



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).

## RESUM (CATALÀ)

El sistema immunitari és un mecanisme complex de defensa per prevenir o limitar les infeccions i mantenir l'homeòstasi. Consisteix en una xarxa interactiva d'òrgans limfoides, factors humorals i diversos tipus cel·lulars especialitzats, inclosos el limfòcits B i T que constitueixen el segell distintiu de la resposta immunitària adquirida. Aquestes cèl·lules immunitàries provenen de cèl·lules hematopoètiques de la medul·la. La òssia que es desenvolupen i maduren a través d'una sèrie de processos altament regulats. Cada tipus cel·lular del sistema immunitari té un paper especialitzat únic i el seu desenvolupament està estrictament regulat per diferents factors de transcripció i els seus gens diana.

En el **Capítol 2** d'aquesta tesi ens concentrem en obtenir coneixements addicionals de el desenvolupament immunitari, enfocant-nos detalladament en el conjunt transcripcional que orquestra el desenvolupament de les cèl·lules T. Tcf1, la primera proteïna específica de cèl·lules T induïda en el timó, regula la expressió de dos dels seus principals gens diana, Gata3 i Bcl11b. La deficiència de Tcf1 provoca una arrest parcial en el desenvolupament de cèl·lules T, una apoptosi prominent i un desenvolupament alterat de cèl·lules alternatives (és a dir, cèl·lules no T). Fenotípicament, les cèl·lules T aparentment especialitzades amb deficiència de Tcf1 tenen una expressió gènica heterogènia, un perfil epigenètic alterat, i poden desdiferenciar-se en cèl·lules T immadures i altres tipus cel·lular. En restaurar l'expressió de Bcl11b en cèl·lules mare amb deficiència de Tcf1, vam aconseguir rescatar el desenvolupament de cèl·lules T, però no vam suprimir el desenvolupament de cèl·lules alternatives. Per contra, l'expressió de Gata3 suprimeix el desenvolupament de cèl·lules no T, però no aconsegueix rescatar el desenvolupament de limfòcits T. Per tant, descrivim una xarxa mínima de factors de transcripció que garanteixen una regulació òptima de el programa gènica de cèl·lules T: Notch induïx l'expressió de Tcf1 que posteriorment actua sobre dos gens diana, Gata3 i Bcl11b, que aconsegueixen dividir esforços amb Gata3 suprimint el desenvolupament de cèl·lules no-T i Bcl11b induint l'expressió de gens específics de cèl·lules T per al desenvolupament d'aquestes cèl·lules.

L'alteració del desenvolupament normal dels limfòcits pot causar malalties greus conegudes com immunodeficiències. La immunodeficiència combinada severa (anomenada en anglès SCID, Severe Combined Immunodeficiency) és un trastorn immunitari devastador que afecta els nadons que no tenen un sistema immunitari funcional, en particular les cèl·lules T.

En aquesta tesi ens enfoquem a desenvolupar una teràpia gènica lentiviral eficient i segura per corregir els defectes immunitaris derivats del mal funcionament del gen activador de recombinació (RAG) 1 i RAG2. En el **Capítol 3** analitzo el desenvolupament preclínic, la seguretat i els obstacles regulatoris al llarg del procés i passos per realitzar amb teràpia gènica per immunodeficiències amb èxit, des del laboratori fins a la clínica. En el **Capítol 4** i **Capítol 5** es descriu una teràpia gènica lentiviral eficaç i segura per corregir RAG-SCID. Observem una completa reconstitució funcional del sistema immune en model de ratolí (RAG1<sup>-/-</sup> i RAG2<sup>-/-</sup>) amb el nostre vector lentiviral MND-c.o.RAG1 i PGK-c.o.RAG2 en cèl·lules mare de ratolí. Després de la teràpia gènica es percep el

desenvolupament de cèl·lules B i T a la medul·la òssia i el tim, juntament amb una reparació funcional incloent la producció d'immunoglobulines, receptors de cèl·lules T amb gran diversitat i una resposta immunitària eficient. A més, en provar la teràpia gènica amb el vector clínic de RAG1 en cèl·lules mare de pacient es va observar una grata millora en el desenvolupament de cèl·lules B i T humanes. L'èxit del desenvolupament preclínic juntament amb una seguretat favorable descrita al **Capítol 4** reafirma el primer assaig clínic en fase I/II del món pel tractament de teràpia gènica per a pacients amb RAG1-SCID. Paral·lelament, es va aconseguir la reconstitució immunitària en el model Rag2-/- de ratolí amb un vector PGK-c.o.RAG2 clínicament segur en el **Capítol 5**, tot i que aquesta teràpia gènica sembla ser més desafiant a causa de el paper crucial dels nivells òptims d'expressió d'aquesta proteïna.

A més, ens centrem en optimitzar diversos protocols relacionats mitjançant l'avanç de noves eines i règims de condicionament per obtenir un resultat reeixit després del transplantament de cèl·lules mare. En el **Capítol 6** presentem un mètode innovador per a la caracterització (uni)cel·lular de l'eficiència de correcció i expressió transgènica en el producte de teràpia gènica. La tècnica d'ADN ramificada utilitzada mostra una alta especificitat, sensibilitat, reproductibilitat i versatilitat. Aquest mètode permet estudiar l'heterogeneïtat dins dels productes de teràpia gènica i reconsiderar la proporció real de cèl·lules potencialment terapèutiques i el nombre de còpies del transgènic subestimat fins ara.

Finalment, vam experimentar règims de condicionament alternatius de quimioteràpia reduïda per aconseguir un empelt cel·lular adequat i la recuperació immunitària, alhora que reduïm els efectes secundaris a curt i llarg termini. En el **Capítol 7**, descriu els nostres esforços per desenvolupar un règim de quimioteràpia reduït (Busulfan) combinant-lo amb agents mobilitzadors clínicament aprovats (G-CSF i Plerixafor) utilitzats per mobilitzar cèl·lules mare hematopoètiques de la medul·la òssia a la sang. Si bé es va observar una reducció interessant d'un grup de cèl·lules mare en la medul·la òssia amb noves combinacions que inclouen G-CSF o Plerixafor, no es van aconseguir diferències significatives després del transplantament utilitzat un model de ratolí humanitzat. Els desenvolupaments de condicionament més recents i prometedors basats en anticossos són extremadament atractius en aquest camp, ja que idealment proporcionaran la capacitat d'aconseguir un transplantament reeixit sense l'ús d'agents quimioterapèutics tòxics.

En conjunt, el treball descrit en aquesta tesi avança cap a una aplicació regular del tractament de teràpia gènica per tractar immunodeficiències. Diversos processos importants durant el procediment general s'han optimitzat, com ara la detecció precoç en nounats, l'aïllament i correcció de les cèl·lules mare, els règims de condicionament, uns protocols estandarditzats i el seguiment de pacients.