



Universiteit
Leiden
The Netherlands

From stem cells to functional lymphocytes: cell differentiation and gene therapy implementation for RAG-SCID

García Pérez, L.

Citation

García Pérez, L. (2021, October 6). *From stem cells to functional lymphocytes: cell differentiation and gene therapy implementation for RAG-SCID*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3214836>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3214836>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

RESUMEN (ESPAÑOL)

El sistema inmunitario es un mecanismo de defensa complejo para prevenir o limitar infecciones y mantener la homeostasis. Consiste en una red interactiva de órganos linfoides, factores humorales y varios tipos de células especializada, incluyendo linfocitos B y T que constituyen el sello distintivo de la respuesta inmunitaria adquirida. Estas células inmunes se originan a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea que se desarrollan y maduran mediante una serie de procesos altamente regulados. Cada tipo celular del sistema inmune desempeña una función especializada única y su desarrollo está estrictamente regulado mediante distintos factores de transcripción y sus genes diana.

En el **Capítulo 2** de esta tesis nos concentramos en obtener conocimientos adicionales del desarrollo inmune, con un enfoque detallado en el conjunto transcripcional que orquesta el desarrollo de células T. Tcf1, la primera proteína específica de las células T inducida en el timo, regula la expresión de dos de sus principales genes diana, Gata3 y Bcl11b. La deficiencia de Tcf1 provoca un arresto parcial en el desarrollo de células T, una apoptosis prominente y un desarrollo alterado de células alternativas (es decir no-células T). Fenotípicamente, las células T aparentemente especializadas con deficiencia de Tcf1 tienen una expresión génica heterogénea, un perfil epigenético alterado y pueden des-diferenciarse en células T inmaduras y otros tipos celulares. Al restaurar la expresión de Bcl11b en células madre con deficiente Tcf1 conseguimos rescatar el desarrollo de las células T, pero no suprime el desarrollo de células alternativas. Al contrario, la expresión de Gata3 suprime el desarrollo de células no-T, pero no consigue rescatar el desarrollo de linfocitos T. Por lo tanto, describimos una red mínima de factores de transcripción que garantizan una regulación óptima del programa génico de las células T: Notch induce la expresión de Tcf1 que posteriormente actúa sobre dos genes diana, Gata3 y Bcl11b, que logran dividirse esfuerzos con Gata3 suprimiendo el desarrollo de células no-T y Bcl11b induciendo la expresión de genes específicos de células T para el desarrollo de estas células.

La alteración del desarrollo normal de los linfocitos puede causar enfermedades graves conocidas como inmunodeficiencias. La inmunodeficiencia combinada severa (llamada en inglés SCID, Severe Combined Immunodeficiency) es un desorden inmune devastador que afecta a bebés carentes de un sistema inmune funcional, en particular células T. Desafortunadamente, los bebés con SCID mueren durante su primer año de vida a menos que reciban un tratamiento eficaz. Los tratamientos terapéuticos para SCID se limitan al trasplante de células madre de donante sano y a la emergente terapia génica basada en células madre del paciente corregidas.

En esta tesis nos enfocamos en desarrollar una terapia génica lentiviral eficiente y segura para corregir los defectos inmunes derivados del mal funcionamiento del gen activador de la recombinación (RAG) 1 y RAG2. En el **Capítulo 3**, analizo el desarrollo preclínico, la seguridad y los obstáculos regulatorios a lo largo del proceso y pasos para realizar con éxito terapia génica para inmunodeficiencias, desde el laboratorio hasta la clínica. En el **Capítulo 4** y **Capítulo 5** se describe una terapia génica lentiviral eficaz y segura para

corregir RAG-SCID. Observamos una completa reconstitución funcional del sistema inmune en modelos de ratón (Rag1^{-/-} mutante y Rag2^{-/-} mutante) con nuestro vector lentiviral MND-c.o.RAG1 y PGK-c.o.RAG2 en células madre de ratón. Tras la terapia génica se percibe el desarrollo de células B y T en la médula ósea y el timo, junto con una reparación funcional incluyendo la producción de inmunoglobulinas, receptores de células T con gran diversidad y una respuesta inmune eficiente. Además, al probar la terapia génica con el vector clínico de RAG1 en células madre de paciente se observó gratamente una mejora en el desarrollo de células B y T humanas. Un desarrollo preclínico exitoso junto con una seguridad favorable descrita en el **Capítulo 4** reafirma el primer ensayo clínico de fase I/II en todo el mundo para terapia génica para pacientes RAG1-SCID. En paralelo, la reconstitución inmune se logró en el modelo de ratón Rag2^{-/-} con un vector lentiviral PGK-c.o.RAG2 clínico seguro en el **Capítulo 5**, aunque la terapia génica para RAG2 parece ser más desafiante debido al papel crucial de los niveles óptimos de expresión de esta proteína.

Además, nos centramos en optimizar protocolos relacionados mediante el avance de nuevas herramientas y regímenes de condicionamiento para obtener un resultado exitoso tras el trasplante de células madre. En el **Capítulo 6** presentamos un método novedoso para la caracterización (uni)celular de la eficiencia de corrección y expresión transgénica en el producto de terapia génica. La técnica de ADN ramificada utilizada muestra una alta especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y versatilidad. Este método permite estudiar la heterogeneidad dentro de los productos de terapia génica y reconsiderar la proporción real de células potencialmente terapéuticas y el número de copias del transgén subestimado hasta ahora.

Por último, experimentamos regímenes de condicionamiento alternativos de quimioterapia reducida para lograr un injerto celular adecuado y una recuperación inmune, al tiempo que se reducen los efectos secundarios a corto y largo plazo. En el **Capítulo 7**, describo nuestros esfuerzos para desarrollar un régimen de quimioterapia reducida (busulfán) combinándolo con agentes movilizadores clínicamente aprobados (G-CSF y Plerixafor) utilizados para movilizar las células madre hematopoyéticas de la médula ósea hacia la sangre. Si bien se observó una reducción interesante de un grupo de células madre en la médula ósea con las nuevas combinaciones que incluyen G-CSF o Plerixafor, no se lograron diferencias significativas tras el trasplante utilizando el modelo de ratón humanizado. Los desarrollos más recientes y prometedores de condicionamiento basados en anticuerpos son extremadamente atractivos para este campo, ya que idealmente proporcionarán la capacidad de lograr un trasplante exitoso sin el uso de agentes quimioterapéuticos tóxicos.

En conjunto, el trabajo descrito en esta tesis progresa hacia una aplicación regular del tratamiento de terapia génica para tratar inmunodeficiencias. Varios procesos importantes durante el procedimiento general se han optimizado, como por ejemplo la detección precoz en recién nacidos, el aislamiento y corrección de las células madre, los regímenes de condicionamiento, unos protocolos estandarizados y el monitoreo de pacientes.