



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski

Mgr Mateusz Gliwiński

Antygenowo-specyficzna regulacja układu odpornościowego w cukrzycy typu 1

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Promotor pomocniczy: dr inż. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Immunologii Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2020

Praca w całości została sfinansowana z grantów:
Narodowego Centrum Badań i Rozwoju STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014
Narodowego Centrum Badań i Rozwoju LIDER/160/L-6/14/NCBR/2015

Spis treści

Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy	3
Wprowadzenie	4
Cel pracy.....	6
Streszczenie prezentowanych prac	7
Wnioski z prezentowanych prac	9
Introduction.....	10
The aim of study.....	12
Summary of the presented publications	13
Conclusions from the presented research	15
Wykaz stosowanego piśmiennictwa / List of references	16

Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy

1. [Gliwiński M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Trzonkowski P. *Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells*. BioDrugs. 2017;31\(4\):335–347. doi:10.1007/s40259-017-0228-3](#)
Praca przeglądowa.
Impact Factor: **3.825**
2. [Fuchs A*, Gliwiński M*, Grageda N*, Spiering R* et al. *Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization*. Front Immunol. 2018;8:1844. Published 2018 Jan 15. doi:10.3389/fimmu.2017.01844](#)
*Równy wkład w powstanie pracy
Praca oryginalna.
Impact Factor: **5.085**
3. [Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Gliwiński M et al. *Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes*. J Transl Med. 2016;14\(1\):332. Published 2016 Dec 1. doi:10.1186/s12967-016-1090-7](#)
Praca oryginalna.
Impact Factor: **3.786**
4. [Gliwiński M*, Iwaszkiewicz-Grześ D*, Wołoszyn-Durkiewicz A et al. *Proinsulin-specific T regulatory cells control immune responses in type 1 diabetes – implications for adoptive therapy with Tregs*. BMJ Open Diabetes Res Care. 2020;8\(1\):e000873. doi:10.1136/bmjdr-2019-000873](#)
*Równy wkład w powstanie pracy
Praca oryginalna.
Impact Factor: **5.067**
5. [Iwaszkiewicz-Grześ D*, Gliwiński M*, Eugster A, Piotrowska M, Dahl A, Marek-Trzonkowska N, Trzonkowski P. *Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies*. Cytotherapy. 2020;S1465-3249\(20\)30788-X. doi:10.1016/j.jcyt.2020.07.001.](#)
*Równy wkład w powstanie pracy
Praca oryginalna.
Impact Factor: **4.218**

Łączny IF prezentowanych prac: 21.981

Wprowadzenie

Układ immunologiczny, który funkcjonuje prawidłowo, potrafi rozpoznawać oraz niszczyć obce i potencjalnie niebezpieczne antygeny, przy jednoczesnej tolerancji swoich własnych antygenów. W cukrzycy typu 1 (ang. *Type 1 Diabetes*; T1D) dochodzi do zaburzenia tej tolerancji, w wyniku czego niszczone zostają własne komórki β wysp trzustkowych, produkujące insulinę, czego konsekwencją jest zaburzenie gospodarki węglowodanowej organizmu chorego. Rozpoznanie choroby zwykle następuje bardzo późno w przebiegu procesu autoimmunologicznego (gdy większość trzustki ulegnie zniszczeniu), gdyż T1D bardzo długo rozwija się bezobjawowo. Obecnie leczenie cukrzycy typu 1 ogranicza się do podawania egzogennej insuliny i ciągłej kontroli poziomu glukozy we krwi, co niestety nie hamuje dalszego procesu autoimmunologicznego i postępu choroby [1].

Komórki T regulatorowe (Tregs) stanowią małą subpopulację limfocytów pomocniczych CD4⁺. Od tych komórek zależy prawidłowe utrzymanie tolerancji immunologicznej poprzez hamowanie nadmiernej aktywności układu odpornościowego [2, 3]. Zaburzenia w funkcjonowaniu Tregs prowadzą do rozwoju różnych chorób immunologicznych, czego przykładem jest sprzężony z chromosom X zespół deregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii (ang. *Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*; IPEX), gdzie w wyniku mutacji w genie kodującym czynnik transkrypcyjny FoxP3 (białko odpowiedzialne na utrzymanie fenotypu i funkcji limfocytów T regulatorowych) dochodzi do jednoczesnego wystąpienia licznych chorób autoimmunologicznych dotyczących wielu narządów, w tym T1D [4].

Z uwagi na naturalną funkcję Tregs, stały się one obiektem badań pod kątem zastosowania w terapiach chorób autoimmunologicznych. Obecnie jako preparat poliklonalny (polispecyficzny) są z powodzeniem wykorzystywane między innymi w leczeniu T1D u dzieci [5, 6]. Polispecyficzność komórek Tregs charakteryzuje się tym, że występuje duża różnorodność repertuaru receptorów limfocytów T (ang. *T Cell Receptor*; TCR). Działanie Tregs w dużej mierze odbywa się poprzez kontakt ich receptorów TCR z MHC klasy II (główny układ zgodności tkankowej) komórek prezentujących antygen (ang. *Antigen Presenting Cell*; APC). Na podstawie prezentowanych w tym kontekście własnych antygenów, Tregs są stymulowane i regulują odpowiedź odpornościową w ten sposób, że hamują reakcje przeciw własnym tkankom. Jednakże, wiele z autoantygenów nie jest rozpoznawanych przez Tregs ze względu na specyfikę dojrzewania tych komórek w grasicy. W ramach pojedynczego antygeny występują konkretne epitopy: dominujące, które bezpośrednio łączą się z TCR i są prezentowane oraz ukryte, które prezentowane nie są [7]. To te niewielkie fragmenty białek, które zostają zaprezentowane w kontekście MHC klasy II są odpowiedzialne za aktywację Tregs i utrzymanie tolerancji na własne antygeny. Z drugiej strony, prezentacja epitopów ukrytych uaktywnia raczej limfocyty efektorowe i może doprowadzić do autoagresji i choroby autoimmunologicznej. Jednocześnie manipulacja epitopami ukrytymi może doprowadzić do takiej ich zmiany, w której będą one aktywowały raczej limfocyty Tregs aniżeli limfocyty efektorowe, co może zatrzymać proces autoimmunologiczny. Stąd, zidentyfikowanie epitopu antygeny, który

bezpośrednio związany jest z procesem patologicznej aktywacji układu immunologicznego zamiast tolerancji, jest pierwszym krokiem do zaprojektowania odpowiedniej antygenowo-specyficznej terapii o wysokiej efektywności.

Na przestrzeni ostatnich lat nastąpił gwałtowny rozwój i wykorzystanie limfocytów Tregs jako terapii komórkowej na całym świecie. Główną ideą wszystkich projektów jest opracowanie inteligentnej immunosupresji, która precyzyjnie hamuje niepożądane reakcje autoimmunologiczne, bez skutków ubocznych w postaci ogólnoustrojowego hamowania układu immunologicznego pacjenta [7]. W badaniach klinicznych są terapie wykorzystujące poliklonalne limfocyty Tregs, natomiast na etapie badań przedklinicznych są preparaty antygenowo-specyficzne.

Cel pracy

Celem pracy było wyjaśnieniem roli komórek antygenowo-specyficznych w regulacji układu immunologicznego w chorobie autoimmunologicznej jaką jest cukrzyca typu 1, a w szczególności udziału komórek T regulatorowych w tym procesie oraz ich możliwego zastosowania w terapii T1D w kontekście ich antygenowo-specyficznych właściwości.

Streszczenie prezentowanych prac

W publikacji *“Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells”* (BioDrugs, 2017) dokonano przeglądu najważniejszych terapii komórkowych z wykorzystaniem komórek T regulatorowych (Tregs) na świecie. Przede wszystkim skupiono się na trwających i zakończonych badaniach klinicznych, dotyczących przeszczepów komórek macierzystych i narządów litych oraz chorób autoimmunologicznych. Ważną częścią przedstawianej publikacji jest poruszenie problemów dotyczących aspektów prawnych oraz technicznych towarzyszących przenoszeniu terapii z etapu badań naukowych do wykorzystania klinicznego. Sama terapia z wykorzystaniem limfocytów Tregs jest obecnie z powodzeniem wykorzystywana na świecie, jednak zauważalne są pewne limity związane z polispecyficzną formą preparatu komórkowego, dlatego prace naukowców skupiają się nad podniesieniem efektywności leczenia poprzez manipulację Tregs w warunkach *in vitro*.

W pracy *„Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization”* (Front Immunol., 2018) opracowano zestaw szczegółowych wytycznych dotyczących przedstawiania wyników badań dotyczących produkcji Tregs. Narzędzie to w znacznym stopniu ułatwia proces opisu badań wprowadzając pewien standard i sprawiając, że są one spójne i bardziej przejrzyste dla innych badaczy. Takie jednolite wytyczne są niezbędne do właściwej interpretacji oraz porównywania wyników badań z różnych ośrodków naukowych.

Praca *„Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes”* (J Transl Med, 2016) zawiera opis wyników z dwuletniej obserwacji dzieci z cukrzycą typu 1, które otrzymały autologiczny, poliklonalny preparat komórkowy CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ Tregs (n=12) oraz nieleczonej grupy kontrolnej (n=10). Przeprowadzone badania wskazują, że funkcje komórek β wysp trzustkowych były najlepiej zachowane w przypadku dzieci leczonych dwiema dawkami preparatu Tregs, a najgorzej w przypadku grupy kontrolnej, czyli nieleczonej Tregs. Zaobserwowano również podwyższony poziom komórek T regulatorowych w krwi obwodowej po podaniu preparatu oraz zmiany fenotypowe charakteryzujące się przesunięciem Tregs z profilu komórek naiwnych (CD62L⁺CD45RA⁺) do komórek pamięci (CD62L⁺CD45RA⁻). W surowicy wszystkich chorych odnotowano wzrost IL-6, natomiast poziom IL-1 i TNF α był podwyższony tylko w grupie nieleczonej.

W pracy *„Proinsulin-specific T regulatory cells control immune responses in type 1 diabetes – implications for adoptive therapy with Tregs”* (BMJ Open Diabetes Res Care., 2020) przedstawiono wyniki badań skupiające się na antygenowo-specyficznym Tregs i ich udziale w odpowiedzi immunologicznej w cukrzycy typu 1 u dzieci. W badaniach zrekrutowano chorych ze świeżo rozpoznaną T1D (n=46) oraz z długo trwającą T1D (n=27). Badania potwierdziły, że progresja choroby jest związana ze starzeniem się limfocytów T, obserwowanym jako przesunięcie w kierunku fenotypu komórek pamięci, skracaniem telomerów, spadkiem odsetka świeżych emigrantów z grasicy oraz ekspansją tych samych klonów wśród limfocytów T efektorowych (Tconvs) i Tregs. Ta ostatnia cecha świadczy o tym, iż najprawdopodobniej te same epitopy aktywują limfocyty Tconvs

i Tregs w T1D. Dodatkowo, w pracy wykazano, że jednymi z najważniejszych epitopów w tym procesie są najprawdopodobniej fragmenty proinsuliny, jako że progresja choroby związana jest ze zwiększonym odsetkiem limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ o specyficzności do epitopów proinsuliny. Odsetek komórek CD4⁺ Tregs i Tconv specyficznych był istotnie wyższy w grupie chorych z długotrwałą T1D, a komórki te wykazywały cechy starzenia się. Dla tych komórek zaobserwowano także przesunięcie w stronę fenotypu komórek pamięci, a dodatkowo dla Tregs spadek świeżych emigrantów z grasicy. Co ciekawe, leczenie poliklonalnymi limfocytami Tregs spowalnia proces starzenia się limfocytów, a sam proces produkcyjny zastosowany w naszej metodzie prowadzi do zwiększonego odsetka limfocytów Tregs specyficznych do fragmentów proinsuliny w preparacie komórkowym od osób chorych na T1D.

W publikacji „*Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies*” (Cytotherapy, 2020) opisano wyniki badań nad nowatorskim sposobem generowania *in vitro* limfocytów T regulatorowych o właściwościach antygenowo-specyficznych. By uzyskać produkt komórkowy o takich właściwościach zastosowaliśmy stymulacje autologicznymi monocytami (jako komórki prezentujące antygeny) wyładowanymi insuliną lub fragmentem 9-23 łańcucha β insuliny, zaś ekspansja Tregs odbywała się w obecności przeciwciał anti-CD28 i anti-CD154.

W testach funkcjonalnych potwierdziliśmy hamującą aktywność produktu komórkowego (hamowanie proliferacji autologicznych limfocytów T efektorowych i hamowanie produkcji przez te komórki interferonu γ). Produkt antygenowo-specyficzny nie był jednorodny pod względem klonalności (wiele różnych klonów odpowiadało na ten sam antygen), jednakże znacząco różnił się pod tym kątem od preparatu poliklonalnego, czy niespecyficznego. Badania pokazały również różną siłę aktywacji Tregs, w zależności od użytego antygeny, co podkreśla ogromne znaczenie, a także trudność w doborze odpowiedniego antygeny by otrzymać jak najlepszą stymulację komórek o jak najlepszym potencjale terapeutycznym.

Wnioski z prezentowanych prac

Wyniki powyższych badań wykazują, że zaawansowany etap choroby ma negatywny wpływ na zmiany w populacji Tregs (zmiana w proporcji komórek naiwnych i pamięci), prawdopodobnie związany ze środowiskiem prozapalnym. Rozpoczęcie terapii powinno się odbyć jak najszybciej, by móc ochronić jak największą ilość wysp trzustki. Co więcej, podanie preparatu Tregs we wczesnej fazie choroby oraz ponowne podanie dawki preparatu po 3 miesiącach, zwiększa efektywność samej terapii (w porównaniu do kontroli nieleczonej i grupy leczonej tylko jedną dawką).

Badania potwierdzają, że progresja cukrzycy typu 1 jest powiązana ze starzeniem się limfocytów T oraz spadkiem różnorodności ich klonów. Preferencyjna ekspansja tych samych grup klonów TCR, zarówno w komórkach T klasycznych, jak i Tregs sugeruje, że odpowiedzialny jest za to ten sam autoantygen. Co ciekawe, terapia z wykorzystaniem Tregs poliklonalnych związana jest ze zwiększoną różnorodnością klonów w komórkach CD4⁺ Tconv i Tregs, dłuższymi telomerami i wyższym poziomem antygenowo-specyficznym, świeżych emigrantów z grasicy wśród komórek T regulatorowych. Limfocyty Tregs, o specyficzności wobec proinsuliny, wydają się być kluczowe w odpowiedzi immunologicznej u chorych na cukrzycę typu 1 i najprawdopodobniej są związane z lepszą kontrolą nad autoagresywnymi limfocytami T. Doświadczenia te można wykorzystać w projektowaniu nowych terapii komórkowych z bardziej precyzyjnymi antygenowo-specyficznymi komórkami.

Autorski sposób generowania Tregs o właściwościach antygenowo-specyficznym pozwala na uzyskanie komórek o wysokiej stabilności czynnika transkrypcyjnego FoxP3 (białka definiującego komórki T regulatorowe i ich inhibitoryjne funkcje) i właściwościach immunosupresyjnych. Wykazano, że komórki te charakteryzowały się wyższym indeksem hamowania proliferacji komórek efektorowych (responderów) oraz zdolnością hamowania wydzielania IFN γ przez te limfocyty. Metoda ta pozwala na wytwarzanie produktu komórkowego Tregs wzbogaconego o limfocyty antygenowo-specyficzne, co jest dobrym punktem startowym do rozwijania terapii komórkowej w oparciu o tą metodę.

Z uwagi na fakt, że komórki T regulatorowe są obiektem intensywnych badań przez wiele wiodących ośrodków badawczych na całym świecie, niezwykle ważne jest by wyniki tych badań były przekazywane w jasny i spójny sposób tak, by mogły one służyć jako podstawa do dalszego rozwoju terapii Tregs.

W ostatnich latach, pomimo problemów legislacyjnych oraz technicznych napotykanym w procesie projektowania terapii komórkowej, dokonano znacznego postępu w kontekście różnych terapii Tregs, co daje nadzieję dla pacjentów z nieuleczalnymi chorobami autoimmunologicznymi. W prace badawcze zaangażowane jest wiele wiodących ośrodków na całym świecie.

Introduction

An immune system that works properly can recognize and destroy foreign and potentially dangerous antigens while tolerating its own antigens. In type 1 diabetes (T1D), this tolerance is broken, which results in the destruction of insulin-producing pancreatic islet cells, with the consequence that the carbohydrate metabolism is disturbed. The onset of the disease usually occurs very late (when most of the pancreas is destroyed), because the initial stage of T1D occurs asymptotically. Currently, treatment of type 1 diabetes is limited to the administration of exogenous insulin and continuous control of blood glucose, which unfortunately does not inhibit further autoimmune process and disease progression [1].

Regulatory T cells (Tregs) constitute a small subpopulation of helper CD4⁺ lymphocytes. The proper maintenance of immune tolerance depends on these cells by suppressing excessive activity of the immune system [2, 3]. Disturbances in the functioning of Tregs lead to the development of various immune diseases, an example of which is the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX). This is the syndrome where, as a result of mutations in the gene encoding the transcription factor FoxP3 (a protein responsible for maintaining the phenotype and function of regulatory T lymphocytes), there is a simultaneous occurrence of numerous autoimmune diseases including T1D [4].

Due to the natural function of Tregs, they have become the subject of research in the therapy of autoimmune diseases. Currently, as a polyclonal (polyspecific) product, they are successfully used, inter alia, in the treatment of T1D in children [5, 6]. Tregs cell specificity is characterized by the large diversity of the T cell receptor (TCR) repertoire. Tregs mostly function by contacting their TCR receptors with MHC class II (Major Histocompatibility Complex) of antigen presenting cells (APCs). Based on autoantigens presented in this context, Tregs are activated and maintain tolerance to self tissues. However, many of autologous antigens are not recognized by Tregs which depends on the process of lymphocyte development in the thymus. The parts of such an antigen which are recognized are called immunodominant epitopes (antigenic determinants that directly bind to TCR) while those not recognized and not presented are called cryptic epitopes [7]. The event where cryptic epitope is presented activates T conventional cells (Tconvs) rather than Tregs. As a result, the autoimmune process is initiated which may finish as autoimmune disease. Interestingly, cryptic epitopes can be manipulated in order to activate Tregs and not Tconvs. Accurately identifying the appropriate epitope of the antigen that is directly related to the pathological activation of the immune system will facilitate the design of appropriate antigen-specific therapy with high efficiency.

In the recent years, there has been rapid development of the research on Tregs lymphocytes as cell therapy worldwide. The main idea of all projects is to develop intelligent immunosuppression that precisely inhibits unwanted autoimmune reactions without side effects in the form of systemic inhibition of the patient's immune system [7].

The vast majority of nowadays trials tests polyclonal Tregs preparations, while antigen-specific T cells are at preclinical stage yet.

The aim of study

The aim of the study was to explain the role of antigen-specific cells in the regulation of the immune system in autoimmune disease such as type 1 diabetes, and in particular the role of regulatory T cells in this process and their possible use in T1D therapy in the context of their antigen-specific properties.

Summary of the presented publications

The publication *"Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells"* (BioDrugs, 2017) provides an overview of the most important cell therapies using regulatory T cells (Tregs) in the world. Above all, the focus was on ongoing and completed clinical trials for stem cell and solid organ transplants and autoimmune diseases. An important part of this publication is to note the problems of legal and technical aspects that accompany the transfer of therapy from the stage of scientific research to clinical use. Tregs lymphocyte therapy alone is currently successfully used in the world, however, there are some limits associated with the polyspecific form of the cell preparation, which is why the scientists' work is focused on increasing the effectiveness of treatment by manipulating Tregs *in vitro*.

In the publication *"Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization"* (Front Immunol., 2018), a set of detailed guidelines was developed for the publication of research results on Tregs production. This tool greatly facilitates the process of research description by introducing a certain standard and making them consistent and more transparent for other researchers. Such uniform guidelines are necessary for the proper interpretation and comparison of research results from different research centers.

The publication *"Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes"* (J Transl Med, 2016) contains a description of the results of a two-year follow-up of children with type 1 diabetes who received the autologous cell product CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻Tregs (n=12) and the untreated control group (n=10). Studies show that β islet cell function was the best preserved in children treated with two doses of Tregs and the worst in the case of untreated Tregs control. Increased levels of regulatory T cells in the peripheral blood were also observed following administration of the product, and phenotypic changes characterized by Tregs shift from naive cell profile (CD62L⁺CD45RA⁺) to memory cells (CD62L⁻CD45RA⁺). The serum of all patients had an increase in IL-6, while IL-1 and TNF α levels were elevated only in the untreated group.

The publication *"Proinsulin-specific T regulatory cells control immune responses in type 1 diabetes – implications for adoptive therapy with Tregs"* (BMJ Open Diabetes Res Care., 2020) presents research results focusing on antigen-specific Tregs and their contribution to the immune response in type 1 diabetes in children. The study recruited patients with newly diagnosed T1D (n=46) and long-term T1D (n=27). Studies have confirmed that disease progression is associated with T-cell immunosenescence seen as a shift towards memory cell phenotype, shortening of telomeres, a decrease in the percentage of recent thymus emigrants, and the expansion of the same clones in classic T-lymphocytes (Tconvs) and Tregs. The last conclusion suggested common autoantigen(s) stimulating both subsets. Further experiments proved that these are fragments of proinsulin which are the most probably responsible. The disease progression was associated with an increased percentage of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes with specificity for proinsulin. The percentage of CD4⁺ Tregs and Tconvs specific cells was significantly higher in the group of patients with long-term T1D and these cells exhibited

immunosenescence features. A shift towards the phenotype of memory cells was also observed for these cells, and additionally for Tregs a decrease in recent thymus emigrants. Interestingly, the treatment with polyclonal Tregs limited immunosenescence. In addition, manufacturing process of the polyclonal Tregs product allowed for enrichment of insulin-specific Tregs.

The publication "*Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies*" (Cytotherapy, 2020) describes the results of research on a novel method of *in vitro* generation of regulatory T cells with antigen-specific properties. To obtain a cell product with such properties, we used stimulation with autologous monocytes (as antigen presenting cells) loaded with insulin or fragment 9-23 of the insulin β chain, and the Tregs expansion was carried out in the presence of anti-CD28 and anti-CD154 antibodies. In functional tests, we confirmed the inhibitory activity of the cell product (inhibition of the proliferation of autologous effector T lymphocytes and inhibition of the production of IFN γ by these cells). The antigen-specific product was not homogeneous in terms of clonality (many different clones responded to the same antigen), however, it differed significantly in this respect from the polyclonal or non-specific products. The research also showed a different strength of Tregs activation depending on the antigen used, which emphasizes the great importance, as well as the difficulty in selecting the appropriate antigen to obtain the best stimulation of cells with the best therapeutic potential.

Conclusions from the presented research

The results of the above studies indicated that the advanced stage of the disease has a negative impact on changes in the Tregs population (change in the proportion of naive cells and memory), probably associated with the pro-inflammatory environment. Therapy should be started as soon as possible to protect as many pancreas islets as possible. Furthermore, the administration of Tregs in the early stages of the disease and the repeated administration of the dose after 3 months increases the effectiveness of the therapy itself (compared to the untreated control and the treatment group with only one dose).

Studies confirm that the progression of type 1 diabetes is associated with T-cell immunosenescence and a decrease in the variability T-cell clones. The preferential expansion of the same groups of TCR clones in both classic T cells and Tregs suggests that the common autoantigen is responsible. Interestingly, therapy using polyclonal Tregs is associated with increased clone diversity in CD4⁺ Tconv and Tregs cells, longer telomers, and higher levels of antigen-specific recent thymus emigrants among regulatory T cells. Tregs with proinsulin specificity appear to be key in the immune response in type 1 diabetes and possibly associated with better control over autoimmune T cells.

The innovative method of generating Tregs with antigen-specific properties allows obtaining cells with high stability of the FoxP3 transcription factor (a protein that defines regulatory T cells and their inhibitory functions) and immunosuppressive properties. It was shown that these cells had a higher inhibitory index of responder cell proliferation and the ability to inhibit IFN γ secretion. This method allows the production of a Tregs cell product enriched with antigen-specific lymphocytes, which is a good starting point for developing cell therapy based on this method.

As regulatory T cells are the subject of intense research by many leading research centers around the world, it is extremely important that the results of these studies are communicated in a clear and consistent manner so that they can serve as a basis for the further development of Tregs therapy.

In recent years, despite legislative and technical problems encountered in the design process of cell therapy, significant progress has been made in the context of various Tregs therapies, which gives hope to patients with terminal autoimmune diseases. Many leading centers around the world are involved in research.

Wykaz stosowanego piśmiennictwa / List of references

1. Gupta S. Immunotherapies in diabetes mellitus type 1. *Med Clin North Am.* 2012;96(3):621–xi. doi:10.1016/j.mcna.2012.04.008
2. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, 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):22–26. doi:10.1016/j.clim.2009.06.001
3. Yi S, Ji M, Wu J, et al. Adoptive transfer with in vitro expanded human regulatory T cells protects against porcine islet xenograft rejection via interleukin-10 in humanized mice [published correction appears in *Diabetes*. 2016 Feb;65(2):534]. *Diabetes*. 2012;61(5):1180–1191. doi:10.2337/db11-1306
4. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(4):430–435. doi:10.1097/00002281-200307000-00010
5. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clin Immunol.* 2014;153(1):23–30. doi:10.1016/j.clim.2014.03.016
6. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015;7(315):315ra189. doi:10.1126/scitranslmed.aad4134
7. Trzonkowski P, Bacchetta R, Battaglia M, et al. Hurdles in therapy with regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015;7(304):304ps18. doi:10.1126/scitranslmed.aaa7721