están implicadas numerosos tipos de proteínas, como el CTLA-4, ICOS, LAG3, LAP, etc (42). Estos principales marcadores funcionales de las Treg han sido evaluados en otros estudios en los que también se han modificado genéticamente pTreg con CAR (123, 152, 181, 195, 259). En estos estudios, las células portadoras de diferentes tipos de CAR convencionales mostraron un elevado porcentaje de expresión de estos marcadores asociados con las Treg, como el CTLA-4 o el LAP. Sin embargo, mientras que estos estudios describieron que las células pTreg con CAR41BB tenían una expresión menor del CTLA-4 que las pTreg con CARCD28 (181, 195), nuestros resultados muestran que todos los tipos de thyTreg, modificadas, o no, genéticamente, expresaban de una forma elevada, homogénea y similar las proteínas CTLA-4 e ICOS. Además, con unos niveles inferiores, tampoco hay diferencia en la expresión de LAP, LAG3 o GITR entre nuestras thyTreg sin modificar y las que expresan los diferentes UniCAR. Debido a los niveles de expresión de estos marcadores, cabría suponer que en la supresión ejercida por las thyTreg están participando los mecanismos de supresión directa por contacto directo célula/célula. En cambio, la homogénea expresión de estas proteínas entre los tipos de thyTreg-UniCAR no explicaría las diferencias en la función supresora observadas entre las condiciones en el presente estudio.

#### [Expresión y liberación de citoquinas anti- y pro-inflamatorias](#)

Como mecanismos indirectos supresores encontramos la producción de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10, el TGF- $\beta$  o la IL-35 (201). Entre estas citoquinas, hemos estudiado a la IL-10, la citoquina anti-inflamatoria por excelencia (260) y los resultados que hemos observado han sido sorprendentes. Primeramente, las condiciones de células thyTreg con los

UniCARCD28 y UniCAR41BB mostraron una expresión de la IL-10 en estado basal superior a la observada en las thyTreg no transducidas. Además, tras tres días de co-cultivo con CMSP, la IL-10 presente en el medio de cultivo es muy elevada en las condiciones en las que las thyTreg-UniCAR41BB ejercen una elevada supresión. Sin embargo, la IL-10 en el medio es mucho mayor en la condición de thyTreg-UniCARCD28 que, paradójicamente, es la que menos capacidad supresora mostró. Estos resultados de la IL-10 son similares a los observados en otros estudios, en los que las pTreg con CARCD28 tienen una producción mucho más elevada de la IL-10 que las pTreg con un CAR41BB (181). Además, demostraron que la IL-10 no era la causa principal de supresión, ya que el bloqueo de la IL-10 (181), o una sobre-expresión de esta interleuquina mediante un constructo que codificaba un CAR e IL-10 ectópica (152), no afectaba apenas a la supresión ejercida por las pTreg-CAR, por lo que este mecanismo no debe ser el principal responsable de la función supresora de las pTreg. Por lo tanto, la elevada cantidad de IL-10 que observamos en los medios de cultivo con thyTreg-UniCARCD28 también se debería al elevado estado de activación celular desencadenado por el CD28. No obstante, no podemos confirmar o descartar el papel de la IL-10 u otras citoquinas anti-inflamatorias como mediadores de supresión de este estudio. Para ello, se realizarán futuros experimentos bloqueando estas citoquinas en los ensayos de co-cultivo para poder dilucidar su participación.

De igual modo, hemos analizado la producción de citoquinas pro-inflamatorias en estado basal y su presencia en el medio tras el co-cultivo con las CMSP. Las thyTreg sin modificar genéticamente han sido ampliamente descritas por su estabilidad y escasa producción de citoquinas inflamatorias, incluso bajo ambientes pro-inflamatorios (112, 187). En estado basal, ningún tipo de célula thyTreg mostró una producción reseñable de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, tras tres días de contacto con sus células diana en el co-cultivo con las CMSP, las condiciones de thyTreg-UniCARCD28, además de la IL-10, mostraron los niveles más altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el medio del co-cultivo. Otros grupos han descrito que las pTreg modificadas genéticamente con CAR convencionales basados en el CD28 son capaces de producir altas cantidades de citoquinas inflamatorias, como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$  después del

contacto con su diana, incluso a pesar de co-expresar una alta cantidad de IL-10 (152, 181). También describieron que esta producción de citoquinas, tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, es menor en las pTreg con un CAR-41BB a la mostrada por las pTreg-CARCD28 (179, 181, 253), resultados similares a los nuestros. Sin embargo, contrariamente a nuestros resultados, estos estudios también reportaron que, *in vitro*, las pTreg-CAR41BB tienen una función supresora o similar (253) o menor (181) a las pTreg-CARCD28, una diferencia que fue aún más acusada *in vivo* (195).

A pesar de que algunos autores han descrito pTreg con cierta capacidad para producir citoquinas inflamatorias (78, 79, 261), el fenotipo y estado de maduración de esas células no coinciden con el de las thyTreg. Otros autores han sugerido que las Treg necesitarían adoptar determinadas características de las células efectoras, como por ejemplo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, para poder ejercer su función supresora sobre ellas (262-265). Aunque esta hipótesis podría explicar por qué las thyTreg-UniCAR41BB presentan una elevada capacidad supresora junto con una alta presencia de citoquinas pro-inflamatorias, no explicaría el fenómeno de la elevadísima presencia de citoquinas pro-inflamatorias en las condiciones con thyTreg-UniCARCD28 y su escasa funcionalidad supresora.

#### [Capacidad citolítica de las thyTreg-UniCAR sobre las células diana](#)

La muerte celular inducida de las células efectoras es también un mecanismo de supresión de las Treg (201). Para ello, a pesar de que algunos autores han reportado que la inducción de la muerte celular ejercida por las Treg puede ser causada por la privación de la IL-2 (266), otros autores son contrarios a esta hipótesis (267) y sugieren que el mecanismo por el que las Treg son capaces de inducir la apoptosis en las células diana es mediante la liberación de gránulos que contienen granzimas y perforinas (268-270).

Nuestros resultados muestran que las thyTreg-UniCAR tienen una expresión basal de la Granzima B ligeramente superior al resto de las thyTreg, y que las thyTreg-UniCAR41BB es el tipo celular que presenta basalmente la mayor expresión de Perforina. Tras el co-cultivo con las CMSP, las thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28 y, sobre todo, las thyTreg-UniCAR41BB, redujeron *in*

*vitro* el porcentaje, el número absoluto y la viabilidad de las células diana, sin tener ningún efecto en cualquiera de estos tres parámetros en las células no diana de las CMSP, tanto estudiando las poblaciones en conjunto como por separado, resultados no observados en las thyTreg-NT. Sin embargo, a pesar de que todas nuestras thyTreg-UniCAR mostraron la capacidad de eliminar a las células diana, únicamente las thyTreg-UniCAR41BB mostraron, además, una alta capacidad de supresión de la proliferación y del estado de activación, tanto de las células diana como no-diana.

Estos resultados son similares a los de otros estudios *in vitro* que reportaron que las pTreg podían desarrollar la capacidad de lisar células diana mediante la acción de CAR convencionales (181) o, incluso, por UniCAR (253) en un proceso que es, al menos, dependiente de la Granzima B (181). Sin embargo, en estos estudios, las pTreg con CAR basados en el CD28 mostraron una mayor capacidad citolítica y supresora que los CAR basados en el 4-1BB (181). Contrariamente, otros autores han descrito que las pTreg con CARCD28 frente al HLA-A2 no poseen ningún tipo de efecto citotóxico sobre las células diana (122, 125). Intentando dilucidar esa ambigua capacidad citolítica de las pTreg-CAR, Boroughs et al., hipotetizaron que las diferencias en la nula citotoxicidad observada en las pTreg-CAR dirigidas frente HLA-A2 (122, 125, 195), comparando con la gran capacidad citolítica observada en sus pTreg-CAR frente al CD19, se podía deber a la gran afinidad de su CAR por el CD19. Para estudiar esto, usaron un nuevo CAR con mucha menos afinidad frente a la variante III del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFRvIII, por sus siglas en inglés) y comprobaron que sus pTreg-CAR seguían induciendo una muerte celular similar a sus pTreg-CAR frente al CD19, descartando la hipótesis de la afinidad como principal causa para inducir la capacidad citotóxica (181).

En modelos de tumor *in vivo*, las pTreg-CARCD28 han demostrado tener una alta capacidad de reconocimiento y acumulación sobre las células con el Ag diana, pero con unos bajos niveles de citotoxicidad sobre las células tumorales (181). Boroughs et al., sugirieron que para estudiar *in vivo* el efecto citotóxico de las pTreg-CARCD28, se deben escoger otros modelos que no sean modelos

tumorales, ya que la rápida tasa de proliferación celular de las líneas tumorales podía estar enmascarando los resultados (181). En sintonía con estos estudios, hemos observado que nuestras thyTreg con los diferentes tipos de UniCAR tienen una mayor capacidad de inducir muerte celular sobre las células primarias CMSP que sobre las células de línea tumorales K562-CD19.

Así, en modelos no tumorales, como el de xenotrasplante de piel, a pesar de que los investigadores observaron que pTreg-CARCD28 eran capaces de infiltrar en el trasplante y de inducir una leve lisis de las células diana del tejido trasplantado cuando se infundían ellas solas, esta lisis celular era mucho menor a la inducida por Tconv-CARCD28 frente a los mismos Ag. Posteriormente, demostraron que si se infundían pTreg-CARCD28 y Tconv-CARCD28 a la vez en el animal, ambas dirigidas frente al mismo Ag, las pTreg-CARCD28 prevenían el daño tisular ejercido por las Tconv-CARCD28, ya que el tejido mostró incluso menos lisis celular que con las pTreg-CARCD28 solas. Estos resultados parecen indicar que, a pesar de que las pTreg-CAR puedan desarrollar cierta capacidad citolítica sobre las células diana, su capacidad inmunosupresora y de protección tisular (271) prevalece si se encuentran en contextos de inflamación y daño tisular. En paralelo, también certificaron que las pTreg-CAR41BB no ejercían una óptima función supresora en ese modelo de xenotrasplante *in vivo* (181).

Por lo tanto, a la vista de los resultados de las thyTreg-UniCAR, podemos hipotetizar que las células thyTreg modificadas genéticamente podrían ejercer su función supresora utilizando varios mecanismos: la deprivación de la IL-2, la producción de citoquinas anti-inflamatorias, el contacto directo célula-célula mediante las proteínas de membrana y la inducción de la muerte celular de las células diana. Sin embargo, estos estudios se limitan a experimentos *in vitro* y, desafortunadamente, aún no se han podido determinar si estas mismas células podrían tener una capacidad de protección frente a daños tisulares. Por lo tanto, cada uno de estos mecanismos deberán ser estudiados con más profundidad en futuros experimentos *in vitro* e *in vivo* para determinar el papel de cada uno de ellos

## UniCAR41BB no solo no desestabiliza la capacidad supresora de las thyTreg, sino que la potencia

El papel del dominio intracelular 4-1BB en las Treg sigue siendo aún muy controvertido. A pesar de que algunos autores han relacionado la acción del 4-1BB con una desestabilización de la funcionalidad de las Treg, tal y como se ha comentado anteriormente (181, 195), se ha descrito que el bloqueo del 4-1BB está relacionado con una inhibición de la funcionalidad de las Treg (272) y que la estimulación del 4-1BB mediante agonistas promueve la expansión de las Treg, sin afectar a la expresión del FOXP3 ni a su capacidad supresora (273, 274).

En el presente estudio, las thyTreg-UniCAR41BB han demostrado ser el tipo celular que más eficaz y específicamente ha suprimido a las células diana y no diana con respecto a las células sin transducir y a las portadoras del UniCAR de 3ª generación y del UniCARCD28. Avalando nuestros resultados, Koristka et al. demostraron que en las condiciones en las que co-cultivaron *in vitro* las pTreg-UniCAR con CMSP, no se observaban diferencias en la capacidad de supresión de estas pTreg-UniCARCD28 o pTreg-UniCAR41BB, siendo incluso ligeramente superior la ejercida por estas últimas. Estos resultados son muy relevantes, pues demuestran que el 4-1BB no impide desarrollar una elevada función supresora en las pTreg-UniCAR (253). Por el contrario, en otros numerosos estudios con pTreg-CAR convencionales, las pTreg-CARCD28, además de un mayor nivel de estimulación, mostraron una supresión muy superior a la desarrollada por las pTreg-CAR con otros dominios co-estimuladores en sus constructos. En esos estudios, a pesar de que las pTreg-CAR41BB fueron las que mostraron la segunda mejor función supresora *in vitro*, la diferencia con las pTreg-CARCD28 era notable. Además, estas pTreg-CAR41BB no mostraron tan buenos resultados *in vivo* inhibiendo la enfermedad de EICH, con respecto a las pTreg-CARCD28 (181, 195).

Estas diferencias en la actividad de las células que expresan CAR o UniCAR basados en el 4-1BB o el CD28 observadas en nuestro estudio y las de otros laboratorios, pueden deberse a múltiples causas: (I) La gran mayoría de los estudios previos han utilizado Treg extraídas de sangre periférica de adultos,

mientras que las thyTreg proceden del timo y presentan un fenotipo más indiferenciado. Estas thyTreg podrían expresar algún elemento distinto que repercuta de una forma diferencial ante la acción de los dominios 4-1BB o CD28 asociados a los CAR. (II) Las Treg con CAR basados en el CD28, además de un superior estado de activación, podrían estar desarrollando un mayor estado de agotamiento celular que aquellas células con CAR-41BB, lo que explicaría la alta producción de citoquinas inflamatorias, la variable capacidad supresora y, como también observamos en las thyTreg-UniCARCD28, la prominente expresión de marcadores celulares asociados al agotamiento celular, como el PD-1 o el ICOS. (III) El constructo que utilizamos en la presente tesis es un UniCAR que necesita de intermediarios biotinilados. La conformación proteica resultante del UniCAR tras el reconocimiento del intermediario y del Ag diana podría ser diferente a la ocurrida en los CAR que reconocen directamente el Ag diana. (IV) Pequeñas diferencias en la secuencia de los constructos podrían desencadenar reacciones celulares muy diferentes.

#### [Relevancia de los dominios \*Hinge\* y Transmembrana mediando la activación y funcionalidad de celular](#)

Además de la importancia de las señales de co-estimulación de los CAR, algunos autores también destacan el papel diferencial que poseen otros elementos de los CAR, como el dominio *Hinge* y el dominio Transmembrana. En Tconv-CAR, por ejemplo, se puede observar una gran diferencia en la capacidad citolítica y de producción de citoquinas inflamatorias entre dos CAR con la misma estructura extracelular e intracelular, pero que diferían en los dominios *Hinge* y Transmembrana. Así, el CAR cuyos dominios *Hinge* y Transmembrana estaban basados en la cadena CD8 $\alpha$ , presentaron menos capacidad de inducir apoptosis en células diana que las mismas células portadoras de CAR cuyos dominios pertenecían al CD28 (275). Al igual que la longitud del *Hinge* puede afectar a la funcionalidad del CAR, como fue comentado anteriormente, Fujiwara et al., sugirieron que la estructura del *Hinge* también puede modular la acción del CAR, aumentando o reduciendo el umbral de reconocimiento necesario para que el CAR active a la célula (275). Además, sugirieron que la estructura del dominio Transmembrana también

es capaz de modular al CAR, aumentando o disminuyendo la estabilidad de esta proteína en la membrana celular (275). Marjzner et al., corroboraron que, CAR con los dominios *Hinge* y Transmembrana del CD28 disminuían el umbral desencadenante de la activación celular tras el reconocimiento antigénico, induciendo, por tanto, una mayor activación celular, comparado con los mismos CAR con las secuencias *Hinge* y Transmembrana del CD8 $\alpha$  (276).

En nuestro estudio, se ha observado grandes diferencias en la funcionalidad de las thyTreg-UniCAR41BB, con respecto a otras pTreg con CAR41BB convencionales. Como ya ha sido mencionado anteriormente, Dawson et al., reportaron una falta de funcionalidad de sus pTreg-CAR41BB. Comparando la estructura de ambos tipos de CAR, su constructo CAR41BB posee los dominios Transmembrana y co-estimulador basados íntegramente en el 4-1BB (195), mientras que nuestro UniCAR41BB posee un dominio Transmembrana procedente del CD28 combinado con el dominio co-estimulador 4-1BB. En otros estudios que también reportaron una inestabilidad en la función reguladora de las pTreg en CAR que contenían el 4-1BB, sus dominios *Hinge* y Transmembrana procedían del CD8 $\alpha$  (181), igualmente diferentes a los de nuestro UniCAR41BB.

Sin embargo, Koristka et al., como ha sido mencionado anteriormente, reportaron que sus UniCAR41BB no impedían la capacidad supresora de las Treg y que este constructo también aumentaba su capacidad citolítica. Estos resultados, muy parecidos a los que hemos obtenido en la presente tesis, probablemente se deban a que el dominio Transmembrana de su UniCAR41BB también procede del CD28 (253), al igual que nuestro UniCAR41BB. A este respecto, otros autores sugieren que el dominio Transmembrana de un CAR que procede del CD28 puede interactuar con las proteínas endógenas completas CD28 y con la LCK, formando cúmulos que favorecen el aumento de la capacidad de activación celular, incluso en CAR cuyo dominio de co-estimulación es el 4-1BB (277, 278).

En resumen, la estructura UniCAR41BB utilizado en este trabajo aunaría las ventajas de mantener una excelente estabilidad fenotípica y un menor

agotamiento celular, debido a su dominio intracelular 4-1BB, junto con la moderada capacidad de activación celular y excelente ejecución de la funcionalidad supresora de las thyTreg, debido a su dominio Transmembrana CD28. Además, este constructo evitaría la desestabilización de la función supresora asociada a la estructura íntegra basada en el 4-1BB, reportada por otros grupos, y la sobre-activación celular, inespecificidad y agotamiento característico de los CAR basados íntegramente en el CD28, como también observamos en la menor expresión del PD-1 en las thyTreg-UniCAR41BB. Así, en base a este amplio y minucioso estudio, las thyTreg-UniCAR41BB, cuyo dominio *Hinge* y de transmembrana proviene del CD28 y su dominio co-estimulador es el 4-1BB, son el único tipo de thyTreg modificadas genéticamente que han desarrollado una elevada capacidad supresora manteniendo una alta especificidad y estabilidad fenotípica en ensayos *in vitro*. Como mecanismos de supresión, thyTreg-UniCAR41BB serían capaces de inducir citólisis en las células diana, probablemente mediada por granzimas y perforinas. Además, la inhibición la proliferación y del estado de activación de las células diana restantes y de otras células no diana, podría estar mediado por una moderada producción de IL-10, por un alto consumo de IL-2 y por las proteínas presentes en su superficie celular, como el CTLA-4.

Por otro lado, las thyTreg-UniCARCD28 presentaron un estado de súper activación, una gran capacidad de lisis de las células diana, la mayor producción de IL-10 y consumo de la IL-2. Sin embargo, paradójicamente estos datos no han concluido en una función supresora superior a las thyTreg-NT. La altísima expresión del PD-1, del ICOS y la poca funcionalidad celular podrían indicar que estas células han entrado en una fase de agotamiento o senescencia celular debido a una sobre-activación celular mediada por la combinación de los dominios *Hinge*, transmembrana y co-estimulador del UniCARCD28, al igual que ocurre en las Tconv (232).

Finalmente, la combinación de señales co-estimuladoras CD28 y 4-1BB en un UniCAR de 3ª generación, a pesar de mantener una alta estabilidad fenotípica en las thyTreg, de reconocer muy específicamente los antígenos diana y de

incrementar ligeramente la expresión de proteínas implicadas en la inducción de la lisis celular, similar a las thyTreg-UniCAR41BB, las thyTreg-UniCAR con ambas señales de co-estímulo tampoco mejoran la función supresora de las thyTreg-NT, probablemente debido a un compendio de factores como que no tienen una capacidad citolítica tan fuerte como el resto de UniCAR o un consumo de IL-2 en el medio tan acusado.

## VII.5 Perspectivas a futuro

En primer lugar, se debe seguir profundizando en el estudio de cómo afectan las secuencias de los diferentes elementos estructurales de un CAR o un UniCAR (dominios *Hinge*, Transmembrana y de co-estimulación) a la capacidad supresora y/o citolítica desarrollada por las pTreg y por las thyTreg. Así, se podría modular la activación mediada por los CAR o los UniCAR sin la necesidad de crear constructos tan complejos como los CAR de 3ª o 4ª generación. De hecho, se podrían generar CAR o UniCAR de segunda generación adecuados que superen las limitaciones que han sido mencionadas en la presente tesis, desde la alta citotoxicidad desarrollada por las Tconv-CAR hasta enorme variabilidad en la capacidad supresora de las thyTreg-CAR, reflejadas en esta tesis doctoral.

Por otro lado, nuestros resultados subrayan la necesidad de aumentar el conocimiento en el uso de las thyTreg-UniCAR en modelos *in vitro* e *in vivo* que estudien la relación de la función supresora de thyTreg portadores de UniCAR con la capacidad citolítica y de supresión sobre las células diana y no diana. A este respecto, se propone el desarrollo de estudios *in vivo* con las células thyTreg modificadas genéticamente con el constructo UniCAR41BB, pues es el constructo que induce las mejores características en estas células.

### [Limitaciones y posibles soluciones de los UniCAR-mSA2](#)

Como hemos observado, aunque los resultados son prometedores, existen todavía ciertas limitaciones o desafíos que se deberán superar para avanzar en los próximos pasos del desarrollo de estas células. Centrándonos en los UniCAR, hemos visto que los medios de cultivo pueden afectar a su detección y disponibilidad para reconocer la biotina. En un primer momento, se

hipotetizó que la biotina disponible como vitamina en la sangre de los seres humanos podría afectar al UniCAR de la misma forma que observamos con los medios de cultivo. Sin embargo, dado que este fenómeno depende del medio de cultivo, pero es independiente del suero de suplementación, no esperamos que pueda haber dificultades en futuros modelos animales o, incluso, en la escalabilidad al humano.

Otra potencial limitación sería debido al uso de una estreptavidina monomérica como dominio extracelular del UniCAR, ya que, al tratarse de una proteína de origen bacteriano, algunos humanos pueden desarrollar anticuerpos que la neutralicen (279, 280). Aunque el UniCAR-mSA2 fue diseñado para disminuir al máximo su potencial inmunogénico, se podría llegar a sustituir esa estreptavidina monomérica por alguna proteína homóloga que reconozca la biotina y que tenga aún menos inmunogenicidad, como la Neutravidina (avidina totalmente deglicosilada), la Bradavidina II, Tamavidina 2, Shwanavidina, Zebavidina, o derivados de la estreptavidina, como la Estrep-Tactina.

Además, otra limitación es que las thyTreg-UniCAR han demostrado una gran capacidad citolítica de las células diana. Este punto es de suma importancia y se debe seguir investigando en contextos de enfermedades autoinmunes o rechazo de trasplantes en modelos *in vivo*. Debido a que el objetivo principal de esta terapia sería evitar que las células efectoras dañaran los tejidos de los pacientes, estaríamos haciendo un flaco favor al paciente si, en lugar de las células efectoras, fueran nuestras thyTreg-UniCAR las que ejercieran ese daño induciendo la muerte a las células o tejidos que se desean proteger. En este contexto, a pesar de que algunos autores han reportado que las pTreg-CAR con capacidad citolítica priorizan su función supresora, su habilidad para proteger a los tejidos y su capacidad de restablecer la homeostasis en contextos de inflamación (181), deberemos estudiar en profundidad en futuros modelos *in vivo* si nuestras thyTreg-UniCAR se comportan igual. Esta estrategia terapéutica cuenta con la ventaja de que, al poseer un UniCAR que necesita de un intermediario biotinilado, podremos

modular la activación y la funcionalidad de las thyTreg-UniCAR añadiendo o quitando los intermediarios.

### Estrategias terapéuticas alternativas de las thyTreg-UniCAR

A pesar de la alta capacidad citotóxica que las thyTreg-UniCAR41BB han demostrado tener específicamente por las células diana, ésta se podría aprovechar dirigiendo a estas células para que reconozcan y eliminen a las células auto-reactivas desencadenantes de la autoinmunidad o aquellas que estén ejerciendo el rechazo. Esta estrategia es una de las últimas aproximaciones de las Tconv con CAR clásicos que intentan solventar otras enfermedades más allá de los tumores (281), como la eliminación de células B productoras de auto-Ac en el lupus eritematoso (282). Sin embargo, mientras que las Tconv-CAR eliminarían a las células efectoras de esas patologías contribuyendo al estado pro-inflamatorio, las thyTreg-UniCAR eliminarían a las células pro-inflamatorias diana y, a la vez, favorecerían un ambiente anti-inflamatorio suprimiendo indirectamente al resto de poblaciones celulares.

Una de las posibles dianas terapéuticas en enfermedades autoinmunes sería el eje CD30/CD30 ligando. Se ha reportado que estas proteínas participan en la activación celular y su expresión se ve aumentada en las células efectoras en las enfermedades autoinmunes (283-286) y en el rechazo de trasplantes (287). De hecho, utilizando estas proteínas como diana terapéutica de anticuerpos solubles anti-CD30, se ha reducido la patogenia de artritis reumatoide (288) y encefalitis autoinmune experimental (285). Por lo tanto, utilizando las thyTreg-UniCAR con intermediarios anti-CD30, se podría dirigir la citotoxicidad de las thyTreg hacia las células auto-reactivas y, de manera indirecta, suprimir la activación y proliferación de las demás células en el microambiente inflamatorio.

## VIII. Conclusiones



A la vista de los resultados, se puede concluir de este estudio que:

- I. Las thyTreg no se pueden inducir a partir de la fracción CD25<sup>neg</sup> de los timocitos utilizando las señales proporcionadas por la activación del TCR/CD28, el TFG- $\beta$ 1 y la IL-2. Tampoco se consiguió mediante la inducción de la expresión de un FOXP3 ectópico. Estas aproximaciones han dado como resultado células inestables en su fenotipo y su funcionalidad como Treg.
- II. Se puede transducir eficazmente las células T convencionales y thyTreg humanas con cuatro tipos diferentes de constructos CAR mediante el uso de vectores lentivirales: UniCAR de tercera generación, UniCARCD28 y UniCAR41BB, diseñados para la presente tesis, y el CAR19, actualmente utilizado en clínica. Las células transducidas con estos lentivectores mantienen una alta viabilidad con respecto a las condiciones no transducidas a lo largo de los días de cultivo.
- III. Ningún tipo de UniCAR o el CAR19 altera la expresión de los principales marcadores asociados con las Tconv o con las thyTreg. En el caso de las thyTreg-UniCAR, thyTreg-UniCARCD28 y thyTreg-UniCAR41BB, los UniCAR inducen un aumento no significativo de Granzima B, Perforina e IL-10, en comparación con las células thyTreg non transducidas.
- IV. La activación celular mediada por el UniCAR de 3<sup>a</sup> generación sólo precisa de la presencia de anticuerpos biotinilados intermediarios para estimular a células de línea, independientemente del antígeno diana. En células primarias Tconv, esta activación inespecífica se reduce, pero no llega a desaparecer por completo. Por el contrario, en células primarias thyTreg, el UniCAR únicamente desencadenó una moderada activación celular en presencia del anticuerpo intermediario específico y de la célula diana adecuada. Tras la estimulación celular, el UniCAR aumentó la capacidad citolítica de las Tconv y de las thyTreg. Sin embargo, no indujo un aumento en la capacidad supresora de las ThyTreg.
- V. El constructo UniCARCD28 induce una elevadísima, pero inespecífica, activación en células primarias. Esta activación inespecífica de las

células primarias Tconv y thyTreg mediada por el UniCARCD28 ocurre cuando este constructo reconoce la biotina de cualquier anticuerpo biotinilado, independientemente de la célula diana presente y del anticuerpo intermediario. En las Tconv, este constructo aumentó su capacidad citolítica con respecto a las no transducidas y al CAR19. Además, también aumentó la capacidad citolítica de las thyTreg, pero no así su capacidad supresora.

- VI. En las células primarias Tconv, la estimulación mediada por el UniCAR41BB también fue inespecífica, aunque el nivel de activación celular que indujo fue inferior al UniCARCD28. Por el contrario, las thyTreg-UniCAR41BB se estimularon de una forma moderada y muy específica, pues esta activación únicamente se desencadenó en presencia de la célula diana correcta y con el anticuerpo intermediario biotinilado correcto.
- VII. El UniCAR41BB aumentó la capacidad citolítica de las Tconv sobre células de línea con respecto a las no transducidas y al CAR19. En las thyTreg, el UniCAR41BB no mejoró su capacidad citolítica sobre células de línea con respecto a las thyTreg sin transducir.
- VIII. Las thyTreg-UniCAR41BB, únicamente en presencia del anticuerpo intermediario biotinilado correcto y de las células diana, demostraron un efecto directo sobre la subpoblación diana de células primarias. Las thyTreg-UniCAR41BB desarrollaron una gran capacidad citolítica y la mayor capacidad supresora de la proliferación y del estado de activación de las células primarias diana, reduciendo su presencia en el cultivo celular.
- IX. Además del efecto directo sobre las células primarias diana, las thyTreg-UniCAR41BB, en presencia del anticuerpo intermediario biotinilado correcto y de las células diana, mostraron también un efecto indirecto sobre la proliferación de las células no diana, pero únicamente cuando las células diana estaban presentes.

## IX. Bibliografía



1. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
2. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777-89.
3. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(Suppl 2):49.
4. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):47-59.
5. Park JE, Botting RA, Dominguez Conde C, Popescu DM, Lavaert M, Kunz DJ, et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation. *Science.* 2020;367(6480).
6. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A.* 2019;95(6):647-54.
7. Tuzlak S, Dejean AS, Iannacone M, Quintana FJ, Waisman A, Ginhoux F, et al. Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. *Nat Immunol.* 2021;22(10):1210-7.
8. Hoeks C, Duran G, Hellings N, Broux B. When Helpers Go Above and Beyond: Development and Characterization of Cytotoxic CD4(+) T Cells. *Front Immunol.* 2022;13:951900.
9. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701-11.
10. Verdon DJ, Mulazzani M, Jenkins MR. Cellular and Molecular Mechanisms of CD8(+) T Cell Differentiation, Dysfunction and Exhaustion. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
11. Ceeraz S, Thompson CR, Beatson R, Choy EH. Harnessing CD8(+)CD28(-) Regulatory T Cells as a Tool to Treat Autoimmune Disease. *Cells.* 2021;10(11).
12. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):309-22.
13. Jurberg AD, Vasconcelos-Fontes L, Cotta-de-Almeida V. A Tale from TGF-beta Superfamily for Thymus Ontogeny and Function. *Front Immunol.* 2015;6:442.
14. McCarron MJ, Irla M, Serge A, Soudja SM, Marie JC. Transforming Growth Factor-beta signaling in alphabeta thymocytes promotes negative selection. *Nat Commun.* 2019;10(1):5690.

15. Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):760-72.
16. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):127-35.
17. Crimeen-Irwin B, Scalzo K, Gloster S, Mottram PL, Plebanski M. Failure of immune homeostasis -- the consequences of under and over reactivity. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2005;5(4):413-22.
18. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* 2015;278(4):369-95.
19. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology.* 2011;140(1):51-64.
20. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173(8):4828-37.
21. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Alloreognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens.* 2007;69(6):545-56.
22. Trombetta AC, Meroni M, Cutolo M. Steroids and Autoimmunity. *Front Horm Res.* 2017;48:121-32.
23. Marzbani C, Bhimaraj A. Corticosteroids in Immunosuppression. *Handb Exp Pharmacol.* 2022;272:73-84.
24. Efe C, Taii HA, Ytting H, Aehling N, Bhanji RA, Hagstrom H, et al. Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil as Second-Line Therapies for Pediatric Patients with Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2018;63(5):1348-54.
25. Kozminski P, Halik PK, Chesori R, Gniazdowska E. Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
26. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720-32.
27. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):125-39.
28. Yasunaga M. Antibody therapeutics and immunoregulation in cancer and autoimmune disease. *Semin Cancer Biol.* 2020;64:1-12.

29. Sikma MA, van Maarseveen EM, van de Graaf EA, Kirkels JH, Verhaar MC, Donker DW, et al. Pharmacokinetics and Toxicity of Tacrolimus Early After Heart and Lung Transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(9):2301-13.
30. Watson CJ, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth*. 2012;108 Suppl 1:i29-42.
31. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 2010;140(6):935-50.
32. Roubille C, Martel-Pelletier J, Davy JM, Haraoui B, Pelletier JP. Cardiovascular adverse effects of anti-inflammatory drugs. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2013;12(1):55-67.
33. Kabat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(1):17-27.
34. Morante-Palacios O, Fondelli F, Ballestar E, Martinez-Caceres EM. Tolerogenic Dendritic Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. *Trends Immunol*. 2021;42(1):59-75.
35. Zhao Y, Wu T, Shao S, Shi B, Zhao Y. Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1004983.
36. Gallego-Valle J, Perez-Fernandez VA, Correa-Rocha R, Pion M. Generation of Human Breg-Like Phenotype with Regulatory Function In Vitro with Bacteria-Derived Oligodeoxynucleotides. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
37. Wang L, Fu Y, Chu Y. Regulatory B Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1254:87-103.
38. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
39. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8-27.
40. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
41. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13-22.
42. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2019;10:43.

43. Li DY, Xiong XZ. ICOS(+) Tregs: A Functional Subset of Tregs in Immune Diseases. *Front Immunol.* 2020;11:2104.
44. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257-65.
45. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19446-51.
46. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol.* 2006;177(10):7155-63.
47. Okeke EB, Uzonna JE. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Front Immunol.* 2019;10:680.
48. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(10):1489-96.
49. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:531-64.
50. Klein L, Robey EA, Hsieh CS. Central CD4(+) T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(1):7-18.
51. Owen DL, Mahmud SA, Sjaastad LE, Williams JB, Spanier JA, Simeonov DR, et al. Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat Immunol.* 2019;20(2):195-205.
52. Santamaria JC, Borelli A, Irla M. Regulatory T Cell Heterogeneity in the Thymus: Impact on Their Functional Activities. *Front Immunol.* 2021;12:643153.
53. Owen DL, Sjaastad LE, Farrar MA. Regulatory T Cell Development in the Thymus. *J Immunol.* 2019;203(8):2031-41.
54. Mahmud SA, Manlove LS, Schmitz HM, Xing Y, Wang Y, Owen DL, et al. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2014;15(5):473-81.
55. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.
56. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):21-3.

57. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008;38(6):1654-63.
58. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol.* 2009;9(2):83-9.
59. Battaglia A, Buzzonetti A, Monego G, Peri L, Ferrandina G, Fanfani F, et al. Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology.* 2008;123(1):129-38.
60. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol.* 2010;47(7-8):1595-600.
61. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(9):721-5.
62. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875-86.
63. Xiao S, Jin H, Korn T, Liu SM, Oukka M, Lim B, et al. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol.* 2008;181(4):2277-84.
64. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M, Gagliani N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity.* 2018;49(6):1004-19.
65. Gravano DM, Vignali DA. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(12):1997-2008.
66. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(16):2603-22.
67. Gregori S, Roncarolo MG. Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application. *Front Immunol.* 2018;9:233.
68. Chen W, Konkel JE. Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF-beta matters. *Eur J Immunol.* 2015;45(4):958-65.
69. Xu A, Liu Y, Chen W, Wang J, Xue Y, Huang F, et al. TGF-beta-Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism. *J Immunol.* 2016;196(9):3631-41.

70. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . *J Immunol*. 2005;174(3):1446-55.
71. Honaker Y, Hubbard N, Xiang Y, Fisher L, Hagin D, Sommer K, et al. Gene editing to induce FOXP3 expression in human CD4(+) T cells leads to a stable regulatory phenotype and function. *Sci Transl Med*. 2020;12(546).
72. Allan SE, Alstad AN, Merindol N, Crellin NK, Amendola M, Bacchetta R, et al. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3. *Mol Ther*. 2008;16(1):194-202.
73. Beavis PA, Gregory B, Green P, Cribbs AP, Kennedy A, Amjadi P, et al. Resistance to regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis can be bypassed by ectopic foxp3 expression in pathogenic synovial T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16717-22.
74. Passerini L, Rossi Mel E, Sartirana C, Fousteri G, Bondanza A, Naldini L, et al. CD4(+) T cells from IPEX patients convert into functional and stable regulatory T cells by FOXP3 gene transfer. *Sci Transl Med*. 2013;5(215):215ra174.
75. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5(2):e38.
76. Ivanova EA, Orekhov AN. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int*. 2015;2015:327470.
77. Dijke IE, Hoeppli RE, Ellis T, Pearcey J, Huang Q, McMurchy AN, et al. Discarded Human Thymus Is a Novel Source of Stable and Long-Lived Therapeutic Regulatory T Cells. *Am J Transplant*. 2016;16(1):58-71.
78. Atif M, Conti F, Gorochov G, Oo YH, Miyara M. Regulatory T cells in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(2):e01099.
79. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol*. 2010;184(8):4317-26.
80. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-50.
81. Trenado A, Sudres M, Tang Q, Maury S, Charlotte F, Gregoire S, et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol*. 2006;176(2):1266-73.

82. Tsang JY, Tanriver Y, Jiang S, Leung E, Ratnasothy K, Lombardi G, et al. Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl Immunol.* 2009;21(4):203-9.
83. Bashuda H, Kimikawa M, Seino K, Kato Y, Ono F, Shimizu A, et al. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1896-902.
84. Ma A, Qi S, Song L, Hu Y, Dun H, Massicotte E, et al. Adoptive transfer of CD4+CD25+ regulatory cells combined with low-dose sirolimus and anti-thymocyte globulin delays acute rejection of renal allografts in *Cynomolgus* monkeys. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(5):618-29.
85. Duran-Struuck R, Sondermeijer HP, Buhler L, Alonso-Guallart P, Zitsman J, Kato Y, et al. Effect of Ex Vivo-Expanded Recipient Regulatory T Cells on Hematopoietic Chimerism and Kidney Allograft Tolerance Across MHC Barriers in *Cynomolgus* Macaques. *Transplantation.* 2017;101(2):274-83.
86. Issa F, Hester J, Goto R, Nadig SN, Goodacre TE, Wood K. Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation.* 2010;90(12):1321-7.
87. Wu DC, Hester J, Nadig SN, Zhang W, Trzonkowski P, Gray D, et al. Ex vivo expanded human regulatory T cells can prolong survival of a human islet allograft in a humanized mouse model. *Transplantation.* 2013;96(8):707-16.
88. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juscinska J, Dobyszyk A, Krzystyniak A, Marek N, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol.* 2009;133(1):22-6.
89. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet.* 2020;395(10237):1627-39.
90. Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitzu M, Nagatsu A, Oura T, et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology.* 2016;64(2):632-43.
91. Chandran S, Tang Q, Sarwal M, Laszik ZG, Putnam AL, Lee K, et al. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am J Transplant.* 2017;17(11):2945-54.
92. Mathew JM, J HV, LeFever A, Konieczna I, Stratton C, He J, et al. A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep.* 2018;8(1):7428.

93. Sanchez-Fueyo A, Whitehouse G, Grageda N, Cramp ME, Lim TY, Romano M, et al. Applicability, safety, and biological activity of regulatory T cell therapy in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2020;20(4):1125-36.
94. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061-70.
95. Gliwinski M, Iwaszkiewicz-Grzes D, Trzonkowski P. Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells. *BioDrugs*. 2017;31(4):335-47.
96. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-8.
97. Canavan JB, Scotta C, Vossenkamper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, et al. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. 2016;65(4):584-94.
98. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):1088-97.
99. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood*. 2006;108(13):4260-7.
100. MacDonald KN, Piret JM, Levings MK. Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy. *Clin Exp Immunol*. 2019;197(1):52-63.
101. Fuentes-Aparicio V, Alonso-Lebrero E, Zapatero L, Infante S, Lorente R, Munoz-Fernandez MA, et al. Induction of Treg cells after oral immunotherapy in hen's egg-allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(1):103-6.
102. Ferrando-Martinez S, Lorente R, Gurbindo D, De Jose MI, Leal M, Munoz-Fernandez MA, et al. Low thymic output, peripheral homeostasis deregulation, and hastened regulatory T cells differentiation in children with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. 2014;164(4):882-9.
103. Perezabad L, Lopez-Abente J, Alonso-Lebrero E, Seoane E, Pion M, Correa-Rocha R. The establishment of cow's milk protein allergy in infants is related with a deficit of regulatory T cells (Treg) and vitamin D. *Pediatr Res*. 2017;81(5):722-30.
104. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167(3):1245-53.
105. Wing K, Larsson P, Sandstrom K, Lundin SB, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. *Immunology*. 2005;115(4):516-25.

106. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, Hippen KL, DeFor TE, Sumstad D, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood*. 2016;127(8):1044-51.
107. Sun L, Wu J, Yi S. Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. *Transpl Immunol*. 2012;26(2-3):71-80.
108. Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity*. 2009;30(5):656-65.
109. Haque M, Fino K, Sandhu P, Song J. Development of Stem Cell-derived Antigen-specific Regulatory T Cells Against Autoimmunity. *J Vis Exp*. 2016(117).
110. Haque M, Lei F, Xiong X, Das JK, Ren X, Fang D, et al. Stem cell-derived tissue-associated regulatory T cells suppress the activity of pathogenic cells in autoimmune diabetes. *JCI Insight*. 2019;4(7).
111. Romano M, Sen M, Scotta C, Alhabbab RY, Rico-Armada A, Lechler RI, et al. Isolation and expansion of thymus-derived regulatory T cells for use in pediatric heart transplant patients. *Eur J Immunol*. 2021;51(8):2086-92.
112. Bernaldo-de-Quiros E, Cozar B, Lopez-Esteban R, Clemente M, Gil-Jaurena JM, Pardo C, et al. A Novel GMP Protocol to Produce High-Quality Treg Cells From the Pediatric Thymic Tissue to Be Employed as Cellular Therapy. *Front Immunol*. 2022;13:893576.
113. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. 2004;199(11):1467-77.
114. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 2007;109(2):827-35.
115. Stephens LA, Malpass KH, Anderton SM. Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):1108-17.
116. Cong Y, Konrad A, Iqbal N, Hatton RD, Weaver CT, Elson CO. Generation of antigen-specific, Foxp3-expressing CD4+ regulatory T cells by inhibition of APC proteasome function. *J Immunol*. 2005;174(5):2787-95.
117. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;198(2):235-47.
118. Kaljanac M, Abken H. Do Treg Speed Up with CARs? Chimeric Antigen Receptor Treg Engineered to Induce Transplant Tolerance. *Transplantation*. 2022.

119. Elinav E, Waks T, Eshhar Z. Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2008;134(7):2014-24.
120. Lee JC, Hayman E, Pegram HJ, Santos E, Heller G, Sadelain M, et al. In vivo inhibition of human CD19-targeted effector T cells by natural T regulatory cells in a xenotransplant murine model of B cell malignancy. *Cancer Res*. 2011;71(8):2871-81.
121. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651-68.
122. MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1413-24.
123. Dawson NA, Lamarche C, Hoeppli RE, Bergqvist P, Fung VC, McIver E, et al. Systematic testing and specificity mapping of alloantigen-specific chimeric antigen receptors in regulatory T cells. *JCI Insight*. 2019;4(6).
124. Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, et al. Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. *Am J Transplant*. 2017;17(4):917-30.
125. Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim MA, Hannen RF, Cooper D, et al. Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection. *Am J Transplant*. 2017;17(4):931-43.
126. Yoon J, Schmidt A, Zhang AH, Konigs C, Kim YC, Scott DW. FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. *Blood*. 2017;129(2):238-45.
127. Raffin C, Vo LT, Bluestone JA. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(3):158-72.
128. Cortes-Hernandez A, Alvarez-Salazar EK, Soldevila G. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy for Cancer. Challenges and Opportunities: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2021;2174:219-44.
129. Hillerdal V, Essand M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for the treatment of metastatic prostate cancer. *BioDrugs*. 2015;29(2):75-89.
130. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol*. 2016;7(1):54-86.
131. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, et al. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int J Hematol*. 2011;93(3):294-300.

132. Quesnel B. Tumor dormancy and immunoescape. *APMIS*. 2008;116(7-8):685-94.
133. Concha-Benavente F, Ferris RL. Reversing EGFR Mediated Immunoescape by Targeted Monoclonal Antibody Therapy. *Front Pharmacol*. 2017;8:332.
134. Rosenberg SA, Packard BS, Aebbersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1988;319(25):1676-80.
135. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;149(3):960-8.
136. Smolej L. Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: A Therapeutic Challenge. *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(8):701-9.
137. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):e577.
138. Frey NV. Chimeric antigen receptor T cells for acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*. 2019;94(S1):S24-S7.
139. Boucher JC, Davila ML. Chimeric Antigen Receptor Design Today and Tomorrow. *Cancer J*. 2021;27(2):92-7.
140. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(1):137-54.
141. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(10):1357-69.
142. Kang CH, Kim Y, Lee HK, Lee SM, Jeong HG, Choi SU, et al. Identification of Potent CD19 scFv for CAR T Cells through scFv Screening with NK/T-Cell Line. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
143. Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, Sommermeyer D, Jensen MC, Rader C, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19(12):3153-64.
144. Hombach AA, Schildgen V, Heuser C, Finnern R, Gilham DE, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells. *J Immunol*. 2007;178(7):4650-7.
145. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(2):125-35.

146. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*. 2020;58:102931.
147. Wu W, Zhou Q, Masubuchi T, Shi X, Li H, Xu X, et al. Multiple Signaling Roles of CD3epsilon and Its Application in CAR-T Cell Therapy. *Cell*. 2020;182(4):855-71 e23.
148. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*. 2015;21(6):581-90.
149. Weinkove R, George P, Dasyam N, McLellan AD. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clin Transl Immunology*. 2019;8(5):e1049.
150. Zhang E, Xu H. A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):1.
151. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017;23(9):2255-66.
152. Mohseni YR, Saleem A, Tung SL, Dudreuilh C, Lang C, Peng Q, et al. Chimeric antigen receptor-modified human regulatory T cells that constitutively express IL-10 maintain their phenotype and are potently suppressive. *Eur J Immunol*. 2021;51(10):2522-30.
153. Sun S, Hao H, Yang G, Zhang Y, Fu Y. Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies. *J Immunol Res*. 2018;2018:2386187.
154. Mei H, Jiang H, Wu Y, Guo T, Xia L, Jin R, et al. Neurological toxicities and coagulation disorders in the cytokine release syndrome during CAR-T therapy. *Br J Haematol*. 2018;181(5):689-92.
155. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1844-54.
156. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
157. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther*. 2010;17(10):1206-13.
158. Khan AN, Chowdhury A, Karulkar A, Jaiswal AK, Banik A, Asija S, et al. Immunogenicity of CAR-T Cell Therapeutics: Evidence, Mechanism and Mitigation. *Front Immunol*. 2022;13:886546.

159. Majzner RG, Mackall CL. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(10):1219-26.
160. Casucci M, Falcone L, Camisa B, Norelli M, Porcellini S, Stornaiuolo A, et al. Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Front Immunol.* 2018;9:507.
161. Lupo-Stanghellini MT, Provasi E, Bondanza A, Ciceri F, Bordignon C, Bonini C. Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Gene Ther.* 2010;21(3):241-50.
162. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol.* 2014;5:235.
163. Zhou X, Di Stasi A, Tey SK, Krance RA, Martinez C, Leung KS, et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood.* 2014;123(25):3895-905.
164. Paszkiewicz PJ, Frassle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest.* 2016;126(11):4262-72.
165. Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJ, Pereira AC, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol.* 2012;32(5):1059-70.
166. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2:e105.
167. Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, et al. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016;164(4):780-91.
168. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med.* 2013;5(215):215ra172.
169. Ma JS, Kim JY, Kazane SA, Choi SH, Yun HY, Kim MS, et al. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(4):E450-8.
170. Juillerat A, Marechal A, Filhol JM, Valton J, Duclert A, Poirot L, et al. Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Sci Rep.* 2016;6:18950.

171. Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):132.
172. Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J.* 2016;6(8):e458.
173. Loureiro LR, Feldmann A, Bergmann R, Koristka S, Berndt N, Arndt C, et al. Development of a novel target module redirecting UniCAR T cells to Sialyl Tn-expressing tumor cells. *Blood Cancer J.* 2018;8(9):81.
174. Sutherland AR, Owens MN, Geyer CR. Modular Chimeric Antigen Receptor Systems for Universal CAR T Cell Retargeting. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
175. Martinez Bedoya D, Dutoit V, Migliorini D. Allogeneic CAR T Cells: An Alternative to Overcome Challenges of CAR T Cell Therapy in Glioblastoma. *Front Immunol.* 2021;12:640082.
176. Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell.* 2018;173(6):1426-38 e11.
177. Jain A, Cheng K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *J Control Release.* 2017;245:27-40.
178. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res.* 2012;72(7):1844-52.
179. Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology.* 2017;7(1):e1368604.
180. Lim KH, Huang H, Pralle A, Park S. Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(1):57-67.
181. Boroughs AC, Larson RC, Choi BD, Bouffard AA, Riley LS, Schiferle E, et al. Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function. *JCI Insight.* 2019;5.
182. Cribbs AP, Kennedy A, Gregory B, Brennan FM. Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13:98.
183. Li Q, Virtuoso LP, Anderson CD, Egilmez NK. Regulatory Rebound in IL-12-Treated Tumors Is Driven by Uncommitted Peripheral Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2015;195(3):1293-300.

184. Collison LW, Vignali DA. In vitro Treg suppression assays. *Methods Mol Biol.* 2011;707:21-37.
185. McMurchy AN, Levings MK. Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide. *Eur J Immunol.* 2012;42(1):27-34.
186. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:385-402.
187. Gallego-Valle J, Gil-Manso S, Pita A, Bernaldo-de-Quiros E, Lopez-Esteban R, Martinez-Bonet M, et al. Ectopic FOXP3 Expression in Combination with TGF-beta1 and IL-2 Stimulation Generates Limited Suppressive Function in Human Primary Activated Thymocytes Ex Vivo. *Biomedicines.* 2021;9(5).
188. Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun.* 2013;45:49-57.
189. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015;7(315):315ra189.
190. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta.* 1996;255(1):1-11.
191. Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47(6):946-53.
192. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castella M, Alonso-Saladrigues A, Benitez-Ribas D, Caballero-Banos M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19(+) Relapsed/Refractory Malignancies. *Mol Ther.* 2021;29(2):636-44.
193. Ortiz-Maldonado V, Alonso-Saladrigues A, Espanol-Rego M, Martinez-Cibrian N, Faura A, Magnano L, et al. Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease. *Am J Hematol.* 2022;97(6):731-9.
194. Trias E, Juan M, Urbano-Ispizua A, Calvo G. The hospital exemption pathway for the approval of advanced therapy medicinal products: an underused opportunity? The case of the CAR-T ARI-0001. *Bone Marrow Transplant.* 2022;57(2):156-9.
195. Dawson NAJ, Rosado-Sanchez I, Novakovsky GE, Fung VCW, Huang Q, McIver E, et al. Functional effects of chimeric antigen receptor co-receptor signaling domains in human regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2020;12(557).
196. Kumar P, Bhattacharya P, Prabhakar BS. A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and Treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity. *J Autoimmun.* 2018;95:77-99.

197. Duggleby R, Danby RD, Madrigal JA, Saudemont A. Clinical Grade Regulatory CD4(+) T Cells (Tregs): Moving Toward Cellular-Based Immunomodulatory Therapies. *Front Immunol.* 2018;9:252.
198. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
199. Lam AJ, Uday P, Gillies JK, Levings MK. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur J Immunol.* 2022;52(1):75-84.
200. Seng A, Krausz KL, Pei D, Koestler DC, Fischer RT, Yankee TM, et al. Coexpression of FOXP3 and a Helios isoform enhances the effectiveness of human engineered regulatory T cells. *Blood Adv.* 2020;4(7):1325-39.
201. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.
202. Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature.* 2001;409(6816):97-101.
203. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(6):632-40.
204. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol.* 2007;178(4):2018-27.
205. Caramalho I, Nunes-Silva V, Pires AR, Mota C, Pinto AI, Nunes-Cabaco H, et al. Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. *J Autoimmun.* 2015;56:98-110.
206. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity.* 2012;36(2):262-75.
207. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity.* 2012;37(5):785-99.
208. Kressler C, Gasparoni G, Nordstrom K, Hamo D, Salhab A, Dimitropoulos C, et al. Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype. *Front Immunol.* 2020;11:609891.

209. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*. 2007;446(7136):685-9.
210. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006;126(2):375-87.
211. Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, Itoh M, Nagao-Sato S, Kawaji H, et al. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5289-94.
212. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-23.
213. Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev*. 2014;259(1):192-205.
214. Chen C, Rowell EA, Thomas RM, Hancock WW, Wells AD. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem*. 2006;281(48):36828-34.
215. Kim YC, Kim KK, Yoon J, Scott DW, Shevach EM. SAMHD1 Posttranscriptionally Controls the Expression of Foxp3 and Helios in Human T Regulatory Cells. *J Immunol*. 2018;201(6):1671-80.
216. Konopacki C, Pritykin Y, Rubtsov Y, Leslie CS, Rudensky AY. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. *Nat Immunol*. 2019;20(2):232-42.
217. Ren J, Han L, Tang J, Liu Y, Deng X, Liu Q, et al. Foxp1 is critical for the maintenance of regulatory T-cell homeostasis and suppressive function. *PLoS Biol*. 2019;17(5):e3000270.
218. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(11):703-17.
219. Magg T, Mannert J, Ellwart JW, Schmid I, Albert MH. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2012;42(6):1627-38.
220. van Loosdregt J, Fleskens V, Fu J, Brenkman AB, Bekker CP, Pals CE, et al. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity*. 2013;39(2):259-71.
221. Chen Z, Barbi J, Bu S, Yang HY, Li Z, Gao Y, et al. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2013;39(2):272-85.

222. Gille I, Claas FHJ, Haasnoot GW, Heemskerk MHM, Heidt S. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Regulatory T-Cells in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol.* 2022;13:874157.
223. Castella M, Caballero-Banos M, Ortiz-Maldonado V, Gonzalez-Navarro EA, Sune G, Antonana-Vidosola A, et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol.* 2020;11:482.
224. Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res.* 2006;66(22):10995-1004.
225. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell.* 2015;28(4):415-28.
226. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-44.
227. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2545-54.
228. Philipson BI, O'Connor RS, May MJ, June CH, Albelda SM, Milone MC. 4-1BB costimulation promotes CAR T cell survival through noncanonical NF-kappaB signaling. *Sci Signal.* 2020;13(625).
229. Wijewarnasuriya D, Beberitz C, Lopez AV, Rafiq S, Brentjens RJ. Excessive Costimulation Leads to Dysfunction of Adoptively Transferred T Cells. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(6):732-42.
230. Zhang H, Snyder KM, Suhoski MM, Maus MV, Kapoor V, June CH, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J Immunol.* 2007;179(7):4910-8.
231. Sun C, Shou P, Du H, Hirabayashi K, Chen Y, Herring LE, et al. THEMIS-SHP1 Recruitment by 4-1BB Tunes LCK-Mediated Priming of Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells. *Cancer Cell.* 2020;37(2):216-25 e6.
232. Boucher JC, Li G, Kotani H, Cabral ML, Morrissey D, Lee SB, et al. CD28 Costimulatory Domain-Targeted Mutations Enhance Chimeric Antigen Receptor T-cell Function. *Cancer Immunol Res.* 2021;9(1):62-74.
233. Li G, Boucher JC, Kotani H, Park K, Zhang Y, Shrestha B, et al. 4-1BB enhancement of CART function requires NF-kappaB and TRAFs. *JCI Insight.* 2018;3(18).

234. Li W, Guo L, Rathi P, Marinova E, Gao X, Wu MF, et al. Redirecting T Cells to Glypican-3 with 4-1BB Zeta Chimeric Antigen Receptors Results in Th1 Polarization and Potent Antitumor Activity. *Hum Gene Ther.* 2017;28(5):437-48.
235. Park S, Shevlin E, Vedvyas Y, Zaman M, Park S, Hsu YS, et al. Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity. *Sci Rep.* 2017;7(1):14366.
236. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhali M, Suhoski MM, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3360-5.
237. Ramos CA, Rouce R, Robertson CS, Reyna A, Narala N, Vyas G, et al. In Vivo Fate and Activity of Second- versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Mol Ther.* 2018;26(12):2727-37.
238. Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther.* 2010;18(2):413-20.
239. Wang J, Jensen M, Lin Y, Sui X, Chen E, Lindgren CG, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther.* 2007;18(8):712-25.
240. Abate-Daga D, Lagisetty KH, Tran E, Zheng Z, Gattinoni L, Yu Z, et al. A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther.* 2014;25(12):1003-12.
241. Hombach AA, Rappl G, Abken H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation". *Mol Ther.* 2013;21(12):2268-77.
242. Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood.* 2012;119(17):3940-50.
243. De Paula Pohl A, Schmidt A, Zhang AH, Maldonado T, Konigs C, Scott DW. Engineered regulatory T cells expressing myelin-specific chimeric antigen receptors suppress EAE progression. *Cell Immunol.* 2020;358:104222.
244. Fransson M, Piras E, Burman J, Nilsson B, Essand M, Lu B, et al. CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J Neuroinflammation.* 2012;9:112.
245. Tenspolde M, Zimmermann K, Weber LC, Hapke M, Lieber M, Dywicky J, et al. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *J Autoimmun.* 2019;103:102289.

246. Rana J, Perry DJ, Kumar SRP, Munoz-Melero M, Saboungi R, Brusko TM, et al. CAR- and TRuC-redirected regulatory T cells differ in capacity to control adaptive immunity to FVIII. *Mol Ther.* 2021;29(9):2660-76.
247. Pohl AP, Venkatesha SH, Zhang AH, Scott DW. Suppression of FVIII-Specific Memory B Cells by Chimeric BAR Receptor-Engineered Natural Regulatory T Cells. *Front Immunol.* 2020;11:693.
248. Mukhatayev Z, Dellacecca ER, Cosgrove C, Shivde R, Jaishankar D, Pontarolo-Maag K, et al. Antigen Specificity Enhances Disease Control by Tregs in Vitiligo. *Front Immunol.* 2020;11:581433.
249. Whittington KB, Prisolovsky A, Beaty J, Albritton L, Radic M, Rosloniec EF. CD8(+) T Cells Expressing an HLA-DR1 Chimeric Antigen Receptor Target Autoimmune CD4(+) T Cells in an Antigen-Specific Manner and Inhibit the Development of Autoimmune Arthritis. *J Immunol.* 2022;208(1):16-26.
250. Imura Y, Ando M, Kondo T, Ito M, Yoshimura A. CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD. *JCI Insight.* 2020;5(14).
251. Martin A, Daris M, Johnston JA, Cui J. HLA-A\*02:01-directed chimeric antigen receptor/forkhead box P3-engineered CD4+ T cells adopt a regulatory phenotype and suppress established graft-versus-host disease. *Cytherapy.* 2021;23(2):131-6.
252. Skuljec J, Chmielewski M, Happle C, Habener A, Busse M, Abken H, et al. Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma. *Front Immunol.* 2017;8:1125.
253. Koristka S, Kegler A, Bergmann R, Arndt C, Feldmann A, Albert S, et al. Engrafting human regulatory T cells with a flexible modular chimeric antigen receptor technology. *J Autoimmun.* 2018;90:116-31.
254. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 2012;26(6):2253-76.
255. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol.* 2016;17(11):1322-33.
256. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1142-51.
257. Duthoit CT, Mekala DJ, Alli RS, Geiger TL. Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2005;174(1):155-63.
258. Humblet-Baron S, Franckaert D, Dooley J, Bornschein S, Cauwe B, Schonefeldt S, et al. IL-2 consumption by highly activated CD8 T cells induces regulatory T-cell dysfunction in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(1):200-9 e8.

259. Pierini A, Iliopoulou BP, Peiris H, Perez-Cruz M, Baker J, Hsu K, et al. T cells expressing chimeric antigen receptor promote immune tolerance. *JCI Insight*. 2017;2(20).
260. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63.
261. Xin L, Gao J, Ge X, Tian C, Ma W, Tian Z, et al. Increased pro-inflammatory cytokine-secreting regulatory T cells are correlated with the plasticity of T helper cell differentiation and reflect disease status in asthma. *Respir Med*. 2018;143:129-38.
262. Feng T, Cao AT, Weaver CT, Elson CO, Cong Y. Interleukin-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to interferon-gamma-producing Foxp3+ T cells that inhibit colitis. *Gastroenterology*. 2011;140(7):2031-43.
263. Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT, et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature*. 2009;458(7236):351-6.
264. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*. 2009;326(5955):986-91.
265. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4793-8.
266. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353-62.
267. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol*. 2007;179(6):3578-87.
268. Bolivar-Wagers S, Larson JH, Jin S, Blazar BR. Cytolytic CD4(+) and CD8(+) Regulatory T-Cells and Implications for Developing Immunotherapies to Combat Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2022;13:864748.
269. Veugelers K, Motyka B, Goping IS, Shostak I, Sawchuk T, Bleackley RC. Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell*. 2006;17(2):623-33.
270. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):88-97.

271. Nosbaum A, Prevel N, Truong HA, Mehta P, Ettinger M, Scharschmidt TC, et al. Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. *J Immunol*. 2016;196(5):2010-4.
272. Smith SE, Hoelzinger DB, Dominguez AL, Van Snick J, Lustgarten J. Signals through 4-1BB inhibit T regulatory cells by blocking IL-9 production enhancing antitumor responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(12):1775-87.
273. Zhang P, Gao F, Wang Q, Wang X, Zhu F, Ma C, et al. Agonistic anti-4-1BB antibody promotes the expansion of natural regulatory T cells while maintaining Foxp3 expression. *Scand J Immunol*. 2007;66(4):435-40.
274. Elpek KG, Yolcu ES, Franke DD, Lacelle C, Schabowsky RH, Shirwan H. Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol*. 2007;179(11):7295-304.
275. Fujiwara K, Tsunei A, Kusabuka H, Ogaki E, Tachibana M, Okada N. Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells*. 2020;9(5).
276. Majzner RG, Rietberg SP, Sotillo E, Dong R, Vachharajani VT, Labanieh L, et al. Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov*. 2020;10(5):702-23.
277. Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal*. 2018;11(544).
278. Muller YD, Nguyen DP, Ferreira LMR, Ho P, Raffin C, Valencia RVB, et al. The CD28-Transmembrane Domain Mediates Chimeric Antigen Receptor Heterodimerization With CD28. *Front Immunol*. 2021;12:639818.
279. Rulander NJ, Cardamone D, Senior M, Snyder PJ, Master SR. Interference from anti-streptavidin antibody. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(8):1141-6.
280. Dahll LK, Haave EM, Dahl SR, Aas FE, Thorsby PM. Endogenous anti-streptavidin antibodies causing erroneous laboratory results more common than anticipated. *Scand J Clin Lab Invest*. 2021;81(2):92-103.
281. Aghajanian H, Rurik JG, Epstein JA. CAR-based therapies: opportunities for immuno-medicine beyond cancer. *Nat Metab*. 2022;4(2):163-9.
282. Mackensen A, Muller F, Mougiakakos D, Boltz S, Wilhelm A, Aigner M, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med*. 2022;28(10):2124-32.
283. Ruggeri RM, Barresi G, Sciacchitano S, Trimarchi F, Benvenga S, Trovato M. Immunoexpression of the CD30 ligand/CD30 and IL-6/IL-6R signals in thyroid autoimmune diseases. *Histol Histopathol*. 2006;21(3):249-56.

284. Oflazoglu E, Grewal IS, Gerber H. Targeting CD30/CD30L in oncology and autoimmune and inflammatory diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2009;647:174-85.
285. Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Muta H, Podack ER, et al. CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity. *J Autoimmun.* 2015;57:14-23.
286. Artinger K, Kirsch AH, Mooslechner AA, Cooper DJ, Aringer I, Schuller M, et al. Blockade of tumor necrosis factor superfamily members CD30 and OX40 abrogates disease activity in murine immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2021;100(2):336-48.
287. Dai Z, Li Q, Wang Y, Gao G, Diggs LS, Tellides G, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress allograft rejection mediated by memory CD8+ T cells via a CD30-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2004;113(2):310-7.
288. Matsushashi M, Nishida K, Sakamoto M, Gion Y, Yoshida A, Katsuyama T, et al. CD30-targeted therapy induces apoptosis of inflammatory cytokine-stimulated synovial fibroblasts and ameliorates collagen antibody-induced arthritis in mice. *Inflamm Res.* 2022;71(2):215-26.



# X. Anexos



## X.1 Anexo 1

Los resultados de esta tesis han sido presentados parcialmente en los siguientes congresos:

- ISCT 2022 San Francisco Annual Meeting by International Society for Cell & Gene Therapy. 04-07 May 2022, San Francisco, United States of America. “mSA2-Universal CAR regulatory T cells from thymus: a versatile approach for future immunotherapy”. Gallego-Valle; Pérez-Fernández; Martínez-Bonet; López-Esteban; Bernaldo-de-Quirós; Pita; Gil-Manso; Pérez-Caballero; Pardo; Gil-Jaurena; Correa-Rocha; Pion (Póster)
- 6º European Congress of Immunology, Eci2021, by The European Federation of Immunological Societies. 01-09 September 2021, Turkey. “mSA2-Universal CAR regulatory T cells from thymus: a versatile approach for future immunotherapy”. Gallego-Valle; Pérez-Fernández; Martínez-Bonet; López-Esteban; Bernaldo-de-Quirós; Pita; Gil-Manso; Pérez-Caballero; Pardo; Gil-Jaurena; Correa-Rocha; Pion (Comunicación oral)
- ISCT 2021 New Orleans Annual Meeting by International Society for Cell & Gene Therapy. 26-29 May 2021, New Orleans, United States of America. “mSA2-Universal CAR regulatory T cells from thymus: a versatile approach for future immunotherapy”. Gallego-Valle; Pérez-Fernández; Martínez-Bonet; López-Esteban; Bernaldo-de-Quirós; Pita; Gil-Manso; Pérez-Caballero; Pardo; Gil-Jaurena; Correa-Rocha; Pion (Póster)
- ISCT 2021 New Orleans Annual Meeting by International Society for Cell & Gene Therapy. 26-29 May 2021, New Orleans, United States of America. “TGF  $\beta$ 1 and IL 2 cytokines do not induce fully functional and stable regulatory T cells from activated thymocytes ex vivo”. Gallego-Valle; Pérez-Fernández; Martínez-Bonet; López-Esteban; Bernaldo-de-Quirós; Pita; Gil-Manso; Pérez-Caballero; Pardo; Gil-Jaurena; Correa-Rocha; Pion (Póster)

- 42 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología - SEI 2021 por la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA. 24-26 March 2021, Madrid, España. "Caracterización y funcionalidad de timocitos humanos modificados genéticamente para expresar FOXP3 mediante lentivectores.". Gil-Manso; Gallego-Valle; Pérez-Fernández; Martínez-Bonet; López-Esteban; Bernaldo-de-Quirós; Pita; Pérez-Caballero; Pardo; Gil-Jaurena; Correa-Rocha; Pion (Comunicación Oral)
- 42 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología - SEI 2021 por la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA. 24-26 March 2021, Madrid, España. "Las citoquinas TGF- $\beta$  e IL-2 no son suficientemente eficaces para inducir in vitro linfocitos T reguladores con capacidad supresora a partir de timocitos activados.". Gallego-Valle; Gil-Manso; Pérez-Fernández; Martínez-Bonet; López-Esteban; Bernaldo-de-Quirós; Pita; Pérez-Caballero; Pardo; Gil-Jaurena; Correa-Rocha; Pion (Comunicación Oral)



## Article

## Ectopic FOXP3 Expression in Combination with TGF- $\beta$ 1 and IL-2 Stimulation Generates Limited Suppressive Function in Human Primary Activated Thymocytes Ex Vivo

Jorge Gallego-Valle <sup>1</sup>, Sergio Gil-Manso <sup>1</sup>, Ana Pita <sup>2</sup>, Esther Bernaldo-de-Quirós <sup>1</sup>, Rocío López-Esteban <sup>1</sup>, Marta Martínez-Bonet <sup>1</sup>, Verónica Astrid Pérez-Fernández <sup>1</sup>, Ramón Pérez-Caballero <sup>2</sup>, Carlos Pardo <sup>2</sup>, Juan-Miguel Gil-Jaurena <sup>2</sup>, Rafael Correa-Rocha <sup>1</sup> and Marjorie Pion <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Immune-Regulation, Gregorio Marañón Health Research Institute (IISGM), Hospital General Gregorio Marañón, c/Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain; jorge.gallego@iisgm.com (J.G.-V.); sergio.gil.277@hotmail.es (S.G.-M.); esther.bernaldo@iisgm.com (E.B.-d.-Q.); rocio.lopez@iisgm.com (R.L.-E.); marta.mbonet@iisgm.com (M.M.-B.); veronica.perez@iisgm.com (V.A.P.-F.); rafael.correa@iisgm.com (R.C.-R.);  
<sup>2</sup> Pediatric Cardiac Surgery Unit (HGUGM), Hospital Materno Infantil del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, c/O'Donnell, 48, 28009 Madrid, Spain; anamaria.pita@salud.madrid.org (A.P.); ramon.perez-caballero@salud.madrid.org (R.P.-C.); carlosandres.pardo@salud.madrid.org (C.P.); juanmiguel.gil@salud.madrid.org (J.-M.G.-J.)  
 \* Correspondence: marjorie.pion@iisgm.com; Tel.: +34-6-6443-4402



**Citation:** Gallego-Valle, J.; Gil-Manso, S.; Pita, A.; Bernaldo-de-Quirós, E.; López-Esteban, R.; Martínez-Bonet, M.; Pérez-Fernández, V.A.; Pérez-Caballero, R.; Pardo, C.; Gil-Jaurena, J.-M.; et al. Ectopic FOXP3 Expression in Combination with TGF- $\beta$ 1 and IL-2 Stimulation Generates Limited Suppressive Function in Human Primary Activated Thymocytes Ex Vivo. *Biomedicines* **2021**, *9*, 461. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050461>

Academic Editor: Amedeo Amedei

Received: 31 March 2021

Accepted: 20 April 2021

Published: 23 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Regulatory T cells (Tregs), which are characterized by the expression of the transcription factor forkhead box P3 (FOXP3), are the main immune cells that induce tolerance and are regulators of immune homeostasis. Natural Treg cells (nTregs), described as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, are generated in the thymus via activation and cytokine signaling. Transforming growth factor beta type 1 (TGF- $\beta$ 1) is pivotal to the generation of the nTreg lineage, its maintenance in the thymus, and to generating induced Treg cells (iTregs) in the periphery or in vitro arising from conventional T cells (Tconvs). Here, we tested whether TGF- $\beta$ 1 treatment, associated with interleukin-2 (IL-2) and CD3/CD28 stimulation, could generate functional Treg-like cells from human thymocytes in vitro, as it does from Tconvs. Additionally, we genetically manipulated the cells for ectopic FOXP3 expression, along with the TGF- $\beta$ 1 treatment. We demonstrated that TGF- $\beta$ 1 and ectopic FOXP3, combined with IL-2 and through CD3/CD28 activation, transformed human thymocytes into cells that expressed high levels of Treg-associated markers. However, these cells also presented a lack of homogeneous suppressive function and an unstable proinflammatory cytokine profile. Therefore, thymocyte-derived cells, activated with the same stimuli as Tconvs, were not an appropriate alternative for inducing cells with a Treg-like phenotype and function.

**Keywords:** human thymocytes; regulatory T cells; FOXP3; engineering cells

### 1. Introduction

Natural regulatory T cells (nTregs), derived from the thymus, are known to be essential for maintaining immune homeostasis, inducing tolerance, preventing inappropriate responses to commensal organisms, and dampening effector T cell responses following immune activation [1]. A reduction in their absolute number or frequency or an impairment of their function can trigger autoimmune, infectious, or allergy-associated diseases [2]. Due to their ability to control dysregulated immune responses, Tregs from the periphery have been used in clinical trials of patients with autoimmune diseases [3–5] or graft-versus-host diseases [6]. These trials have shown that Treg infusions are safe but rarely successful. This low success rate might be attributed to the fact that nTregs make up less than 10% of the total CD4<sup>+</sup> T helper cells in the peripheral blood circulation and must be expanded in vitro to obtain the number of cells needed to treat a patient [7]. This leads to another limitation: this expansion worsens the functional efficiency of the nTregs [8], which rapidly

become exhausted and therefore exhibit a reduced suppressive function. To overcome the issues of the limited number of nTregs that can be isolated from the periphery and their subsequent expansion, conventional CD4<sup>+</sup> T cells (Tconvs) from peripheral blood have been stimulated in the presence of transforming growth factor beta type 1 (TGF- $\beta$ -1) [8–11] or genetically modified to express exogenous FOXP3 to induce functional iTregs [12–14]. This latter approach generated many Tregs with stable FOXP3 expression, which could not be controlled by FOXP3 promoter regions and their epigenetic modifications, ensuring their stability [15,16].

Despite the above-mentioned advances, iTregs exhibit cellular plasticity [17,18]. Peripheral nTregs or iTregs derived from Tconvs can lose their FOXP3 expression—acquiring a CD4<sup>+</sup> memory effector phenotype—and therefore produce IL-17A under proinflammatory microenvironments [19–21]. Therefore, even though these approaches generate high numbers of functional iTregs, they still present several limitations, such as age-associated Treg cellular exhaustion [22] and cellular instability [23]. The Treg lineage appears in the pediatric thymus, from which it migrates to the periphery. Recently, Dijke et al. presented the pediatric thymus as an alternative source of therapeutic naïve thymic Treg cells (tTregs) [24]. There are two types of Treg progenitors found in the thymus: CD25<sup>neg</sup>FOXP3<sup>neg</sup> and CD25<sup>neg</sup>FOXP3<sup>low</sup>. Both progenitors can differentiate into Tregs (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) under IL-2 stimulation in vivo and in vitro [25]. The thymus microenvironment guarantees sustained FOXP3 expression, which generates a broadly functional nTreg repertoire from Treg progenitors [26,27]. TGF- $\beta$ 1 is essential in this process [8], as are other factors, such as IL-7 or IL-15 [28,29]. Human tTregs present remarkable purity, high epigenetic stability, and a robust suppressive function [24,30]. Moreover, their phenotype is highly naïve, and it has been observed that induced Tregs from the periphery had higher stability and functionality when generated from naïve cells instead of the total Tconvs from peripheral blood [3,21,31]. Therefore, tTregs should be highly relevant in future immunotherapies.

However, tTregs comprise around 1% of the total cells from the thymus [25]. Therefore, we tested if a high percentage of the CD25-negative fraction (CD25<sup>neg</sup>) of primary human thymocytes could be induced toward functional Tregs in vitro using TGF- $\beta$ 1 stimulation and the ectopic expression of the FOXP3 transcription factor, since both elements have been previously described to generate iTregs from peripheral Tconvs. First, we demonstrated that a CD25<sup>neg</sup> subset stimulated by IL-2, TGF- $\beta$ 1, and CD3/CD28 could express high Treg-associated markers but showed a lack of a homogeneous suppressive function. Then, FOXP3-transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> thymocytes, along with TGF- $\beta$ 1 stimulation, were also able to express a high level of FOXP3 without reaching the functionality of nTregs. In addition, in all the stimulated conditions, the exogenous FOXP3 expression and Treg-associated markers in cells were reduced as the culture time increased, and cells produced proinflammatory cytokines showing a differential profile regarding nTregs. These results indicated that TGF- $\beta$ 1 stimulation and high FOXP3 expression might not be sufficient to convert undifferentiated thymocytes into iTregs. Hence, thymic CD25<sup>neg</sup> cells do not constitute a viable alternative source of iTregs under these culture conditions.

## 2. Methods

### 2.1. Patient Samples

Pediatric thymic tissues were obtained from 18 children (13 males and 5 females) from 4 days to 6.3 years old (mean = 385.9 days; median = 138 days). Written, informed consent for study participation was obtained from the parents or guardians of all the individuals. The Pediatric Cardiology Unit enrolled all the pediatric individuals under a protocol accepted by the clinical ethics committee of the Gregorio Marañón Hospital (reference number THYTECH1-2018-005/CIRSCAR-ThyTREG18) according to the principles described in the Declaration of Helsinki (2013). These patients were undergoing corrective cardiac surgery due to different heart pathologies in the Infantile Cardiac Surgery Unit at Gregorio Marañón General University Hospital. The entire thymus is routinely removed

to release the surgical field during cardiac surgery, and it is discarded. The children had no known immunological or genetic abnormalities.

### 2.2. Regulatory T Cell Isolation from Thymic Tissue

Thymocytes were obtained by the mechanic disruption of the thymus tissue from pediatric patients using a gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (CD25<sup>+</sup>) and CD25-negative T cells (CD25<sup>neg</sup>) were purified using CD25 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) from the total thymocytes. The purity of the CD25<sup>+</sup> was better than 70%, and that of CD25<sup>neg</sup> was better than 95% ( $74.29 \pm 2.52\%$  and  $96.69 \pm 0.43\%$ , mean  $\pm$  SEM, respectively; S4 in Supplementary Materials). From the CD25<sup>neg</sup> fraction, the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>+</sup> and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fractions were isolated using CD8 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's protocol. CD25<sup>+</sup> and all the CD25<sup>neg</sup> fractions were cultured with an X-vivo15 medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 5% AB human serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and a 1% mix of antibiotics (125  $\mu$ g/mL ampicillin, 125  $\mu$ g/mL cloxacillin, and 40  $\mu$ g/mL gentamicin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 2.3. Isolation of Peripheral Naïve nTregs

Naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> (Tconv) and naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (nTregs) were freshly isolated from buffy coats using a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Germany). The cells were cultured with an X-vivo15 medium supplemented with 5% AB human serum and a 1% mix of antibiotics (125  $\mu$ g/mL ampicillin, 125  $\mu$ g/mL cloxacillin, and 40  $\mu$ g/mL gentamicin).

### 2.4. Lentiviral Vector Production

The psPAX2 and pMD2.G plasmids (both plasmids were a gift from Prof. Dr. Trono, Addgene, Watertown, MA, USA) were used with pMSCV-FOXP3-EF1 $\alpha$ -GFP-T2A-Puro (MSCV-FOXP3, SBI System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) or the same plasmid without the FOXP3 sequence (MSCV- $\Delta$ FOXP3). MSCV- $\Delta$ FOXP3 was created using the restriction enzymes EcoRI and NotI from the original MSCV-FOXP3 sequence, and it was used as the negative control. Lentiviral vectors were produced by the co-transfection of 293T cells (ATCC, LGC Standards S.L.U., Barcelona, Spain) with MSCV-FOXP3 (or MSCV- $\Delta$ FOXP3), psPAX2, and pMD2.G using a calcium phosphate transfection kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The physical titers of the vectors were evaluated after 0.45  $\mu$ m filtration (Corning, Corning, NY, USA) by quantifying HIV-1-p24<sup>gag</sup> with an ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK). The MSCV-FOXP3 and MSCV- $\Delta$ FOXP3 vectors both encoded GFP (the transduced cells could be assessed by flow cytometry) and a selectable marker for puromycin resistance.

### 2.5. Cell Culture of TGF- $\beta$ 1-Stimulated Cells

Natural Treg cells, peripheral naïve CD25<sup>neg</sup> cells, thymus-derived CD25<sup>+</sup>, and CD25<sup>neg</sup> cells were stimulated with Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Dynabeads, Life Technologies AS, Norway) for 72 h. Then, the Dynabeads were removed, and the cells were cultured for another 7 days. Throughout this process, the cells were cultured with 600 U/mL of IL-2 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany), and half of the CD25<sup>neg</sup> cells were stimulated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL, ImmunoTools, Friesoythe, Germany). The culture medium and cytokines were replaced every two days. The CD25<sup>+</sup> cells were used as a positive control for the Treg phenotype and functional and stability assays [24].

### 2.6. Cell Culture of FOXP3-Transduced Stimulated Cells

CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> cells were stimulated with Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28. Then, 24 h after activation, the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> cells were transduced with

lentiviral vectors at a multiplicity of infection of two, resulting in two CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> conditions (i.e., CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>FOXP3 and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>ΔFOXP3). Then, 72 h post-activation, the Dynabeads were removed, and the cells were extensively washed and then cultured with puromycin (2.5 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for another 3 days. Throughout this process the cells were cultured with 600 U/mL of IL-2 and TGF-β1 (10 ng/mL). The culture medium and cytokines were replaced every two days.

#### 2.7. Phenotype Analysis by Flow Cytometry and FOXP3 Western Blotting

The transduced cells were assessed on Days 3, 7, and 14 for GFP expression and viability using 7-aminoactinomycin D (7AAD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). FOXP3-transduced and TGF-β1-stimulated cells were stained on Days 0, 3, 7, and 10 or 14 post-culture to define their phenotypes, assessing their surface and intracellular markers by flow cytometry. Briefly, the cells were surface stained and stained with Fixable Viability Dye-eFluor450 (eBioscience, San Diego, CA, USA) to differentiate living and dead cells. Then, the cells were fixed or permeabilized using a FOXP3 transcription factor staining kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) for intracellular staining. All the antibodies are listed in Table S1. Then, the cells were analyzed by flow cytometry using a Gallios cytometer (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland), and the data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland). Protein localization was assessed by western blots using anti-human Foxp3 mAb PCH101 antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA), Actin antibodies Clone AC-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and Lamin Monoclonal Ab mab636 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

#### 2.8. Proliferation and Suppression Assay and Stability of the Cells in the Suppression Assay

Allogeneic CellTrace Violet (CTVio, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)-labeled PBMCs were co-cultured with CD25<sup>neg</sup> fraction (both with and without TGF-β1 treatment), CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> (transduced or non-transduced conditions and with TGF-β1 stimulation), or CD25<sup>+</sup> cells at ratios of 2:1, 1:1, and 1:2 of suppressor cells/CTVio target cells, respectively. Each condition except the negative control of proliferation was stimulated with Dynabeads (Life Technologies) supplemented with 60 U/mL of IL-2 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany). After 72 h, the cells were surface stained and stained with 0.5 µg/mL of 7AAD to differentiate living and dead cells. All the antibodies are listed in Table S1. Using the CTVio signals, the proliferation of the allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells was analyzed by assessing the reduction in the proliferation dye (CTVio) by flow cytometry. To calculate the percentage of suppression of proliferation, the division index method was used as previously described in [32]. To determine the phenotypic stability of the thymocyte-derived cells used in the suppressive assay, the cells were analyzed before and after the assay. The cells were surface stained and stained with Fixable Viability Dye-eFluor450 (eBioscience, San Diego, CA, USA) to differentiate living and dead cells, and then the cells were fixed or permeabilized using the FOXP3 transcription factor staining kit for intracellular staining. All the antibodies are listed in Table S1.

#### 2.9. Stability Assay in the Proinflammatory Environment for TGF-β1-Stimulated Cells

On Day 7, the phenotypic stability of CD25<sup>neg</sup> (with or without TGF-β1 stimulation) and CD25<sup>+</sup> cells was evaluated by culturing them under proinflammatory conditions. Each cell subset was tested with Th1 and Th17 polarizing conditions, using IL-12 (10 ng/mL) for the Th1 and IL-1β, IL-6, IL-23 (10 ng/mL each), and tumor necrosis factor (TNF)-α (20 ng/mL) for Th17 (all cytokines were from ImmunoTools, Friesoythe, Germany) [33]. Moreover, a non-treated (NT) condition for each cell subset without proinflammatory cytokines was also established as the negative control. The cells were restimulated with Dynabeads supplemented with 600 U/mL of IL-2. After 72 h, the supernatant was collected, and the Dynabeads were removed. The cells were cultured again with the corresponding cytokines for an additional 72 h. After this culture time, the cells were stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) +

Ionomycin (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5.5 h and brefeldin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) during the last 2 h of incubation. Then, the cells were washed, surface stained, stained for viable cells with Fixable Viability Dye eFluor450, fixed or permeabilized (FOXP3 transcription factor staining kit, eBioscience, San Diego, CA, USA), and stained for intracellular cytokines. All the antibodies are listed in Table S1.

#### 2.10. Anti-Inflammatory and Proinflammatory Profile Analysis on FOXP3-Transduced Cells

To determine their cytokine production, on Days 7 and 14, the transduced CD25<sup>neg</sup> CD8<sup>neg</sup> were stimulated with PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) for 5.5 h and brefeldin A (10 µg/mL) during the last 2 h of incubation. Then, the cells were washed, surface stained, stained for viability with Fixable Viability Dye eFluor450, fixed or permeabilized (FOXP3 transcription factor staining kit, eBioscience, San Diego, CA, USA), and stained for intracellular cytokines. All the antibodies are listed in Table S1.

### 3. Statistical Analysis

The results are expressed as the mean ± SEM. The statistical comparisons of the phenotype and of the suppressive function by the reduction in the CTVio signal between CD25<sup>neg</sup> (treated or non-treated with TGF-β1), CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>, and CD25<sup>+</sup> were performed using one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Bonferroni correction for multiple tests. The expression markers' statistical comparisons before and after the suppression assay were performed using the nonparametric Mann–Whitney U test. The statistical associations between variables were calculated by linear regression and Spearman rank correlation analysis, where *p*-values < 0.05 were considered to be statistically significant. All the analyses and graphical displays were performed with GraphPad Prism (v.7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

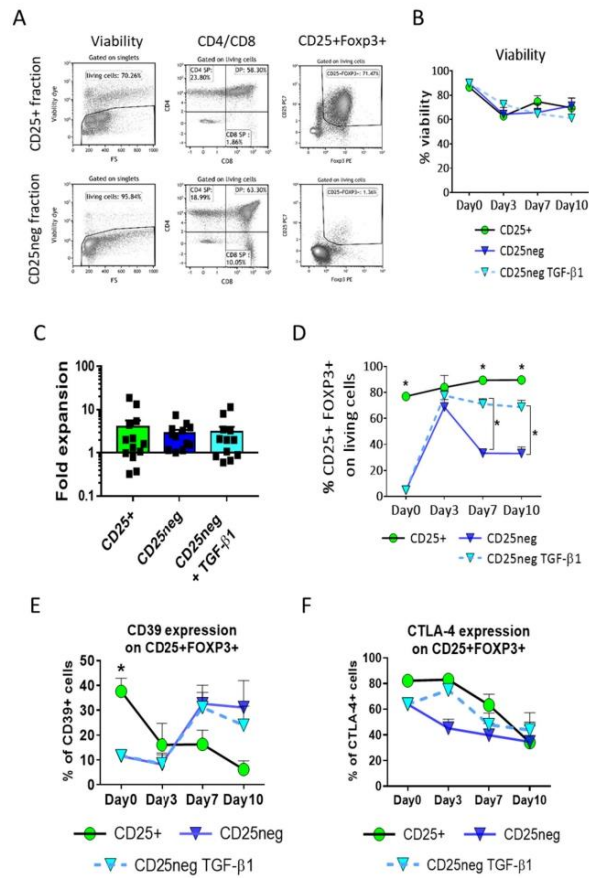
### 4. Results

#### 4.1. Viability and Phenotype of Thymocyte-Derived Cells

To study the possibility of generating human Tregs from thymocytes, we first collected thymocytes from the thymus and then isolated CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>neg</sup> fractions. As CD25<sup>+</sup> thymocytes from the thymus have previously been described as tTregs, this fraction was considered to be our positive control for studying Treg phenotype, function, and stability [25].

On the day of cell isolation, most of the CD25<sup>neg</sup> fraction was CD4/CD8 double-positive (DP) and showed a low frequency of CD25 or FOXP3 expression. The phenotype of the CD25<sup>+</sup> fraction was predominately CD4 simple positive (CD4SP), CD25<sup>+</sup>, and FOXP3<sup>+</sup> (Figure 1A). Both fractions showed low CD8 simple positive (CD8SP) frequencies (Figure 1A). We examined the cell cultures on Days 3, 7, and 10 post-culture and observed no significant differences in viability (Figure 1B) or cellular proliferation (Figure 1C) among any of the conditions. The CD25<sup>+</sup> subset proliferated with an average of fourfold expansion ( $4.06 \pm 1.57$ , mean fold expansion ± SEM) in contrast to the CD25<sup>neg</sup> subset, either non-treated or TGF-β1-treated ( $2.90 \pm 0.54$  and  $3.00 \pm 0.98$ , mean fold expansion ± SEM, respectively) (Figure 1C).

The CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset phenotype was analyzed. A significant increase in the frequency of the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset in the CD25<sup>neg</sup> fractions could be observed on the third day after activation. The untreated cells only presented transitory CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> expression, with a peak in expression on Day 3 post-culture, undoubtedly due to cellular activation (Figure 1D and Figure S1 in Supplementary Materials). Conversely, the sustained expression of CD25 and FOXP3 over the 10 days was only observed in the TGF-β1-treated condition (Figure 1D and Figure S1), but was slightly lower in the TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> than in the CD25<sup>+</sup> fraction on Days 7 and 10 of culture ( $70.69 \pm 5.88\%$  for the TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> subset and  $89.62 \pm 3.35\%$  for the CD25<sup>+</sup> subset on Day 10 of culture, mean ± SEM, *p* = 0.0016, Figure 1D).



**Figure 1.** Viability and phenotype after cell isolation and throughout the cell culture. CD25<sup>+</sup> and CD25-negative (CD25<sup>neg</sup>) fractions are the positive and negative fractions of CD25<sup>+</sup> selection from the thymocytes. The viability and phenotype of each fraction were analyzed by flow cytometry. (A) Dot plots represent the percentage of viability, CD4/CD8 subsets, and CD25/FOXP3 surface labeling of each fraction on the day of cell isolation. Dot plots belong to one representative experiment from 14 samples. (CD4SP, CD4<sup>+</sup> simple positive cells; CD8SP, CD8<sup>+</sup> simple positive cells; and DP, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> double positive cells). (B) Evolution of average percentages of viable cells throughout 10 days of culture. (C) Fold expansion of the cells between Days 3 and 7 of culture. Each symbol corresponds to an individual. (D) Evolution of average percentages of cells with the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> phenotype gated on living cells throughout 10 days of culture. (E) Evolution of the average percentages of the CD39 marker on CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset throughout 10 days of culture. (F) Evolution of the average percentages of the CTLA-4 marker on the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset throughout 10 days of culture. The mean + SEM of 14 independent experiments in each condition is shown. \* Significant difference when  $p < 0.05$ . A \* above each point condition represents a significant difference for this condition against CD25<sup>+</sup>. A lateral \* with connection lines represents significant differences between TGF-β1-treated and untreated conditions for each fraction.

Additionally, we analyzed if these treated thymocyte-derived cells might express CD39 or CTLA-4, which are directly associated with FOXP3 expression in nTregs and participate in Tregs' suppressive function [34,35]. On the day of cell isolation, the expression of CD39 gated on the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset was significantly different between the CD25<sup>+</sup> fraction ( $37.64 \pm 5.31\%$ , mean  $\pm$  SEM) and the other conditions (CD25<sup>neg</sup>,  $11.54 \pm 2.24\%$  and TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>,  $11.69 \pm 2.29\%$ , mean  $\pm$  SEM, Figure 1E). On the one hand, the CD39 expression in the CD25<sup>neg</sup> condition was surprisingly increased as the culture time increased, regardless of whether the cells were treated or not with TGF- $\beta$ 1, while its expression was decreased in the CD25<sup>+</sup> fraction (Figure 1E). On the other hand, CTLA-4 was highly expressed in all the conditions on the isolation day (Figure 1F), with a peak in expression on Day 3 post-culture in the CD25<sup>+</sup> fraction ( $82.95 \pm 3.43\%$ ) and TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> ( $74.81 \pm 4.83\%$ , mean  $\pm$  SEM, Figure 1F). Its expression decreased as the culture time increased (CD25<sup>+</sup>,  $34.10 \pm 15.98\%$ , and TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>,  $43.75 \pm 13.53\%$  on Day 10 post-culture, mean  $\pm$  SEM, Figure 1F).

It has been previously described that TGF- $\beta$ 1 increases the FOXP3 expression and decreases the proliferation of peripheral naive Tconv cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>), generating iTregs in the periphery [11]. To verify that TGF- $\beta$ 1 acted equally, we treated the activated-peripheral naive Tconvs with IL-2 and TGF- $\beta$ 1 as controls (Figure S2A). As expected, the TGF- $\beta$ 1 treatment induced FOXP3 expression in Tconvs (Figure S2A,B) in comparison to untreated Tconvs without reaching the same level as in nTregs (CD25<sup>+</sup> subset). Moreover, the TGF- $\beta$ 1-treated cells presented a slightly lower proliferation than their untreated counterparts, showing that TGF- $\beta$ 1 treatment modified peripheral Tconvs as previously described (Figure S2C).

Therefore, primary human thymocyte-derived cells, when duly stimulated, could be kept in culture for at least 10 days, and TGF- $\beta$ 1 stimulation induced a high and stable expression of CD25, FOXP3, and CTLA-4 as well as the acquisition of the CD39 marker in the CD25<sup>neg</sup> subset, as observed in peripheral iTregs.

#### 4.2. TGF- $\beta$ 1 Treatment Did Not Induce a Robust Suppressive Function in CD25<sup>neg</sup> Cells

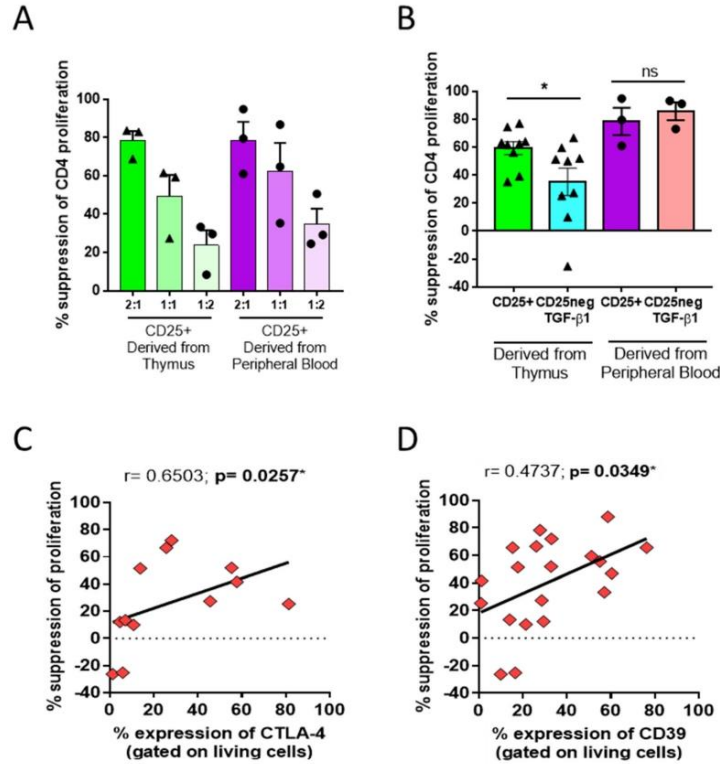
Since the TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> fractions acquired a regulatory-like phenotype constituted of CD25, FOXP3, CTLA-4, and CD39 expression, we studied whether these cells could have developed a suppressive function. Hence, we analyzed the suppressive capacity of the cells on Day 7 post-culture by measuring their ability to block the proliferation of CellTrace Violet (CTVio) cells (allogeneic peripheral blood mononuclear cell (PBMC), Figure S3).

The thymus-derived CD25<sup>+</sup> subset limited CD4 CTVio cell proliferation in a dose-dependent manner (Figure 2A). This suppression was similar to that observed in the suppressive assay with nTregs isolated from peripheral blood (Figure 2A). As a control, we showed that naive TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> Tconvs could limit allogeneic CD4 proliferation in a manner similar to that observed for nTregs (Figure 2B). However, TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> derived from the thymus could only partially limit the proliferation of target cells, and this suppressive function was heterogeneous (Figure 2B). A positive correlation between the frequency of CTLA-4 and CD39 expression and the suppressive function was observed in the thymus-derived cells (CD25<sup>neg</sup> and CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1) ( $p = 0.0257$  and  $p = 0.0349$ , respectively, Figure 2C,D). Therefore, even though TGF- $\beta$ 1 induced strong FOXP3 expression, thymus-derived CD25<sup>neg</sup> cells could not acquire a suppressive function similar to that observed from Tconvs, and the suppressive ability was correlated with CTLA-4 and CD39 expression.

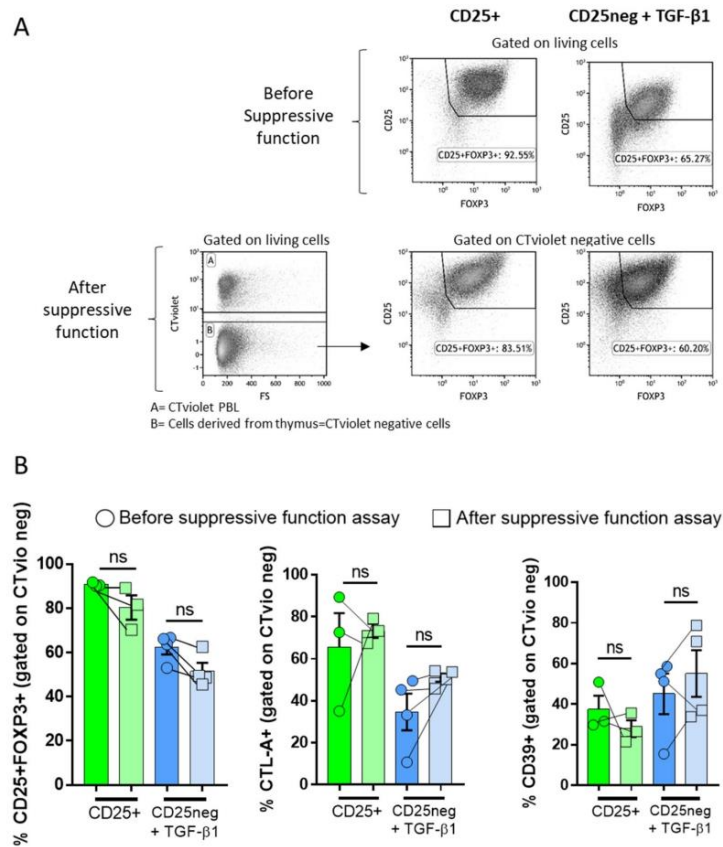
#### 4.3. Cellular Stability in the Suppressive Assay

We observed a heterogeneous suppressive ability for TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> derived from the thymus, which could be linked to phenotypic instability. Therefore, we checked the Treg-associated cellular markers before and after the suppressive assay (Figure 3A). In the co-culture suppressive assay, the cells derived from the thymus were negative for

the CTVio signal. Although CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> expression was slightly decreasing at the end of the suppression assay in the CD25<sup>+</sup> subset, it was still higher than in the TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> condition (Figure 3B). On the contrary, the expression of the CD39 and CTLA-4 markers was unchanged in both subsets (Figure 3B). Therefore, the lack of a stable suppressive function of the treated CD25<sup>neg</sup> cells could not be explained by an unstable expression of suppressive markers during the three days of the co-culture suppressive assay, since no changes in the cell markers were observed.



**Figure 2.** Suppression of CellTrace Violet (CTVio) allogeneic PBMC proliferation by peripheral and thymus-derived cells. (A) Percentage of suppression of proliferation of CD4<sup>+</sup> CTVio cells after co-culture with CD25<sup>+</sup> or peripheral CD25<sup>+</sup> (nTregs) for 7 days, with different ratios of effector cells/CTVio cells. The percentage of suppression was calculated following the division index method. Each symbol corresponds to an individual. (B) Percentage of suppression of proliferation of CD4<sup>+</sup> CTVio cells after co-culture with CD25<sup>+</sup> and TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> derived from the thymus or peripheral blood. Negative values correspond to an increase in proliferation. Each symbol corresponds to an individual. \* represents a significant difference for the condition compared to CD25<sup>+</sup>, and ns means non-significant. (C) Correlation and linear regression (black line) between the percentage of suppression of CD4<sup>+</sup> CTVio cells and percentage of CTLA-4 (on CD25<sup>neg</sup> and TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup>, gated on living cells). (D) Correlation and linear regression (black line) between the percentage of suppression of CD4<sup>+</sup> CTVio cells and percentage of CD39<sup>+</sup> cells (on CD25<sup>neg</sup> and TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup>, gated on living cells). Each symbol corresponds to an individual. Correlations were determined by Spearman’s rank correlation, and *r* is the Spearman correlation coefficient. \* *p* < 0.05 was considered to be statistically significant.



**Figure 3.** Cell phenotype before and after the suppressive assay. After 7 days of culture, CD25<sup>+</sup> and TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> (effector cells) were co-cultured with CTVio allogenic PBMCs for 3 days, with an effector cell/CTVio cell ratio of 2:1. (A) The top panels show dot plots that represent the percentage of CD25/FOXP3 surface markers of each fraction on the day of the suppressive assay setup. The lower panels show dot plots that represent the gating strategy used after the suppressive assay, which mixed thymus-derived cells and CTVio cells. To analyze the thymus-derived cell surface markers, cells were gated on CTVio-negative cells. The dot plots are from a single representative experiment of 3–4 experiments. (B) Bar graph representing the frequency of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (left), CTLA-4<sup>+</sup> (middle), and CD39<sup>+</sup> (right) gated on living CTVio-negative cells before and after the suppressive assay throughout Day 3 of co-culture. Each symbol corresponds to an individual. And ns means non-significant.

#### 4.4. Ectopic Expression of FOXP3 in CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>-Derived Thymus Cells

The CD4SP subset represented most of the cells in all the cell culture conditions, and its proportion increased as the culture time increased, especially in the CD25<sup>neg</sup> fractions (Figure S4A). However, we observed notable frequencies of CD8SP and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> double-positive cells (DP) (21.55 ± 2.88% and 10.52 ± 1.64%, respectively, mean ± SEM) in the TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> subset on Day 10 post-culture, which might explain the lack of solid suppressive function acquisition (Figure S4B,C). Therefore, to reduce the frequencies of CD8SP and DP that could influence the functionality of the stimu-

lated CD25<sup>neg</sup>, we isolated the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fraction, and then CD8SP represented 4.63 ± 1.39% (mean ± SEM) of the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> subset (Table 1).

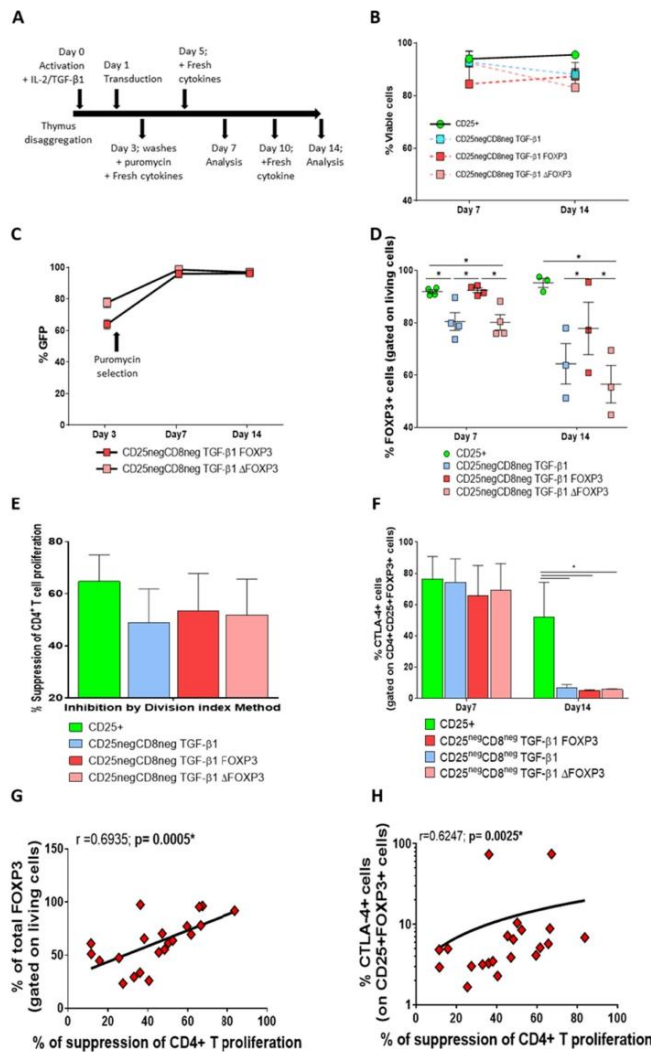
**Table 1.** Frequencies of viability and cellular markers on the day of cell isolation. Frequencies of living cells, CD4 simple positive (SP), CD8SP, Treg (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> gated on CD4 SP), CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (gated on living cells), CTLA-4 (gated on CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), and CD39 (gated on CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) were obtained by flow cytometry analysis on the three different subsets obtained the day of thymus-derived cell isolation (total thymocytes, CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fractions). The CD25<sup>+</sup> subset represents the tTregs. The means between the CD25<sup>+</sup> and thymocyte values and between the CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> values are compared, where  $p < 0.05$  is considered to be significant when comparing conditions. <sup>(a)</sup> Frequency, mean ± SEM. <sup>(b)</sup> The statistical comparisons between conditions were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

	Cellular Subsets Analyzed <sup>(a)</sup>			Statistic Comparison <sup>(b)</sup>	
	Total Thymocytes (%)	CD25 <sup>+</sup> Subset (%)	CD25 <sup>neg</sup> CD8 <sup>neg</sup> Subset (%)	$p$ CD25 <sup>+</sup> vs. Thymocytes	$p$ CD25 <sup>+</sup> vs. CD25 <sup>neg</sup> CD8 <sup>neg</sup>
Living cells	69.81 ± 4.99	83.22 ± 2.29	81.86 ± 3.40	0.1494	>0.999
CD4 SP	37.51 ± 4.44	69.62 ± 2.47	59.97 ± 6.41	0.0010	>0.999
CD8 SP	12.76 ± 2.47	2.67 ± 0.65	4.63 ± 1.39	0.0643	0.6858
tTreg (CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> )	11.59 ± 0.91	82.38 ± 2.69	4.18 ± 0.96	0.0002	0.0001
CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	5.38 ± 0.30	77.44 ± 3.74	2.65 ± 0.46	0.0004	0.0004
CTLA-4	64.96 ± 5.86	77.87 ± 3.47	56.83 ± 9.03	0.1863	0.2215
CD39	23.39 ± 3.88	36.70 ± 7.96	11.13 ± 2.19	0.5334	0.2803

With this CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fraction, we tried to stabilize FOXP3 expression by transducing this subset with MSCV-FOXP3 or MSCV-ΔFOXP3 in combination with IL-2 and TGF-β1 and CD3/CD28 stimulation, as depicted in Figure 4A. The cells were followed over 14 days of culture, with more than 60% of cell viability in all conditions (Figure 4B and Figure S5A).

We determined the frequencies of the transduced cells by GFP expression, since the FOXP3-expressing vector also codes for GFP (Figure S5B). On Day 7 and after puromycin treatment, almost all the cells were efficiently expressing GFP (97.60 ± 1.16% for CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>FOXP3 and 98.61 ± 0.41% for CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>ΔFOXP3, mean ± SEM, Figure 4C and Figure S5B).

As expected, the CD25<sup>+</sup> fraction presented high levels of FOXP3 (Figure 4D and Figure S5C), and endogenous and exogenous FOXP3 protein were found in the nucleus in the CD25<sup>+</sup> and transduced cells, where it carried out its function (Figure S5D). On Day 7 post-culture, the FOXP3 levels observed in CD25<sup>+</sup> were similar to those in the TGF-β1-treated, FOXP3-transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> cells (91.88 ± 0.70% and 92.39 ± 0.89%, respectively, mean ± SEM, Figure 4D). On Day 14 post-culture, the TGF-β1-treated, FOXP3-transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> subsets still expressed FOXP3 at a high level (77.83 ± 9.99%, mean ± SEM), but did not exhibit the homogeneous FOXP3 levels observed in the CD25<sup>+</sup> fraction (95.21 ± 1.71%, mean ± SEM). Therefore, a reduction in FOXP3 expression as the culture time increased was observed, although 96.24 ± 1.16% (mean ± SEM) of the TGF-β1-treated, FOXP3-transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> cells expressed GFP on Day 14 post-transduction (Figure 4C). In summary, thymocyte-derived cells could be transduced with lentiviral vectors efficiently without affecting their viability, but ectopic FOXP3 expression was slightly reduced and was believed to be unstable as the culture time increased.



**Figure 4.** Viability and functionality of the efficiently FOXP3-transduced thymocytes. (A) Schematic representation of the experimental protocol, from thymus disaggregation to Days 0–14. The arrows indicate the day and procedure performed at each step. (B) The percentage of viable cells for each condition was determined on Days 7 and 14 post-culture by flow cytometry (mean ± SEM of 3–4 independent experiments). (C) Analysis of frequencies of transduced cells by flow cytometry after transduction with a vector encoding FOXP3, green fluorescent protein (GFP), and puromycin sequences (mean ± SEM of four independent experiments). The arrow represents the moment of puromycin treatment. (D) Percentage

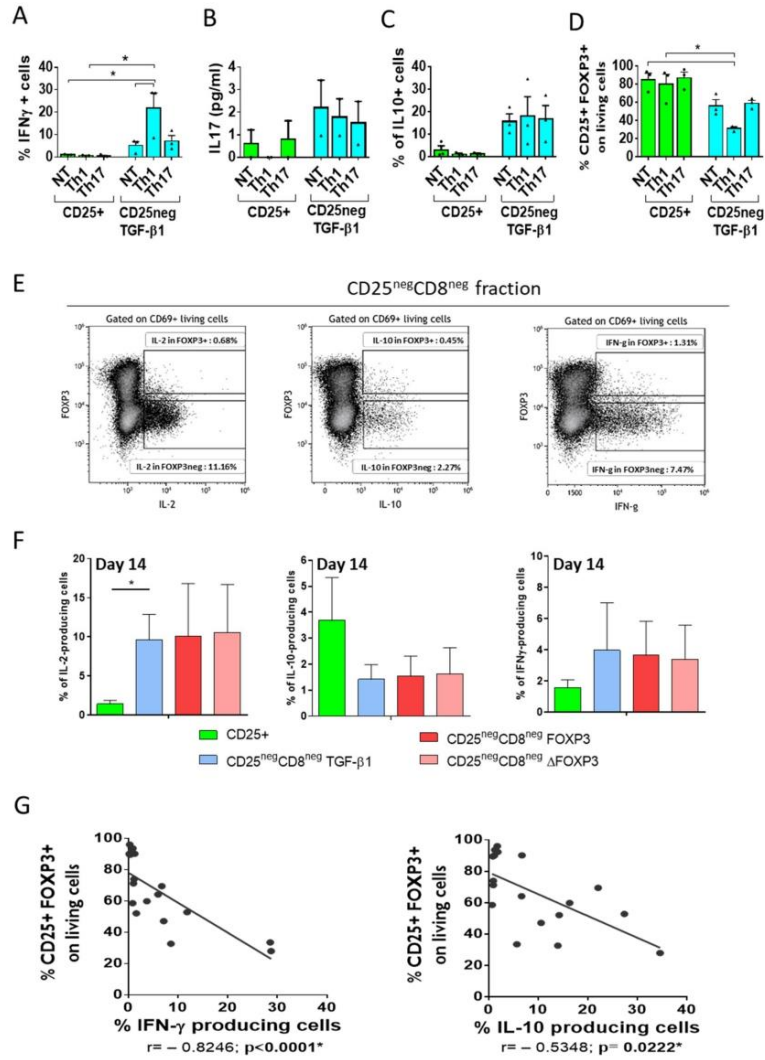
of cells expressing intracellular FOXP3, gated on living cells, determined by flow cytometry on Days 7 and 14 post-culture (mean  $\pm$  SEM of 3–4 independent experiments). (E) Percentage of suppression of CD4<sup>+</sup> CTVio target cell proliferation, calculated by using the division index method (mean  $\pm$  SEM of three independent experiments). (F) Bar graph of CTLA-4 expression on the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset on Days 7 and 14 post-culture by flow cytometry (mean  $\pm$  SEM of four independent experiments). \*  $p < 0.05$  was considered to be significant when comparing conditions. (G) Correlation between the frequency of suppression of CD4<sup>+</sup> T CTVio cell proliferation and frequency of total FOXP3<sup>+</sup> cells (gated on living cells). (H) Correlation between the frequency of suppression of the CD4<sup>+</sup> T CTVio cell proliferation frequency of CTLA-4<sup>+</sup> (gated on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>). Correlations were determined by Spearman's rank correlation and considered to be statistically significant, \* when  $p < 0.05$ . Each symbol corresponds to an individual.

We tested whether the overexpression of FOXP3 in the TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> subset could generate cells with a stable suppressive ability. Stimulated transduced or non-transduced TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> subsets showed a basal suppressive ability over CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, but this suppressive ability was lower than that for the CD25<sup>+</sup> subset (Figure 4E). Interestingly, no significant differences were observed in the suppressive function between the FOXP3- and  $\Delta$ FOXP3-transduced, TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> conditions, showing that the overexpression of exogenous FOXP3 did not induce a better suppressive ability (Figure 4E). We followed the CTLA-4 expression over the culture time, clearly observing high CTLA-4 expression gated on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> in all the conditions at Day 7 post-culture (Figure 4F). However, this expression was significantly reduced after 14 days of culture in all the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> conditions compared with the CD25<sup>+</sup> subset (Figure 4F). Moreover, we found a positive correlation between the frequencies of suppression of CD4<sup>+</sup> CTVio cell proliferation and the frequencies of the total FOXP3<sup>+</sup>-expressing cells (Figure 4G), as well as with the frequency of the CTLA-4<sup>+</sup>-expressing cells (Figure 4H), when analyzing all the conditions (CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1, transduced or non-transduced, Figure 4H).

Therefore, the ectopic expression of FOXP3 in primary thymic TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> cells is feasible with high viability. However, the induced FOXP3 and CTLA-4 expression, which were reduced as the culture time increased, did not generate a robust and homogeneous suppressive function.

#### 4.5. TGF- $\beta$ 1-Stimulated Cells Produced Higher Levels of Anti-Inflammatory and Proinflammatory Cytokines Than the CD25<sup>+</sup> Subset

One of the most valuable nTreg features demonstrated regarding their use in immunotherapy is their stability under inflammatory conditions [5,36]. Due to the phenotypic instability of the stimulated cells, we examined transduced and non-transduced TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> stability under inflammatory environments. The CD25<sup>+</sup> fraction restimulated under Th1- or Th17-polarizing conditions showed almost no IFN- $\gamma$ - or IL-10-producing cells and no secretion of IL-17 compared with the non-treated (NT) condition. Therefore, tTregs were not susceptible to change under proinflammatory conditions, as expected (Figure 5A). Conversely, the TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> showed a significant increase in the frequencies of IFN- $\gamma$ -producing cells in the Th1-polarizing condition compared with the CD25<sup>+</sup> fraction (Figure 5A). The same pattern was detected in the production of IL-17 and the frequencies of IL-10-producing cells (Figure 5B,C). Moreover, the frequencies of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells in the CD25<sup>+</sup> subset were not affected when the cells were restimulated under Th1- or Th17-polarizing conditions, whereas the TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> subset showed a decrease in CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> frequency when cultured under the Th1-polarizing condition (Figure 5D).



**Figure 5.** Cytokine expression of thymus-derived cells after restimulation. On Day 7, the TGF-β1-treated CD25<sup>neg</sup> and CD25<sup>+</sup> fractions were restimulated with anti-CD3/CD28 beads (NT) as the control condition or were restimulated with anti-CD3/CD28 beads under Th1- or Th17-polarizing conditions. (A) Frequencies of IFN-γ-producing cells, measured by flow cytometry. The mean + SEM of three independent experiments are shown. (B) IL-17 (pg/mL) levels from the supernatant were measured by ELISA. The mean + SEM of two independent experiments are shown. (C) Frequencies of IL-10-producing cells were measured by flow cytometry. The mean + SEM of three independent experiments are shown. (D) Percentages of

CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells gated on living cells were measured by flow cytometry. The mean + SEM of three independent experiments are shown. \*  $p < 0.05$  was considered to be significant when comparing conditions. We also analyzed cytokine production in cells restimulated without a polarizing environment. (E) Example of the gating strategy for selecting cytokine-producing cells in the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fraction, according to the expression of FOXP3. Intracellular IL-2-, IL-10-, or IFN- $\gamma$ -producing cells in FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>neg</sup> subsets were assessed by flow cytometry. (F) We then calculated the frequencies of cytokines detected in the total cells (FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>neg</sup> subsets) (mean  $\pm$  SEM of 3–4 independent experiments). \*  $p < 0.05$  was considered to be significant when comparing conditions. (G) Correlations between frequencies of the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells gated on living cells, as well as the frequency of IFN- $\gamma$ -producing cells (left) and frequency of IL-10-producing cells (right), are represented. Correlations were determined by Spearman's rank correlation and considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Each symbol corresponds to an individual.

In addition, we quantified the expression of intracellular IL-2-, IL-10-, or IFN- $\gamma$  in our transduced, TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> cells when they were restimulated, but without a proinflammatory environment, compared with the restimulated CD25<sup>+</sup> subset. The intracellular cytokine expression was different between the FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>neg</sup> subsets, being lower in the former, showing that FOXP3<sup>+</sup> cells express fewer cytokines (Figure 5E). Moreover, gated on total living cells, higher frequencies of IL-2- and IFN- $\gamma$ -producing cells, and lower frequencies of IL-10-producing cells were observed in all the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> conditions compared with those in the CD25<sup>+</sup> subset, even though the differences were not significant (Figure 5F).

Finally, negative associations between the frequencies of the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> population and IFN- $\gamma$ - or IL-10-producing cells were observed when analyzing all the non-CD25<sup>+</sup> conditions (Spearman  $r = -0.8246$ ,  $p < 0.0001$ , and Spearman  $r = -0.5348$ ,  $p = 0.0222$ , respectively; Figure 5G). Therefore, the lower the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> expression, the more anti-inflammatory and proinflammatory cytokines that were produced.

In summary, the CD25<sup>+</sup> fraction derived from the thymus showed evident stability in CD25 and FOXP3 expression and in cytokine production, despite being under Th1 and Th17 environments, which was not the case for all the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> subsets. These results suggest that the cellular instability of FOXP3 and CTL-4 expression, as well as the susceptibility to producing proinflammatory cytokines after stimulation in TGF- $\beta$ 1-treated or FOXP3-transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> subsets, may cause low suppressive capacities in these cells.

## 5. Discussion

In this study, we showed that the overexpression of the principal nTreg transcription factor, FOXP3, by TGF- $\beta$ 1 treatment or by ectopic FOXP3 expression was insufficient for conferring a stable phenotype and function to the CD25<sup>neg</sup>-derived thymocytes [37,38]. All the results were summarized in Table S2.

To induce suppressive iTregs from the periphery, various factors are essential, such as IL-2, TCR/CD28 engagement, and TGF- $\beta$ 1 [38]. It is known that, due to their natural plasticity, pTregs and iTregs from peripheral naive CD4<sup>+</sup> T cells can lose their FOXP3 expression under certain circumstances [23,39]. However, this instability could be implicated in the Treg natural selection of self and non-self in the thymus, which is related to the TCR signal strength [40]. Therefore, the physiological function of Treg instability is a complex phenomenon that is not fully understood. Here, the TGF- $\beta$ 1-treated CD25<sup>neg</sup> and TGF- $\beta$ 1-treated FOXP3-transduced cells permitted the acquisition of robust FOXP3 expression, similar to that observed in the peripheral Tconvs. However, the expression of FOXP3 and other Treg-related markers was not stable enough and was slightly reduced as the culture time increased. It has been previously demonstrated that the expression of FOXP3 alone is not sufficient, even in the thymus [41]. In fact, demethylation of the FOXP3 promoter and its subsequent expression were not associated with a functional Treg phenotype [42]. Extrinsic factors, such as the IL-2/IL-2 receptor axis and other cytokines, are pivotal to maintaining Treg cell integrity and functionality [43,44]. CD25<sup>neg</sup>FOXP3<sup>low</sup> and CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>neg</sup> progenitors can both be differentiated to CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> with high

efficiency when a high concentration of IL-2 is used [25]. It has been described that IL-2 is essential for regulating and maintaining FOXP3 expression [45]. In this study, we tried to differentiate the CD25<sup>neg</sup> subset with a high concentration of IL-2 and TGF- $\beta$ 1, and the cells presented a clear expression of FOXP3 without acquiring a stable and robust suppressive function.

CTLA-4 has also been shown to regulate the early development of self-reactive T cells in the thymus. It plays a key role in the central tolerance and the development of conventional and regulatory T cells [46]. Therefore, this might explain why the reduction in CTLA-4 and FOXP3 expression in the non-CD25<sup>+</sup> subsets correlated with a lower suppressive function, suggesting that phenotypic instability could be related to functional instability. Supporting these ideas, Ohkura et al. demonstrated the need for an elevated demethylation state of the FOXP3 Treg-specific demethylated region as well as demethylation in other Treg-associated genes, such as *CTLA-4*, to acquire lineage stability and full suppressive activity [41,47–49]. Therefore, further studies on the differences in the methylation states between tTreg and TGF- $\beta$ 1-treated thymocytes would help us understand the impact of the epigenetic status of these cells on their function.

Another hypothesis to explain the instability of generated cells is that, although exogenous FOXP3 expression was forced in the CD25<sup>neg</sup> thymocytes, these cells could lack regulatory and post-transcriptional factors essential for Treg development and maintenance, such as the sterile motif histidine–aspartate domain containing protein 1 [50] or the Forkhead box P1 [51], which stabilizes FOXP3 expression in Tregs, showing the importance of the intrinsic cellular gene environment. It has previously been discovered and well-reviewed that a degradation mechanism for FOXP3 or cytoplasmic translocation could happen [52,53]. Indeed, activated CD4<sup>+</sup> Tconvs showed a FOXP3 cytoplasmic localization, which might explain why the transitory FOXP3 expression after cellular activation was not followed by a robust suppressive ability. In our work, we demonstrated that FOXP3 expression was localized in the nucleus, where FOXP3 carries out its function.

The direct deacetylation, phosphorylation, and especially ubiquitylation of FOXP3 also play essential roles in regulating Treg cell functions. It has been demonstrated that the deubiquitinase USP7 was highly expressed in Treg cells, and its absence was associated with diminished FOXP3 expression and a subsequent decrease in Treg-cell-mediated suppression in vitro [54]. The U-box domain type E3 ubiquitin ligase STUB1 was also demonstrated to degrade FOXP3, which subsequently provoked a reduction in the expression of Treg cell-associated genes, the upregulation of IL-2 and IFN- $\gamma$  expression, and finally, the disruption of the suppressive function of Treg cells [55]. Therefore, the possible FOXP3 degradation could explain the reduction in CTLA-4 and the increase in IL-2 and IFN- $\gamma$  expression observed in our work, since it has been previously demonstrated that FOXP3 could directly act on the *CTLA-4*, *IL-2*, and *IFN- $\gamma$*  genes through direct chromatin remodeling by histone acetylation and deacetylation [56–58].

Consequently, cellular activation associated with the overexpression of exogenous FOXP3 in thymocytes, as well as TGF- $\beta$ 1/IL-2 treatment, was necessary to increase FOXP3 expression, but not sufficient to convert CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> derived from the thymus into Treg-like cells. This lack of capability could be related to the immature stage of the cells, the absence of a positive gene environment, FOXP3 degradation, or the epigenetic status of the stimulated cells. Hence, understanding the whole mechanism of Treg generation could unlock ways to manipulate the epigenetic status or culture conditions to enable the cells' use in therapeutic approaches in the future.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9050461/s1>. Figure S1: Dot plots of viability and CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> phenotype at Day 7 of the culture. Figure S2: Generation of iTreg from peripheral Tconv. Figure S3: Suppression of CTVio target cell (allogenic PBMC) proliferation. Figure S4: Frequencies of CD4 and CD8 expression in thymus-derived subsets throughout cell culture. Figure S5: Viability, GFP expression and FOXP3 frequency of transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> thymocytes. Table S1: Antibodies for cell surface and intracellular staining. Table S2: Summary of the results.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P.; methodology, J.G.-V., S.G.-M., R.L.-E., V.A.P.-F., E.B.-d.-Q., M.M.-B., and M.P.; software, J.G.-V., S.G.-M., and M.P.; validation, E.B.-d.-Q., M.M.-B., R.C.-R., and M.P.; formal analysis, J.G.-V., S.G.-M. and M.P.; investigation, J.G.-V., S.G.-M. and M.P.; resources, J.G.-V., S.G.-M., A.P., R.P.-C., C.P., J.-M.G.-J. and M.P.; data curation, J.G.-V., S.G.-M. and M.P.; writing — original draft preparation, M.P.; writing—review and editing, J.G.-V., S.G.-M. and M.P.; visualization, J.G.-V., S.G.-M. and M.P.; supervision, M.P.; project administration, M.P.; funding acquisition, R.C.-R., and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI18/00506, DTS18/00038, ICI20/00063 and PI18/00495), co-funded by ERDF (FEDER) funds from the European Commission, “A way of making Europe”. This work was financed by the Madrid Community grant B2017/BMD3727 and by the IiSGM Intramural grant PI-MP-2018. It was also financed by a grant from “Fundación Familia Alonso” (FFA-FIBHGM-2019). J.G.-V. was supported by the Youth Employment Program, co-financed by the Madrid community and FEDER funds (PEJD-2018-PRE/BMD-809) and by the IiSGM intramural grant (Pre-JGV-2018). The funders had no role in the study design, data collection, or analysis; the decision to publish; or the preparation of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the institutional review board (or ethics committee) of the Health Research Institute Gregorio Marañón (protocol code THYTECH1-2018005/CIRSCAR-ThyTREG18, approved on 22 October 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We acknowledge the Centre of Transfusion of Madrid for the buffy coats. We acknowledge Maribel Clemente from the cell culture unit of IiSGM and Laura Diaz from the cytometry unit of IiSGM. We acknowledge José Maria Bellon from the statistical unit of IiSGM. We acknowledge Rebeca Kennedy Batalla for the English revision.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing interest.

## References

1. Sakaguchi, S.; Ono, M.; Setoguchi, R.; Yagi, H.; Hori, S.; Fehervari, Z.; Shimizu, J.; Takahashi, T.; Nomura, T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* **2006**, *212*, 8–27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Taams, L.S.; Palmer, D.B.; Akbar, A.N.; Robinson, D.S.; Brown, Z.; Hawrylowicz, C.M. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* **2006**, *118*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
3. Canavan, J.B.; Scottà, C.; Vossenkämper, A.; Goldberg, R.; Elder, M.J.; Shoval, I.; Marks, E.; Stolarczyk, E.; Lo, J.W.; Powell, N.; et al. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn’s disease. *Gut* **2016**, *65*, 584–594. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Marek-Trzonkowska, N.; Mysliwiec, M.; Dobyszuk, A.; Grabowska, M.; Techmanska, I.; Juscinska, J.; Wujtewicz, M.A.; Witkowski, P.; Mlynarski, W.; Balcerska, A.; et al. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves  $\beta$ -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 1817–1820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Bluestone, J.A.; Buckner, J.H.; Fitch, M.; Gitelman, S.E.; Gupta, S.; Hellerstein, M.K.; Herold, K.C.; Lares, A.; Lee, M.R.; Li, K.; et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*. [\[CrossRef\]](#)
6. Di Ianni, M.; Falzetti, F.; Carotti, A.; Terenzi, A.; Castellino, F.; Bonifacio, E.; Del Papa, B.; Zei, T.; Ostini, R.L.; Cecchini, D.; et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* **2011**, *117*, 3921–3928. [\[CrossRef\]](#)
7. Sun, L.; Wu, J.; Yi, S. Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. *Transpl. Immunol.* **2012**, *26*, 71–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Chen, W.; Konkel, J.E. Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- $\beta$  matters. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 958–965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Xu, A.; Liu, Y.; Chen, W.; Wang, J.; Xue, Y.; Huang, F.; Rong, L.; Lin, J.; Liu, D.; Yan, M.; et al. TGF- $\beta$ -Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 3631–3641. [\[CrossRef\]](#)
10. Rao, P.E.; Petrone, A.L.; Ponath, P.D. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . *J. Immunol.* **2005**, *174*, 1446–1455. [\[CrossRef\]](#)
11. Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K.J.; Li, L.; Marinus, N.; McGrady, G.; Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1875–1886. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Allan, S.E.; Alstad, A.N.; Merindol, N.; Crellin, N.K.; Amendola, M.; Bacchetta, R.; Naldini, L.; Roncarolo, M.G.; Soudeyns, H.; Levings, M.K. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 194–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Beavis, P.A.; Gregory, B.; Green, P.; Cribbs, A.P.; Kennedy, A.; Amjadi, P.; Palfreeman, A.C.; Feldmann, M.; Brennan, F.M. Resistance to regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis can be bypassed by ectopic foxp3 expression in pathogenic synovial T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16717–16722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Passerini, L.; Rossi Mel, E.; Sartirana, C.; Foustieri, G.; Bondanza, A.; Naldini, L.; Roncarolo, M.G.; Bacchetta, R. CD4+ T cells from IPEx patients convert into functional and stable regulatory T cells by FOXP3 gene transfer. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 215ra174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Floess, S.; Freyer, J.; Siewert, C.; Baron, U.; Olek, S.; Polansky, J.; Schlawe, K.; Chang, H.D.; Bopp, T.; Schmitt, E.; et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Polansky, J.K.; Kretschmer, K.; Freyer, J.; Floess, S.; Garbe, A.; Baron, U.; Olek, S.; Hamann, A.; von Boehmer, H.; Huehn, J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1654–1663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zhou, X.; Bailey-Bucktrout, S.; Jeker, L.T.; Bluestone, J.A. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21*, 281–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wang, Y.; Souabni, A.; Flavell, R.A.; Wan, Y.Y. An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 5983–5992. [[CrossRef](#)]
19. Voo, K.S.; Wang, Y.H.; Santori, F.R.; Boggiano, C.; Arima, K.; Bover, L.; Hanabuchi, S.; Khalili, J.; Marinova, E.; Zheng, B.; et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4793–4798. [[CrossRef](#)]
20. Zhou, X.; Bailey-Bucktrout, S.L.; Jeker, L.T.; Penaranda, C.; Martínez-Llordella, M.; Ashby, M.; Nakayama, M.; Rosenthal, W.; Bluestone, J.A. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 1000–1007. [[CrossRef](#)]
21. Hoffmann, P.; Boeld, T.J.; Eder, R.; Huehn, J.; Floess, S.; Wiczorek, G.; Olek, S.; Dietmaier, W.; Andreesen, R.; Edinger, M. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 1088–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Jagger, A.; Shimojima, Y.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M. Regulatory T cells and the immune aging process: A mini-review. *Gerontology* **2014**, *60*, 130–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Komatsu, N.; Mariotti-Ferrandiz, M.E.; Wang, Y.; Malissen, B.; Waldmann, H.; Hori, S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 1903–1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dijke, I.E.; Hoeppli, R.E.; Ellis, T.; Pearcey, J.; Huang, Q.; McMurphy, A.N.; Boer, K.; Peeters, A.M.; Aubert, G.; Larsen, I.; et al. Discarded Human Thymus Is a Novel Source of Stable and Long-Lived Therapeutic Regulatory T Cells. *Am. J. Transplant.* **2016**, *16*, 58–71. [[CrossRef](#)]
25. Owen, D.L.; Mahmud, S.A.; Sjaastad, L.E.; Williams, J.B.; Spanier, J.A.; Simeonov, D.R.; Ruscher, R.; Huang, W.; Proekt, I.; Miller, C.N.; et al. Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 195–205. [[CrossRef](#)]
26. Ellmeier, W.; Faust, L.; Tschismarow, R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. *Cell Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 4537–4553. [[CrossRef](#)]
27. Engel, M.; Sidwell, T.; Vasanthakumar, A.; Grigoriadis, G.; Banerjee, A. Thymic regulatory T cell development: Role of signalling pathways and transcription factors. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 617595. [[CrossRef](#)]
28. Tuulasvaara, A.; Vanhanen, R.; Baldauf, H.M.; Puntilla, J.; Arstila, T.P. Interleukin-7 promotes human regulatory T cell development at the CD4+CD8+ double-positive thymocyte stage. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 491–498. [[CrossRef](#)]
29. Toomer, K.H.; Malek, T.R. Cytokine Signaling in the Development and Homeostasis of Regulatory T cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
30. MacDonald, K.N.; Ivison, S.; Hippen, K.L.; Hoeppli, R.E.; Hall, M.; Zheng, G.; Dijke, I.E.; Aklabi, M.A.; Freed, D.H.; Rebeyka, I.; et al. Cryopreservation timing is a critical process parameter in a thymic regulatory T-cell therapy manufacturing protocol. *Cytotherapy* **2019**, *21*, 1216–1233. [[CrossRef](#)]
31. Hoffmann, P.; Eder, R.; Boeld, T.J.; Doser, K.; Piseshka, B.; Andreesen, R.; Edinger, M. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* **2006**, *108*, 4260–4267. [[CrossRef](#)]
32. McMurphy, A.N.; Levings, M.K. Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 27–34. [[CrossRef](#)]
33. Cohen, C.J.; Crome, S.Q.; MacDonald, K.G.; Dai, E.L.; Mager, D.L.; Levings, M.K. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 5615–5626. [[CrossRef](#)]
34. Deaglio, S.; Dwyer, K.M.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.F.; Enjyoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1257–1265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Walker, L.S. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *J. Autoimmun.* **2013**, *45*, 49–57. [[CrossRef](#)]

36. Chandran, S.; Tang, Q.; Sarwal, M.; Laszik, Z.G.; Putnam, A.L.; Lee, K.; Leung, J.; Nguyen, V.; Sigdel, T.; Tavares, E.C.; et al. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am. J. Transplant.* **2017**, *17*, 2945–2954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liu, Y.; Zhang, P.; Li, J.; Kulkarni, A.B.; Perruche, S.; Chen, W. A critical function for TGF- $\beta$  signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 632–640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zheng, S.G.; Wang, J.; Wang, P.; Gray, J.D.; Horwitz, D.A. IL-2 is essential for TGF- $\beta$  to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 2018–2027. [[CrossRef](#)]
39. Yang, X.O.; Nurieva, R.; Martinez, G.J.; Kang, H.S.; Chung, Y.; Pappu, B.P.; Shah, B.; Chang, S.H.; Schluns, K.S.; Watowich, S.S.; et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **2008**, *29*, 44–56. [[CrossRef](#)]
40. Zhang, Z.; Zhou, X. Foxp3 Instability Helps tTregs Distinguish Self and Non-self. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2226. [[CrossRef](#)]
41. Ohkura, N.; Hamaguchi, M.; Morikawa, H.; Sugimura, K.; Tanaka, A.; Ito, Y.; Osaki, M.; Tanaka, Y.; Yamashita, R.; Nakano, N.; et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* **2012**, *37*, 785–799. [[CrossRef](#)]
42. Kressler, C.; Gasparoni, G.; Nordström, K.; Hamo, D.; Salhab, A.; Dimitropoulos, C.; Tierling, S.; Reinke, P.; Volk, H.D.; Walter, J.; et al. Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 609891. [[CrossRef](#)]
43. Caramalho, I.; Nunes-Silva, V.; Pires, A.R.; Mota, C.; Pinto, A.I.; Nunes-Cabaço, H.; Foxall, R.B.; Sousa, A.E. Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. *J. Autoimmun.* **2015**, *56*, 98–110. [[CrossRef](#)]
44. Miyao, T.; Floess, S.; Setoguchi, R.; Luche, H.; Fehling, H.J.; Waldmann, H.; Huehn, J.; Hori, S. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* **2012**, *36*, 262–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zom, E.; Nelson, E.A.; Mohseni, M.; Porcheray, F.; Kim, H.; Litsa, D.; Bellucci, R.; Raderschall, E.; Canning, C.; Soiffer, R.J.; et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **2006**, *108*, 1571–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Verhagen, J.; Genolet, R.; Britton, G.J.; Stevenson, B.J.; Sabatos-Peyton, C.A.; Dyson, J.; Luescher, I.F.; Wraith, D.C. CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E221–E230. [[CrossRef](#)]
47. Morikawa, H.; Ohkura, N.; Vandenbon, A.; Itoh, M.; Nagao-Sato, S.; Kawaji, H.; Lassmann, T.; Carninci, P.; Hayashizaki, Y.; Forrest, A.R.; et al. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5289–5294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ohkura, N.; Kitagawa, Y.; Sakaguchi, S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* **2013**, *38*, 414–423. [[CrossRef](#)]
49. Morikawa, H.; Sakaguchi, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: From a Foxp3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol. Rev.* **2014**, *259*, 192–205. [[CrossRef](#)]
50. Kim, Y.C.; Kim, K.K.; Yoon, J.; Scott, D.W.; Shevach, E.M. SAMHD1 Posttranscriptionally Controls the Expression of Foxp3 and Helios in Human T Regulatory Cells. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 1671–1680. [[CrossRef](#)]
51. Konopacki, C.; Pritykin, Y.; Rubtsov, Y.; Leslie, C.S.; Rudensky, A.Y. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 232–242. [[CrossRef](#)]
52. Lu, L.; Barbi, J.; Pan, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 703–717. [[CrossRef](#)]
53. Magg, T.; Mannert, J.; Ellwart, J.W.; Schmid, I.; Albert, M.H. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 1627–1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Van Loosdregt, J.; Fleskens, V.; Fu, J.; Brenkman, A.B.; Bekker, C.P.; Pals, C.E.; Meerdling, J.; Berkens, C.R.; Barbi, J.; Gröne, A.; et al. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity* **2013**, *39*, 259–271. [[CrossRef](#)]
55. Chen, Z.; Barbi, J.; Bu, S.; Yang, H.Y.; Li, Z.; Gao, Y.; Jinasena, D.; Fu, J.; Lin, F.; Chen, C.; et al. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity* **2013**, *39*, 272–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chen, C.; Rowell, E.A.; Thomas, R.M.; Hancock, W.W.; Wells, A.D. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36828–36834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ono, M.; Yaguchi, H.; Ohkura, N.; Kitabayashi, I.; Nagamura, Y.; Nomura, T.; Miyachi, Y.; Tsukada, T.; Sakaguchi, S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* **2007**, *446*, 685–689. [[CrossRef](#)]
58. Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A.D.; Stroud, J.C.; Bates, D.L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S.F.; et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **2006**, *126*, 375–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Additional file: Fig. S1

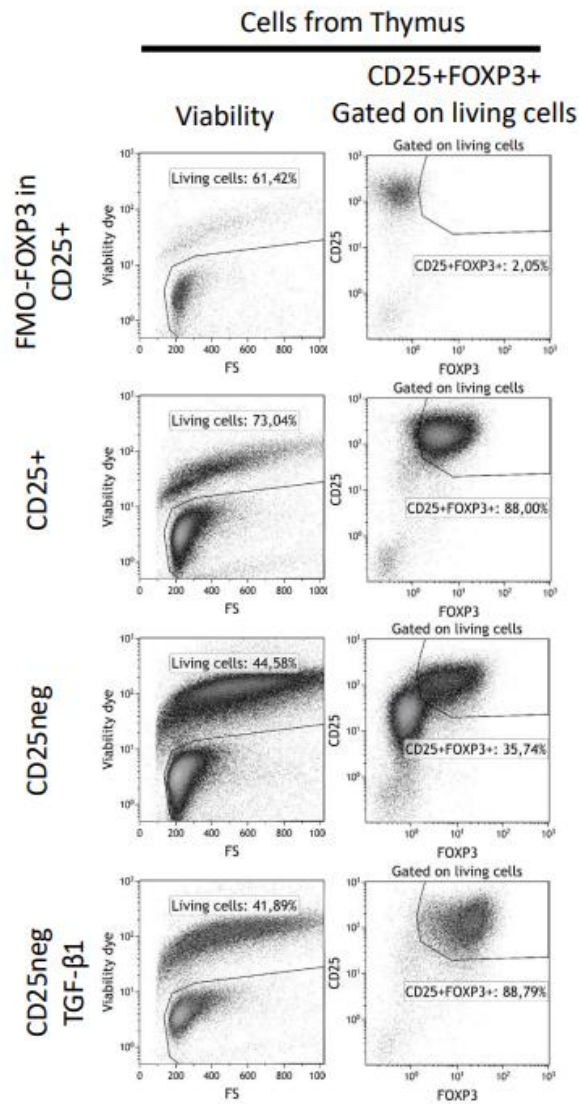
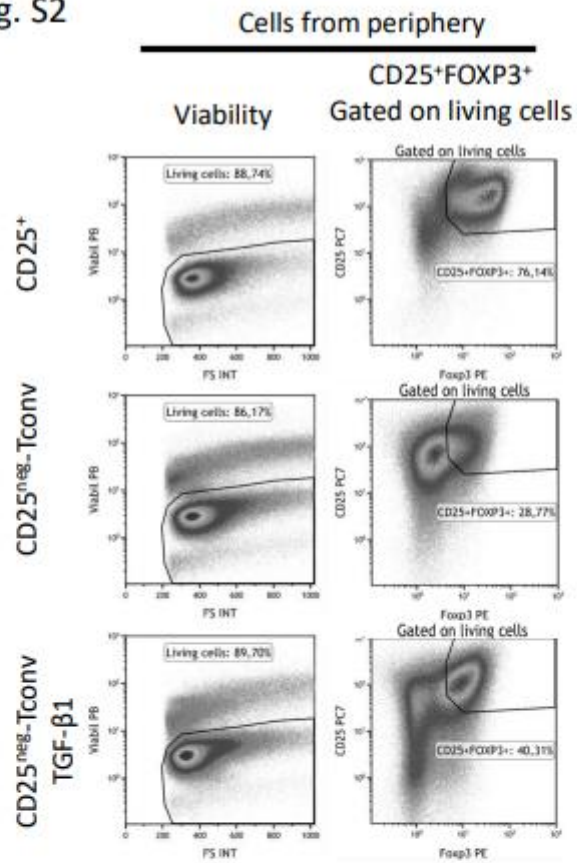


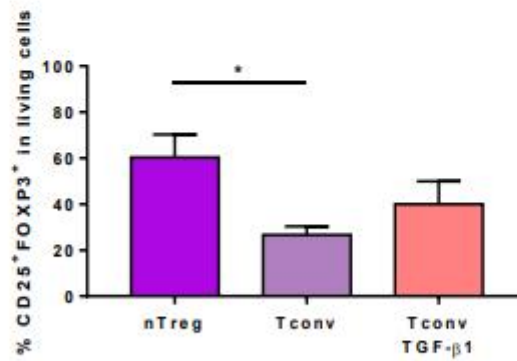
Figure S1: **Dot plots of Viability and CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> phenotype at Day 7 of the culture.** FMO for FOXP3 marker (upper dot plots) is represented. Living cells, FOXP3 and CD25 markers were followed by flow cytometry in the CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup>, CD25<sup>neg</sup> + TGF-β1 fractions. Dot plots belong to one representative experiment from 14 independent donors.

Additional file: Fig. S2

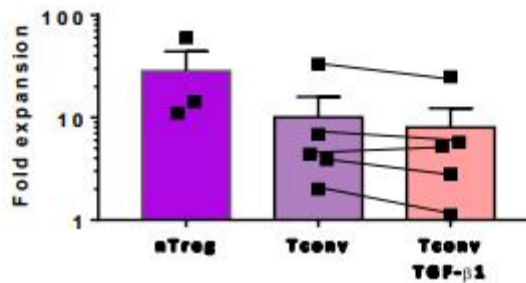
A



B



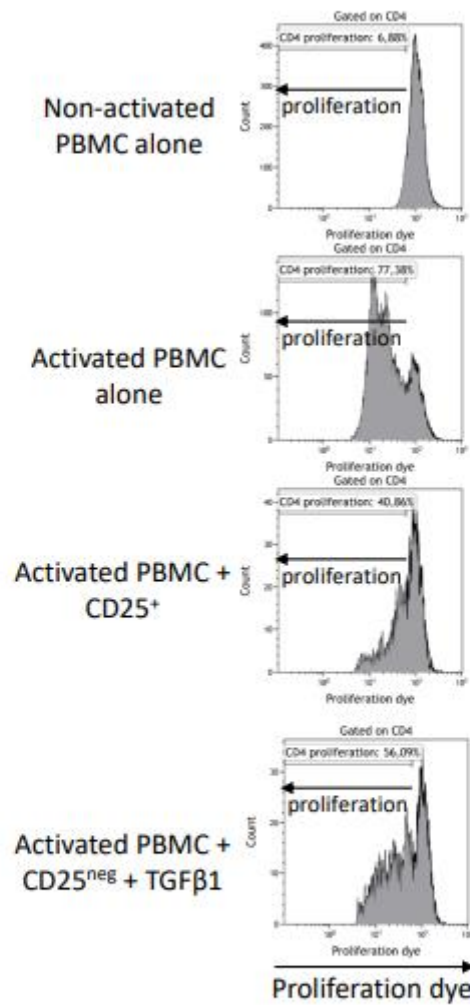
C



**Figure S2: Generation of iTreg from peripheral Tconv.**

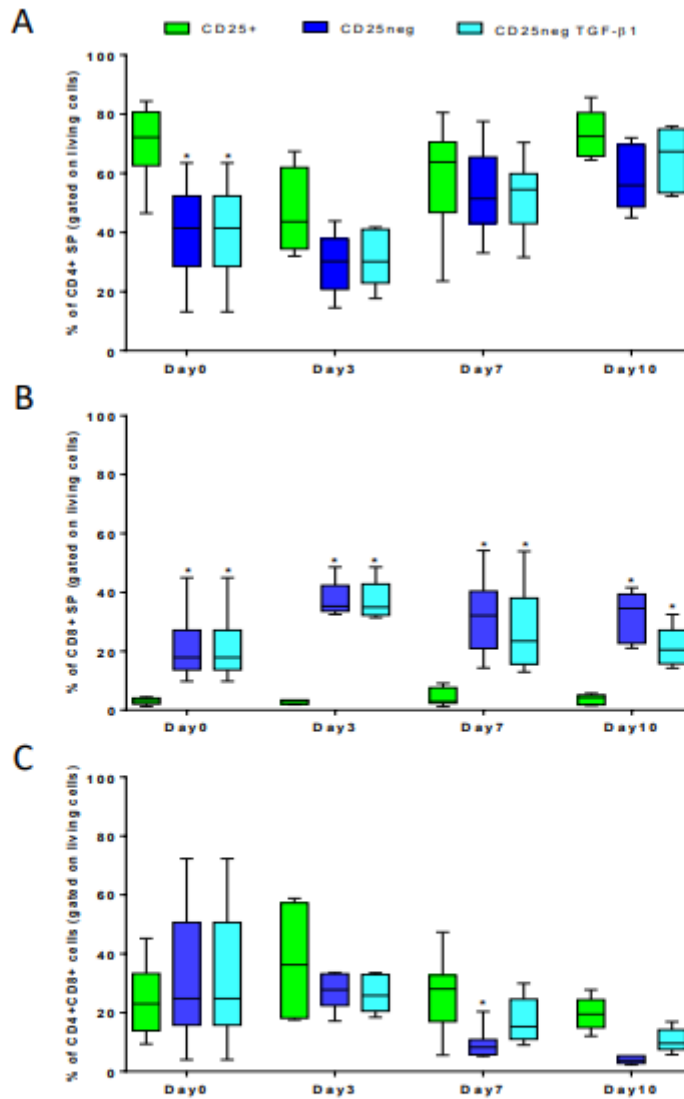
(A) Living cells, FOXP3 and CD25 markers were followed by flow cytometry in the CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup>, and CD25<sup>neg</sup> + TGF- $\beta$ 1 fractions from cells derived from peripheral blood. Dot plots belong to one representative experiment from 3 independent donors for CD25<sup>+</sup> and 5 independent donors for CD25<sup>neg</sup> fractions. (B) Percentage of cells expressing CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> gated on living cells at day 7 post-activation in different cell subsets derived from peripheral blood. Mean + SEM of 3 independent experiments for peripheral CD25<sup>+</sup> (pCD25<sup>+</sup>) and 5 independent experiments for non-CD25<sup>+</sup> subsets (pCD25<sup>neg</sup> and pCD25<sup>neg</sup> + TGF $\beta$ 1) are shown. \* p<0.05 was considered significant when comparing conditions. (C) Expansion of the cells between day 3 and 7 post-activation. Each symbol corresponds to an individual. Lines join different conditions from the same donors.

Additional file: Fig. S3



**Figure S3: Suppression of CTVio target allogenic PBMC proliferation.** Histogram plots show the loss of CellTrace Violet target cells fluorescence intensity in non-activated PBMC or activated PBMC alone (negative and positive controls of proliferation, respectively). Then, in the co-culture of activated PBMC with CD25<sup>+</sup> or CD25<sup>neg</sup> + TGF-β1. Histogram plots of one representative experiment from 7-8 independent donors.

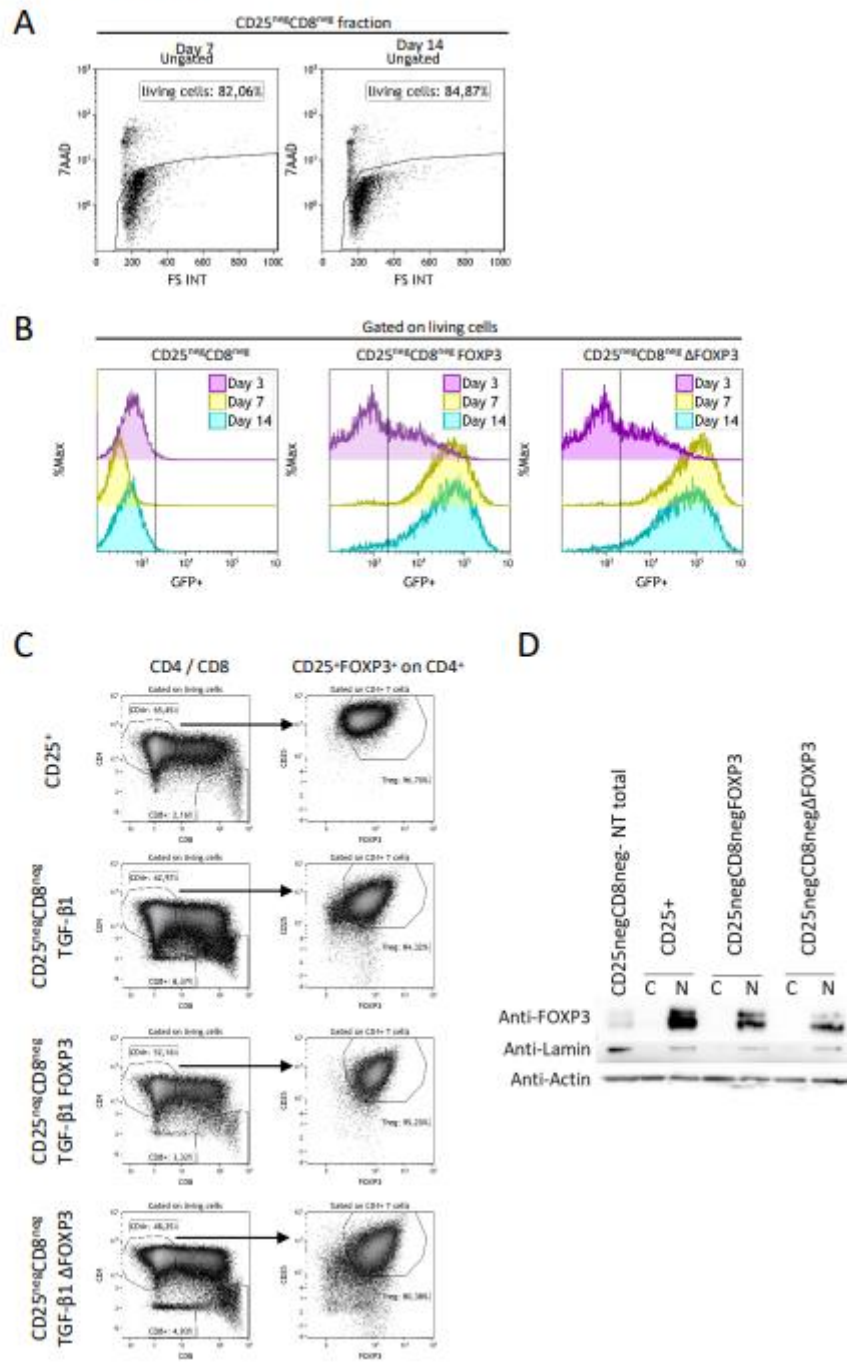
Additional file: Fig. S4



**Figure S4: Frequencies of CD4 and CD8 expression in thymus-derived subsets throughout cell culture.**

Box-and-whisker plots representing median and 5–95 percentile range of frequencies of (A) CD4SP, (B) CD8SP and (C) DP subsets throughout 10 days of culture. Median of 10 independent experiments at Day 0; 6 independent experiments at Day 3 and 10; and median of 9 independent experiments at day 7 of each condition are shown. \* represents the significant difference of this condition against CD25+.

Additional file: Fig. S5



**Supplemental Figure S5. Viability, GFP expression and FOXP3 frequency of transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> thymocytes.** . (A) Dot plots representation living cells determined by 7AAD labelling by flow cytometry at Day 7, 14 post-culture of the CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> fraction. Percentage represents the frequency of living cells. (B) Overlay histogram representation of the GFP expression by flow cytometry, gated on living cells at Day 3, 7 and 14 in non-transduced CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> (left panel), CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transduced with MSCV-FOXP3 (central panel), and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup> transduced with MSCV-ΔFOXP3 (right panel). (C) Dot plots representation of the CD4 / CD8 expression (gated on living cells) and CD25/FOXP3 expression gated on CD4<sup>+</sup> thymocytes at Day 7. Numbers in the CD4 or CD8 gates represent the frequencies of CD4 simple positive and CD8 simple positive, respectively. Numbers in the Treg gate represent the frequencies of the CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells gated on CD4<sup>+</sup> SP. **One representative experiment of 7 independent experiments is shown.** (D) Western blot showing nuclear and cytoplasmic distribution of FOXP3 in CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>FOXP3 and CD25<sup>neg</sup>CD8<sup>neg</sup>ΔFOXP3 at day 14 post-culture following lentiviral transduction. Lower panels, Lamin and Actin controls. **One representative experiment of 2 independent experiments is shown.**

**Table S1: Antibodies for cell surface and intracellular staining**

Phenotypic staining		
Target	fluorochrome	provider
CD39	FITC	Miltenyi Biotec
CD3	PO	Miltenyi Biotec
CD45RA	ECD	Beckman Coulter
HLA-DR	PC5,5	Beckman Coulter
CD8	APC/Cy5	Beckman Coulter
CD25	PC7	Becton Dickinson
CD4	APC/Cy7	Biolegend
FOXP3 <sup>(a)</sup>	PE	eBioscience
CTLA-4 <sup>(a)</sup>	APC	Becton Dickinson
Suppressive assay		
Target	fluorochrome	provider
CD4	PC7	Beckman Coulter
CD8	FITC	Beckman Coulter
Stability after Suppressive assay		
Target	Fluorochrome	provider
CD39	FITC	Miltenyi Biotec
CD3	PO	Miltenyi Biotec
CD8	APC/Cy5	Beckman Coulter
CD25	PC7	eBioscience
CD4	APC/Cy7	Biolegend
FOXP3 <sup>(a)</sup>	PE	eBioscience
CTLA-4 <sup>(a)</sup>	APC	Becton Dickinson
Cytokines production instability assay		
Target	Fluorochrome	provider
CD4	ECD	Miltenyi Biotec
CD8	PO	Miltenyi Biotec
CD25	PC7	Becton Dickinson
CD69	APC/Cy5	Biolegend
IL-17A <sup>(a)</sup>	FITC	eBioscience
IL-4 <sup>(a)</sup>	APC	eBioscience
IFN- $\gamma$ <sup>(a)(b)</sup>	PB	eBioscience
FOXP3 <sup>(a)</sup>	PC5,5	eBioscience
IL-10 <sup>(a)</sup>	PE	Miltenyi Biotec
IL-2 <sup>(b)</sup>	PE	Miltenyi Biotec
IL-10 <sup>(b)</sup>	APC	Miltenyi Biotec

**Table S1: Antibodies for cell surface and intracellular staining**

Antibodies list used in the determination of the cell phenotypes, in the suppressive assay and in the study of the phenotypic stability after suppressive assay with their targets, associated fluorochromes and providers. (a) intracellular markers. (b) Intracellular markers used in the stability assay with FOXP3-transduced cells

Table S2. Summary of the results.

Cellular source	subsets	Day post-culture	Viability	Fold expansion (fold change)	% CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> expression	% CD28 <sup>+</sup> expression	% CTLA-4 <sup>+</sup> expression	% CD4 SP	% CD8 SP	% CD6+CD8+ DP	Suppressive function	Surface markers in suppressive assay	Expression of pro-inflammatory cytokines
Thymus	CD25 <sup>+</sup>	0	high		high	high	high	high	very low	intermediate			
		10	↔	-4	↑	↓	↓	↔	↔	↔	high	high	very low
	CD25 <sup>neg</sup>	0	high		very low	low	high	intermediate	intermediate	intermediate			
		10	↔	-3	↑	↑	↓	↑	↔	↓	intermediate	high	high
	CD25 <sup>neg</sup> + TGF-β1	0	high		very low	low	high	intermediate	intermediate	intermediate			
		10	↔	-3	↑	↑	↓	↑	↔	↓	intermediate	high	high
Peripheral blood	CD25 <sup>+</sup> peripheral blood	0	high		high	not shown	not shown	high	NA	NA			
		10	↔	-30	↑			↔			high	ND	ND
	CD25 <sup>neg</sup> + TGF-β1 peripheral blood	0	high		very low	not shown	not shown	high	NA	NA			
		10	↔	-8	↑			↔			high	ND	ND
Thymus	CD25 <sup>neg</sup> + FOXP3 lentivector	0	high		very low	not shown	high	high	low	intermediate			
		14	↔	ND	↑		↓	↔	↔	↓	intermediate	ND	high
	CD25 <sup>neg</sup> + FOXP3 lentivector + TGF-β1	0	high		very low	not shown	high	high	low	intermediate			
		14	↔	ND	↑		↓	↔	↔	↓	intermediate	ND	high

Table S2. Summary of the results.

Viability, fold expansion, frequencies of surface markers expression, suppressive function and intracellular cytokines expression were summarized. High, Intermediate and low represent levels of expression

↔	Stable over time
↑	Increasing from Day 0
↓	Decreasing from day 0
ND	Not determined
NA	Not applicable