



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 937251 E**

(51) Classificação Internacional:

G01N 33/53 (2006.01) **C12N 5/06** (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1997.08.12**

(30) Prioridade(s): **1996.09.06 US 25588 P**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.08.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.11.29**
001/2007

(73) Titular(es):

ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.
U.S. ROUTE NO.202, P.O. BOX 300 RARITAN, NJ
08869-0606 US

(72) Inventor(es):

ALAIN, T LUXEMBOURG US
MICHAEL, R. JACKSON US
PER, A. PETERSON US

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS ESPECÍFICAS DE ANTIGÉNIO**

(57) Resumo:

RESUMO

"PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS ESPECÍFICAS DE ANTIGÉNIO"

Foi desenvolvido um novo método para capturar, purificar e expandir linfócitos T específicos de antigénio utilizando esferas magnéticas revestidas com moléculas MHC classe I recombinantes. Este método foi otimizado utilizando populações homogêneas de células T *naïve* purificadas a partir de murganhos transgênicos para o receptor da célula 2C T (TCR). Estas células T e os péptidos antigénicos relevantes foram capturados em esferas revestidas com moléculas MHC classe I. A especificidade de MHC e péptido foi confirmada através da utilização de combinações de péptidos MHC irrelevantes. Foi medido um enriquecimento de 800 a 1600 vezes, utilizando células 2C T misturadas com células T irrelevantes, com início desde uma frequência de células 2C T de 1/3000. A mesma abordagem foi utilizada para purificar células T CD8⁺ específicas de antigénio a partir de células T CD8⁺ totais a partir de murganhos *naïve*. As células recuperadas podem ser expandidas e eliminar especificamente células alvo *in vitro*; estas possuem também um efeito significativo *in vivo*. É esperado que este processo seja adequado para purificar e expandir *in vitro* células T assassinas específicas de vírus e tumores para utilizar em terapêutica celular.

DESCRIÇÃO

"PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS DE ANTIGÉNIO"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção é formulada para um método para derivar linhas de células T específicas de antigénio a partir de uma população heterogénea de linfócitos, incluindo populações de linfócitos T totais de indivíduos *naïve*. Este método é baseado num passo de enriquecimento para linfócitos específicos de antigénio por captura dos linfócitos T específicos de antigénio num substrato revestido com complexos péptido-MHC antigénicos que servem como ligandos para receptores específicos de antigénios das células T, seguido por um passo de expansão utilizando superfícies revestidas com complexos péptido-MHC antigénicos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As respostas imunitárias específicas de antigénio são mediadas por linfócitos B e T efectores, específicos de antigénio. Estas células originam a partir de, geralmente, células precursoras em repouso de frequência reduzida a expressando receptores para vários antigénios representando o reportório completo e as quais, após encontro com antigénios específicos e com coestimulação apropriada, se tornam activas, expandem-se e se diferenciam em células efectoras.

O desenvolvimento de terapia imunológica *ex vivo* para alterações, tais como cancro ou infecções virais, é limitado pela frequência reduzida de linfócitos precursores específicos de antígeno. Por exemplo, as frequências do precursor de CTL específico de vírus (CTLp) nos tecidos linfóides periféricos de murganhos são geralmente mais reduzidas que 1/100000 - 1/1000000 (Lau *et al.*, 1994; Hou *et al.*, 1994). O isolamento de linfócitos específicos de antígeno por captura num suporte revestido por antígeno foi descrito para as células B em repouso, do baço de murganho específicas para TNP (Snow *et al.*, 1983a). O processo de isolamento envolveu um passo em roseta em glóbulos vermelhos de cavalo sujeitos ao hapteno e permitiu a recuperação das células B específicas para o hapteno com um grau de pureza de 40%. Esta técnica foi útil para estudar as necessidades para a activação (Stein *et al.*, 1986), bem como os resultados de sinalização iniciais a seguir à activação (Snow *et al.*, 1986; Myers *et al.*, 1987; Grupp *et al.*, 1987; Noelle e Snow, 1990; Gold e DeFranco, 1994). Contudo, isto é uma situação muito favorável devido à frequência relativamente elevada de células B específicas para TNP (cerca de 1%) (Snow *et al.*, 1983a). Nenhum estudo foi referido até à data de activação de células B utilizando células B específicas em repouso para outro antígeno com frequência reduzida do precursor (Radbruch e Recktenwald, 1995).

A frequência reduzida de precursor também é um problema com células T. Adicionalmente, enquanto as células B reconhecem directamente o antígeno, as células T reconhecem uma estrutura complexa composta da combinação de um péptido antigénico ligado a uma molécula do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). A interacção TCR/Péptido-MHC possui uma afinidade reduzida a moderada (intervalo de 10^{-4} - 10^{-7} M: Matsui *et al.*, 1991; Weber

et al., 1992; Sykulev *et al.*, 1994a; Corr *et al.*, 1994; Sykulev *et al.*, 1994b). Os anticorpos exibem habitualmente afinidades de várias ordens de magnitude superiores e exploram a multivalência. Estão actualmente disponíveis novas técnicas de isolamento de populações de células raras. Estas são baseadas na selecção de células e/ou separação magnética (Bellone *et al.*, 1995; Radbruch and Recktenwald, 1995). Os ligandos recombinantes para TCR estão agora também disponíveis através da combinação de moléculas MHC vazias recombinantes (Jackson *et al.*, 1992) e péptidos antigénicos ligados à MHC (Engelhard, 1994; Ramensee *et al.*, 1995). Estes complexos péptido-MHC sintéticos podem ser imobilizados em esferas para produzir ligandos multivalentes para o TCR. Teoricamente, a multivalência deverá ajudar a ultrapassar a afinidade reduzida. A interacção entre o TCR e o complexo péptido-MHC imobilizado foi previamente demonstrada conduzir ao estabelecimento de interacções estáveis em certos sistemas *in vitro*. Em primeiro lugar, os antigénios MHC classe I imobilizados em monocamadas de lípidos (Nakanashi *et al.*, 1983) ou em esferas do tamanho de células revestidas por lípidos (Kane *et al.*, 1988) são suficientes para causar a ligação de células T citotóxicas alogénicas clonadas (CTL). Em segundo lugar, um CTL geneticamente compatível clonado liga-se a esferas revestidas com MHC de um modo dependente de péptidos (Kane e Mescher, 1993; Mescher, 1995). Em terceiro lugar, um CTL geneticamente compatível clonado pode formar agregados com células RMA-S, uma linha celular que expressa grandes quantidades de moléculas MHC vazias, de um modo específico para o péptido (De Bruijn *et al.*, 1992). Em dois destes relatórios, as interacções TCR-péptido-MHC não foram o mediador primário da adesão. Estas desempenharam, pelo contrário um papel inicial nos eventos precoces de agregação, presumidamente através de sinais de transdução que levaram à activação da adesão através de moléculas acessórias. É

aqui descrito um método para isolar células T específicas de antígeno utilizando moléculas MHC classe I purificadas a partir de células de *Drosophila melanogaster* (Jackson *et al.*, 1992) imobilizadas em esferas magnéticas e carregadas com péptido. Este substrato artificial para as células T é revestido com uma elevada densidade de complexos péptido-MHC idênticos. O isolamento das células T foi otimizado utilizando populações de células T *naïve* purificadas a partir de murganhos transgênicos para o 2C TCR (Sha *et al.*, 1988). Foram identificados ligandos de várias afinidades e especificações para o 2C TCR (Sykulev *et al.*, 1994a, b). As células 2C T poderiam ser adsorvidas em esferas contendo complexos péptido-MHC que possuíam uma afinidade para o 2C TCR tão reduzida como 10^{-4} M. A adsorção foi restringida à MHC e específica de péptidos uma vez que ocorreu apenas com as combinações apropriadas de péptido-MHC reconhecidas pelo 2C TCR. Adicionalmente, as células 2C T misturadas com células T irrelevantes a partir de um animal *naïve* podem ser recuperadas utilizando este processo de adsorção. Esta técnica foi utilizada com sucesso para recuperar células T específicas de antígeno a partir de animais *naïve*.

O documento CA-A-2069541 revela a indução de uma resposta de linfócitos T específica de antígeno numa cultura de linfócitos T. A indução da resposta é alcançada carregando os veículos apresentadores de antígeno que transportam moléculas MHC com um péptido de ligação ao MHC imunogénico da célula T derivado de antígeno.

A. Stryhn *et al.*, (1994) Eur. J. Immunol. 24:1404-1409 revelam o painel de hibridomas de células T MHC classe I específicos de antígeno que foi utilizado para examinar a

capacidade dos complexos péptido-classe I para estimular células T.

K.P. Kane *et al.*, (1993) J. Immunol 150:4788-4797 revelam a activação de CDH dependente da adesão de linfócitos T citotóxicos e a desgranulação através de complexos péptido-antigénio classe I. A activação do CTL necessita do envolvimento de ambos o TCR e o co-receptor CD8.

O documento WO 96/05287 revela um método para o isolamento de células T a partir do sangue periférico utilizando complexos de antigénio MHC.

O documento EP 0814838, que é da técnica anterior apenas para os fins de avaliação da novidade, revela um antigénio apresentando sistema e método para activar as células T. Uma forma de realização da invenção é a matriz contendo proteínas apresentadoras de antigénio sintético. A matriz pode ser utilizada para activar células T CD8⁺ para se tornar citotóxica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método para o isolamento e expansão em cultura de linfócitos T específicos de antigénio a partir de uma população heterogénea de linfócitos. A presente invenção também proporciona um método para preparar uma população de linfócitos T específicos de antigénio de um doente para tratamento da doença ou estados do doente. Esta invenção proporciona uma matriz contendo péptidos Classe I vazios que são funcionais na qual os péptidos Classe I vazios podem aceitar e ligar uma variedade de antigénios. Estas matrizes podem ser

preparadas para conter quantidades específicas predeterminadas de um ou mais antigénios. Tais matrizes são úteis para uma variedade de fins incluindo, mas não limitada a, utilizar nos métodos da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1, Painéis A, B, C e D: Análise da ligação de L^d biotinilado às esferas magnéticas revestidas com avidina utilizando citometria de fluxo.

O painel A apresenta uma curva de resposta à dose dos valores de fluorescência médios de esferas incubadas com quantidades crescentes de L^d, posteriormente coradas com anticorpo anti-L^d 30.5.7 marcado com fluoresceína. O painel B apresenta histogramas de fluorescência verde (FL1) de esferas magnéticas revestidas com avidina não marcadas. O painel C apresenta histogramas de fluorescência verde (FL1) de esferas magnéticas revestidas com avidina após incubação com 3 µg de L^d biotinilado/10⁶ esferas; a coloração foi realizada utilizando anticorpo anti-L^d 30.5.7 marcado com fluoresceína. O painel D apresenta histogramas de fluorescência verde (FL1) de esferas magnéticas revestidas com avidina após incubação com 3 µg de L^d biotinilado/10⁶ esferas; a coloração foi realizada utilizando anticorpo anti-L^d 30.5.7 marcado com fluoresceína.

Figura 2, Painéis A, B, C, D, E e F: Avaliação da formação do complexo de célula 2C T-esfera revestido com L^d na presença de péptidos antigénicos utilizando gráfico de pontos de fluorescência verde (FL1) versus vermelha (FL2). As células foram coradas de verde com fluoresceína; as esferas foram

coradas de vermelho com ficoeritrina. As esferas magnéticas são autofluorescentes; a compensação foi seleccionada de modo a que as esferas coradas com ficoeritrina apresentem a mesma intensidade de fluorescência verde como as esferas não coradas. O painel A apresenta as esferas isoladas. O painel B apresenta as células 2C T isoladas. O painel C apresenta esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença de QL9. O painel D apresenta esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença de p2Ca. O painel E apresenta esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença de SL9. O painel F apresenta esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença do péptido LCMV.

Figura 3, Painéis A, B, C, D, E, F, G e H: Avaliação da formação do complexo célula 2C T-esfera revestido com MHC na presença de péptidos antigénicos utilizando gráficos de pontos por varrimento lateral (SSC) ou varrimento frontal (FSC). Painel A: apresenta as extremidades das regiões contendo as células, as esferas e os complexos célula-esferas. O painel B apresenta as esferas isoladas. O painel C apresenta as células 2C T isoladas. O painel D apresenta esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença de QL9. O painel E apresenta esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença de p2Ca. F: esferas revestidas com L^d e células 2C T incubadas na presença do péptido LCMV. O painel G apresenta esferas revestidas com K^{bm3} e células 2C T incubadas na presença de dEV-8. O painel H apresenta esferas revestidas com K^{bm3} e células 2C T incubadas na presença de E1.

Figura 4, Painéis A, B e C: efeito de vários parâmetros na adsorção de células 2C T nas esferas magnéticas revestidas com MHC. O painel A apresenta a dependência do tempo: as células 2C

T purificadas foram misturadas com esferas revestidas com MHC e péptido e incubadas à temperatura ambiente durante vários períodos de tempo; a ligação das células foi, então, quantificada por citometria de fluxo. O painel B apresenta a dependência da temperatura: foram misturadas células 2C T purificadas com esferas revestida com MHC e péptido e incubadas a várias temperaturas e durante vários períodos de tempo; a ligação das células foi então quantificada por citometria de fluxo. O painel C apresenta dependência de CD8: foram misturadas células 2C T purificadas ou células T CD8⁻ 2C purificadas com esferas revestidas com MHC e péptido, e incubadas à temperatura ambiente durante 3 horas; a ligação das células foi, então, quantificada por citometria de fluxo.

Figura 5 Painéis A, B, C, D e E: enriquecimento em células 2C T utilizando captura em esferas magnéticas revestidas com K^{bm3}, iniciando-se com uma mistura de células 2C T e células T CD8⁺ a uma proporção de 1:3000. O painel A apresenta o histograma de fluorescência verde (FL1) das células 2C T marcadas com fluoresceína. O painel B apresenta o histograma de fluorescência verde (FL1) das células T CD8⁺ purificadas a partir de murganho C57BL/6. O painel C apresenta o histograma de fluorescência verde (FL1) das células 2C T, purificadas, marcadas com fluoresceína, misturadas com células T CD8⁺ de murganho C57BL/6 a uma proporção de 1:3000. O painel D apresenta o histograma de fluorescência verde (FL1) das células eluídas após incubação com esferas magnéticas revestidas com K^{bm3} na presença de dEV-8. O painel E apresenta o histograma de fluorescência verde (FL1) das células eluídas após incubação com esferas magnéticas revestidas com K^{bm3} na presença de E1.

Figura 6: actividade funcional de CTL *in vitro*, derivada de murganhos C57BL/6 *naïve* utilizando adsorção em esferas magnéticas revestidas com K^b-OVA-8 ou K^b-VSV-8. As células T cultivadas foram testadas quanto à citotoxicidade pelo ensaio de libertação de crómio como indicado no Exemplo 4. As células EL4 foram utilizadas como alvos. Os péptidos foram utilizados a uma concentração final de 1 µM.

Figura 7: actividade funcional de CTL *in vitro* derivada de murganho BALB/c *naïve* utilizando adsorção em esferas magnéticas revestidas com L^d-LCMV. As células T cultivadas foram testadas *in vitro* quanto à toxicidade por ensaio de libertação de crómio como indicado no Exemplo 4. Foram utilizados como alvos RMA-S expressando L^d (painel A), BALB/c CL-7 (painel B), MC57 (painel C) ou YAC-1 (painel D). Foram utilizados péptidos a uma concentração final de 1 µM.

Figura 8: actividade funcional de CTL derivada de BALB/c de murganho *naïve* utilizando adsorção em esferas magnéticas revestidas com L^d-LCMV. A actividade *in vivo* em murganhos infectados agudamente com LCMV foi ensaiada como indicado no Exemplo 4. Foram injectados murganhos BALB/c infectados com LCMV com 10⁷ de CTL anti-LCMV NP 118-126 ao dia 1, enquanto 4 murganhos BALB/c receberam apenas PBS. Como um controlo, foram utilizados murganhos LCMV-C57BL/6 quer com 10⁷ de CTL anti-LCMV NP 118-126 ou PBS.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um novo método para derivar linhas de células T específicas de antigénio a partir de

populações de células misturadas, incluindo células T totais a partir de indivíduos *naïve*. Derivar linhas de células T *in vitro* a partir de populações de células T *naïve* coloca vários tipos de problemas: primeiro, as frequências do precursor são tipicamente muito reduzidas, frequentemente inferiores que 10^{-5} ; segundo, as células T *naïve* possuem necessidades especiais para activação, necessitando geralmente de estímulo mais forte do que as células T previamente activadas.

O método da presente invenção compreende dois passos: um passo de isolamento para enriquecer a preparação de células em células T específicas de antigénio, e um passo de expansão *in vitro* para derivar linhas celulares específicas a partir da preparação de células enriquecida. É rapidamente evidente para os especialistas na técnica que esses passos podem ser repetidos, como desejado. O passo de isolamento de células T específicas de antigénio utiliza substratos revestidos com MHC, que após incubação com péptido antigénico e células T, aumenta o isolamento de células T específicas para o complexo péptido-MHC antigénico. Será rapidamente evidente para os especialistas na técnica que uma larga variedade de moléculas MHC são apropriadas para utilizar no método da presente invenção, incluindo, mas não estando limitado a, proteínas MHC clássicas e não clássicas de qualquer mamífero ou espécie de aves, sendo preferidas as proteínas HLA humanas e murina H-2. Será também rapidamente evidente para os especialistas na técnica que as moléculas MHC a partir de uma variedade de fontes são apropriadas para utilizar na presente invenção, incluindo, mas não estando limitadas a, MHC derivado de fontes ocorrendo naturalmente e a partir de fontes recombinantes tais como proteínas MHC expressas em bactérias, células de insectos ou células de mamíferos, sendo preferidas as células de insectos. Adicionalmente, será

rapidamente evidente para os especialistas na técnica que uma larga variedade de substratos revestidos com MHC são apropriados para utilizar na presente invenção, incluindo, mas não estando limitado a, esferas de vidro, esferas de látex, e esferas magnéticas, sendo preferidas as esferas magnéticas. Finalmente, será rapidamente evidente para os especialistas na técnica que uma larga variedade de processos podem ser utilizados para ligar moléculas MHC em substratos para utilizar no método da presente invenção, incluindo, mas estando não limitado a, adsorção passiva, utilização de ligandos cruzados, biotinilação de moléculas MHC para adsorção no substrato revestido com avidina, introdução de um sítio de reconhecimento através de modificação genética de moléculas MHC ou utilização do sítio de reconhecimento natural para adsorção no substrato revestido com anticorpo, sendo preferidos a avidina-biotina e reconhecimento por anticorpo.

Para estabelecer o processo, a combinação de vários recursos foi utilizada: primeiro, foram utilizadas moléculas de MHC recombinantes produzidas em células de *Drosophila melanogaster* (Jackson *et al.*, 1992), que permitiu a utilização de proteína de MHC carregada homogeneamente com o mesmo péptido; segundo, foram utilizadas células T *naïve* purificadas a partir de nódulos linfáticos de murganhos transgênicos para o 2C TCR (Sha *et al.*, 1988), estas células expressam homogeneamente o mesmo TCR ao mesmo nível. Isto permitiu a análise a um nível celular único. Também foram utilizados vários complexos péptido-MHC diferentes cujas afinidades para o 2C TCR foram recentemente determinadas (Sykulev *et al.*, 1994a, b). Isto torna possível pesquisar o processo utilizando complexos com várias afinidades. As moléculas MHC classe I que foram utilizadas incluíram L^d, K^b e K^{bm3}. Uma vez que o clone de células T citotóxicas 2C foi

derivado a partir de murganhos BALB.B (H-2^b) (Sha et al., 1988), L^d e K^{bm3} são elementos de restrição alogénicos para o 2C TCR enquanto que K^b é geneticamente compatível. Foram utilizados L^d, K^b e K^{bm3} biotinilados imobilizados em esferas magnéticas revestidas com avidina. As células 2C T foram adsorvidas em tais esferas na presença de vários péptidos antigénicos. A adsorção foi observada na presença de complexos péptido-MHC com uma afinidade para o 2C TCR num intervalo 10⁻⁴-10⁻⁷ M, utilizando L^d, K^{bm3} ou K^b como elemento de restrição. Finalmente a adsorção foi específica, uma vez que os péptidos de controlo não causaram interacção entre esferas revestidas com MHC e células 2C T.

As características de adsorção das células T nas esferas revestidas com MHC foram estudadas posteriormente: a adsorção esteve dependente do tempo, estabilizando num patamar entre 1 a 4 horas quando realizada à temperatura ambiente. A adsorção começou a decrescer para além desse tempo, o que pode reflectir a iniciação de um processo de desadesão. A adsorção foi também dependente da temperatura: foi ligeiramente inferior a 37 °C do que à temperatura ambiente para 3 dos complexos péptido-MHC examinados, e foi ainda dramaticamente mais reduzida do que à temperatura ambiente para um outro. Isto é devido ao decréscimo na estabilidade das moléculas MHC a uma temperatura superior. A adsorção a 4 °C foi bastante inferior do que à temperatura ambiente a qual foi provavelmente uma consequência das mudanças na fluidez da membrana celular à temperatura reduzida que reduz as associações moleculares. Adicionalmente, alguns resultados de sinalização, que ocorrem apenas a uma temperatura mais elevada, podem contribuir para adsorção, como indicado num relatório prévio acerca do papel da CD8 na adesão induzida pela interacção TCR-antigénio (Kane e Mescher, 1993). De um modo interessante, a dependência de CD8 da formação do complexo célula-esfera variou

de acordo com o antígeno utilizado. De entre os peptídeos testados, os mais dependentes de CD8 foram p2Ca e dEV-8, que foram isolados como ocorrendo naturalmente à superfície das células apresentando o antígeno; QL9 e SIYR, que não foram encontrados na superfície da célula, foram independentes de CD8. Em qualquer caso, a dependência de CD8 na captura das células T em esferas revestidas com MHC não foi completamente correlacionada com a afinidade do TCR ao ligando. Finalmente, a captura não foi completamente correlacionada com a afinidade do TCR ao ligando, uma vez que foi observada consistentemente a captura com K^{bm3} -dEV-8 ($1,8 \times 10^4 M^{-1}$), K^b -SIYR ($3,1 \times 10^4 M^{-1}$) ou K^{bm3} -SIYR ($3,4 \times 10^4 M^{-1}$), mas não com L^d -p2Ca-A3 ($2 \times 10^4 M^{-1}$) ou K^b -dEV-8 ($1,2 \times 10^4 M^{-1}$). A captura foi observada ou não com L^d -SL9 ($1,4 \times 10^4 M^{-1}$), de acordo com as séries de L^d . Isto é consistente com a previsão de que conhecendo a afinidade de um único TCR para um dado complexo peptído-MHC não é provavelmente suficiente para fazer previsões acerca das interações ao nível da célula total (Agrawal e Linderman, 1996). É adiantado que as esferas revestidas com MHC serão úteis como sondas para estudar as regras do reconhecimento do antígeno através das células T.

Para pesquisar a adequação desta técnica para recuperar uma população de precursores CTL específicos de antígeno de frequência reduzida, foi tentado recuperar células 2C T misturadas com células T irrelevantes a partir de um animal naïve. Foi demonstrado que o processo da presente invenção permitiu a purificação de células T específicas de antígeno em cerca de 800 a 1600 vezes num passo de purificação, com início numa frequência de células 2C T tão reduzida como 0,03%. A recuperação das células foi cerca de 50% ao utilizar complexos peptído-MHC de reduzida afinidade para o 2C TCR tal como K^{bm3} -dEV-8 e K^b -SIYR, e alcançou 90-100% com a elevada afinidade

do complexo L^d-QL9. A pureza final das células 2C T foi $47,6 \pm 2,1\%$ ao utilizar K^b, o elemento de restrição geneticamente compatível para o 2C TCR, e $24,8 \pm 6,9\%$ ao utilizar L^d, um elemento de restrição alogénico. Isto sugere que esta diferença pode estar relacionada devido às células T anti-L^d alogénicas serem capturadas utilizando esferas revestidas com L^d. Isto significaria que algumas células não-2C eluídas a partir das esferas foram especificamente capturadas. Considerados em conjunto, estes resultados demonstraram que este método foi apropriado para purificar precursores de células T de frequência reduzida a partir de um animal *naïve*, incluindo células cujo TCR teria uma afinidade reduzida para o complexo péptido-MHC.

Foi também demonstrado que o processo de isolamento da presente invenção, quando utilizado em combinação com um novo passo de expansão de células T *in vitro*, foi utilizável para enriquecer em precursores CTL a partir de murganhos *naïve*. O passo de expansão das células foi baseado na cultura de células isoladas em placas de cultura de tecidos revestidas com complexos péptido-MHC e anticorpo anti-CD28. Será rapidamente evidente para os especialistas na técnica que outras moléculas co-estimuladoras são apropriadas para utilizar no método da presente invenção, incluindo, mas não estando limitado a, anticorpo anti-CD28, outros ligandos de CD28 tais como B7-1 e B7-2, ou ligandos ou anticorpos para outras moléculas co-estimuladoras de células T tais como integrinas e outras moléculas de adesão de células, ou citocinas tais como interleucina-2 ou interleucina-4, ou qualquer sua combinação. É notável que outros protocolos de expansão clássicos, incluindo estimulação com concanavalina A ou com anticorpo anti-TCR, não permitiriam que CTL específico de antigénio fosse derivado a

partir de populações de linfócitos *naïve*. Isto é provavelmente devido às células não estarem 100% puras após o isolamento e assim necessitam que seja recuperada alguma estimulação específica. Adicionalmente, é necessária uma elevada densidade de ligandos homogêneos para activar as células T não iniciadas, que é proporcionada pelo método da presente invenção, bem como pela utilização de células de insecto expressando MHC como células apresentando antigénio (Cai *et al.*, 1996), mas não através da utilização de células apresentando antigénio clássico que apresentam uma população heterogénea de antigénios na sua superfície. Adicionalmente, este sistema de expansão totalmente sintético da presente invenção não necessita da utilização de células apresentando antigénio exógeno, o que elimina potenciais complicações tais como contaminação ou iniciação cruzada. De um modo interessante, não foi necessário destacar células a partir das esferas magnéticas revestidas com MHC utilizadas para isolamento anterior à expansão, o que reduz o tempo de manipulação. Contudo, se desejado, os linfócitos T específicos de antigénio podem ser eluídos ou removidos a partir do substrato para cultura ou para outros propósitos. Os linfócitos T podem ser eluídos utilizando uma variedade de técnicas conhecidas para os especialistas na técnica, tal como incubação prolongada e/ou adição de um anticorpo anti-MHC. Utilizando este método, CTL específico do vírus LCM pode ser derivado de murganhos BALB/c não infectados utilizando esferas magnéticas revestidas com L^d e péptido da nucleoproteína LCMV. O enriquecimento ocorreu certamente uma vez que foram específicas de antigénio pelo menos uma célula em 10^4 células recuperadas, quando comparado com uma frequência do precursor de menos do que 10^{-5} num animal *naïve* (Oehen *et al.* 1992, Lau *et al.*, 1994). Adicionalmente, células T $CD8^+$ totais, não separadas, do mesmo animal, cultivadas nas mesmas condições, não produziram a mesma

actividade CTL específica. Finalmente, a actividade CTL específica foi medida após apenas uma reestimulação, que indica fortemente uma elevada frequência do precursor de células T específico a seguir ao processo de enriquecimento. Foi também utilizado o processo de enriquecimento da presente invenção para recuperar CTL específico de OVA-8 bem como CTL específico de VSV-8 a partir de murganhos C57BL/6. O enriquecimento foi específico uma vez que nenhum CTL específico de VSV-8 pode ser cultivado a partir de células capturadas utilizando esferas revestidas com K^b-OVA-8, e nenhum CTL específico de OVA-8 pode ser cultivado a partir de células capturadas utilizando esferas revestidas com K^b-VSV-8. A frequência do precursor de CTL de CTL específico de OVA-8 na população enriquecida após captura com esferas revestidas com K^b-OVA-8 foi aproximadamente de 1/3500. Assim, o enriquecimento ocorreu certamente desde que a frequência do precursor para CTL anti-OVA-8 em murganhos C57BL/6 naïve seja 1/30000 (Dillion et al., 1994). Contudo, o enriquecimento pareceu ser mais reduzido do que o esperado a partir das experiências utilizando células 2C T (Tabela II). Isto não é surpreendente porque as medições com células 2C T reflectem directamente a capacidade do passo de enriquecimento, uma vez que, nas experiências com início a partir de células T CD8⁺, o enriquecimento foi provavelmente subestimado: algumas células CD8⁺ podem ter sido capturadas e expandidas sem exibirem uma actividade citotóxica, ou poderiam ter sido capturadas mas não crescerem em cultura, ou poderiam ter tido uma interacção muito fraca com as esferas revestidas com MHC para serem "capturáveis". É provável que a captura torne as células T não reactivas porque as células 2C T podem ser expandidas em CTL após captura.

A separação magnética provou ser o método de escolha para purificar populações de células raras. Estas incluem células sanguíneas progenitoras hemopoiéticas periféricas humanas (purificação desde 0,18% a 54,4%, enriquecimento de 300 vezes, >39% de recuperação) (Kato e Radbruch, 1993), explosão no sangue periférico humano de unidades formadoras de eritróides (purificação desde 0,04% a 56,6%, 1400 vezes de enriquecimento, 13% de recuperação) (Sawada *et al.*, 1990), e linfócitos B que expressam IgA₁ no sangue periférico (purificação desde 0,1-1,5% até 80%, até 80% de recuperação) (Irsch *et al.*, 1994). O método da presente invenção para o enriquecimento das células T específicas de antígeno é substancialmente melhor que estes métodos, como avaliado pelos números de enriquecimento e recuperação. Isto é especialmente significativo desde que os métodos de purificação anteriormente mencionados utilizarem anticorpos como ligandos para as células específicas; os anticorpos possuem afinidades para os antígenos que são muito superiores que aquelas para os complexos péptido-MHC para TCR. O método da presente invenção é útil também para a purificação de células através de outros ligandos de reduzida afinidade para as moléculas da superfície celular, ligandos de reduzida afinidade significando moléculas que possuem uma afinidade reduzida demais para permanecer ligada estavelmente à superfície celular quando utilizada na forma solúvel. Em contraste, os ligandos de elevada afinidade, tais como anticorpos, permanecem ligados estavelmente na superfície celular quando utilizados na forma solúvel.

De um modo interessante, embora seja possível a marcação fluorescente das células T específicas de antígeno (Altman *et al.*, 1996), a selecção de células por citometria de fluxo poderia não ser um substituto para a separação magnética porque os precursores das células T são habitualmente raros demais para

serem detectáveis na citometria de fluxo, e a velocidade de análise e selecção permanece um factor limitante. Em contraste, a separação magnética pode ser utilizada para separar populações raras de células T específicas de antígeno, bem como para seleccionar rapidamente grandes números de células. Estas características tornam o isolamento magnético um processo atractivo para derivar células T específicas de antígeno para utilização clínica.

Em conclusão, este é o primeiro relato de um método de purificação de células T específicas de antígeno que é aplicável a indivíduos *naïve*. Foi demonstrado que este pode ser aplicado a várias moléculas MHC diferentes e a uma variedade de péptidos. O método da presente invenção é utilizável numa variedade de situações, incluindo, mas não estando limitado à, utilização para derivar linhas celulares de células T citotóxicas específicas de vírus ou tumor a partir de sangue periférico humano. As células derivadas utilizando o método da presente invenção são elas próprias úteis para uma variedade de propósitos incluindo, mas não estando limitadas a, expansão em cultura e reinfusão num doente, análise de diagnóstico, e outras aplicações terapêuticas.

São proporcionados os Exemplos seguintes para o propósito de ilustrar a presente invenção sem, contudo, limitar o âmbito da presente invenção para os seguintes exemplos.

EXEMPLO 1

Ligação de moléculas MHC classe I biotiniladas em esferas magnéticas revestidas com avidina

As moléculas MHC classe I solúveis L^d , K^b e K^{bm3} foram expressas em células de *Drosophila melanogaster* (Jackson et al., 1992) e purificadas como anteriormente descrito (Sykulev et al., 1994a). A biotinilação foi realizada utilizando biotina-BMCC (Pierce, Rockford, IL) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram revestidos Dynabeads M500 (Dynal, Lake Success, NY) com neutravidina (Pierce, Rockford, IL), e subsequentemente incubados com moléculas MHC classe I biotiniladas diluídas em PBS contendo FCS a 3% durante 2 horas a 4 °C sob agitação suave. As esferas foram depois lavadas 3 vezes em DMEM contendo FCS a 10% e incubadas durante 1 hora com péptido a 20 μ M. As esferas foram então lavadas imediatamente para a adsorção das células.

Foi utilizado L^d biotinilado como um modelo de teste para estudar a ligação do MHC classe I biotinilado com esferas magnéticas revestidas com avidina. Foram incubadas com esferas várias quantidades desta molécula. As esferas foram então coradas utilizando uma conformação marcada com fluoresceína sensível ao anticorpo monoclonal anti- L^d 30.5.7. A ligação de L^d foi avaliada por análise de citometria de fluxo. O valor médio de fluorescência aumentou linearmente com a quantidade de L^d entre 0 a 1,5 μ g de L^d / 10^6 esferas, e alcançou um patamar a 3 μ g de L^d / 10^6 esferas como apresentado na Figura 1A. A quantidade necessária de L^d para alcançar a saturação foi a mesma com várias séries de esferas e de L^d biotinilado. Para

quantificar o número de moléculas MHC imobilizadas por esfera, foram medidas as concentrações de moléculas de MHC classe I em solução antes e depois da ligação utilizando um ensaio imunológico de fase sólida como se segue: moléculas L^d de MHC classe I foram adsorvidas em 6,8 µm de esferas de sulfato de látex de polistireno (Interfacial Dynamics Corporation, Portland, OR) que foram revestidas com 28-14-8S anti-L^d (ATCC, Rockville, MD); as esferas foram então coradas utilizando anti L^d 30-5-7 marcado com fluoresceína; os valores de fluorescência média (MFV) foram medidos por citometria de fluxo. Uma curva de referência foi estabelecida com concentrações conhecidas de L^d e foi traçado MFV versus as concentrações. Verificou-se ser de $1,23 \pm 0,10 \times 10^6$ moléculas por esfera a quantidade do L^d imobilizado em condições de saturação. Os histogramas de fluorescência apresentam a fluorescência das esferas não coradas (Figura 1B) e das esferas adsorvidas com quantidades em saturação de L^d (Figura 1C). A ligação ocorreu através da interação avidina-biotina uma vez que as moléculas não biotiniladas não se ligam às esferas (Figura 1D). As esferas revestidas com K^b e K^{bm3} foram preparadas e testadas utilizando a mesma técnica. A saturação foi alcançada, utilizando o mesmo intervalo de concentrações como para L^d.

EXEMPLO 2

Captura de células T específicas de antígeno em esferas magnéticas revestidas com MHC classe I na presença de péptidos antigénicos

Murganhos e linhas celulares. Os murganhos BALB/c (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b) foram da Harlan Sprague Dawley (San Diego, CA). Os

murganhos transgênicos 2C (Sha *et al.*, 1988) cresceram no biotério R. W. Johnson P. R. I. Todos os murganhos foram mantidos sob condições específicas livres de patógenos. As células RMA.S expressando L^d (Cai e Spent, 1996), e as células EL4 (H-2^b, obtidas da ATCC, Rockville, MD) foram utilizadas como células alvo nos ensaios CTL. O hibridoma IB2 anti-clonotípico foi descrito previamente (Kranz *et al.*, 1994).

Purificação de células T CD8⁺ a partir de murganhos normais

A purificação foi realizada a 4 °C sob condições estéreis. Os nódulos linfáticos inguinais, axilares, cervicais, ilíacos e mesentéricos de murganho foram dissecados e separados numa única suspensão celular. As esferas magnéticas revestidas com avidina (Dynal, Lake Success, NY) foram revestidas com Ig de cabra anti-murganho biotinilada (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) e, depois, incubadas com a suspensão de células para adsorver células que expressam Ig. As células não adsorvidas foram, então, incubadas com 2 µg/mL H129.19 (anti-CD4, Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 1 µg/mL AF6-120.1 (anti-I-A^b, Pharmingen, San Diego, CA), 1 µg/mL KH74 (anti-I-A^b, Pharmingen, San Diego, CA) e 1 µg/mL 34-5-3 (anti-I-A^{d,b}, Pharmingen, San Diego, CA) para murganhos com fundo de H-2^b; ou com 2 µg/mL de H129.19 e 1 µg/mL de 34-5-3 para murganhos com um fundo de H-2^d. As células foram então lavadas 3 vezes e foram eliminadas por adsorção em esferas magnéticas revestidas com Ig de ovelha anti-rato (Dynal, Lake Success, NY) as células expressando CD4 e MHC classe II. A pureza alcançou 90 a 94% de células CD8⁺ como avaliado por coloração dos anticorpos e citometria de fluxo.

Purificação de células 2C T a partir de murganhos transgênicos 2C

Foram purificadas células 2C T de nódulos linfáticos de murganho de acordo com o processo anteriormente descrito. As células purificadas foram 97-98% reactivas com o anticorpo 1B2 anti-clonotípico. Adicionalmente, também podem ser preparadas células CD8⁻ (CD4⁻) removendo as células CD8⁺ com o anticorpo anti-CD8a 53-6.7 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) e esferas magnéticas revestidas com Ig anti-rato de ovelha.

Péptidos

Os péptidos ligados a L^d e K^b utilizados nestes estudos foram sintetizados nos aparelhos da Applied Biosystem 430A e 431A através do método de síntese de péptidos em fase sólida de referência (química tBoc). As sequências dos péptidos foram como se segue:

QL9:	QLSPFPFDL [SEQ.ID.Nº:1]
p2Ca:	LSPFPFDL [SEQ.ID.Nº:2]
SL9:	SPFPFDLLL [SEQ.ID.Nº:3]
p2Ca-A3:	LSAFPFDL [SEQ.ID.Nº:4]
dev-8:	EQYKFYSV [SEQ.ID.Nº:5]
SIYR:	SIYRYYGL [SEQ.ID.Nº:6]
LCMV:	RPQASGVYM [SEQ.ID.Nº:7]
MCMV:	YPHFMPNTL [SEQ.ID.Nº:8]
OVA-8:	SIINFEKL [SEQ.ID.Nº:9]
VSV-8:	RGYVYQGL [SEQ.ID.Nº:10]
EI:	EIINFEKL [SEQ.ID.Nº:11]

Adsorção de células 2C T em esferas magnéticas revestidas com MHC

Para testar a capacidade das esferas revestidas com MHC classe I para capturar células T específicas de antigénio, foram utilizadas esferas magnéticas revestidas com L^d , K^{bm3} ou K^b , e células T purificadas a partir de murghinhos transgénicos 2C TCR. O 2C TCR foi extensivamente caracterizado e foram referidos vários péptidos antigénicos, reconhecidos com várias afinidades em associação com L^d (Tabela I) (Sykulev *et al.*, 1994 a, b). Para além disso, K^{bm3} e K^b foram recentemente demonstrados servir como elementos de restrição para o 2C TCR em associação com os péptidos dEV-8 e SIYR (Tallquist e Pease, 1995; Ukada *et al.*, 1996; Tallquist *et al.*, 1996). Foi recentemente determinado que as afinidades dos complexos K^{bm3} -dEV-8 e K^b -SIYR para o 2C TCR foram $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectivamente. A não ser que mencionado em contrário, foram revestidas esferas com quantidades saturadas de moléculas L^d , K^{bm3} ou K^b biotiniladas.

As células foram suspensas com esferas para alcançar uma concentração final de 10^7 esferas/mL. As concentrações das células foram 10^6 /mL nas Figuras 2, 3 e 4, e 10^7 /mL nas Figuras 5, 6 e 7. Os péptidos foram adicionados a uma concentração de 20 μM . A adsorção foi realizada sob agitação suave para as durações de tempo e sob as temperaturas indicadas no texto. As células adsorvidas às esferas foram depois contadas no microscópio. Em casos onde uma roseta definitiva (3 esferas ou mais por célula) não foi observada, a ligação foi testada por extraíndo a pequenos toques na lamela. Após incubação à temperatura ambiente na presença do péptido QL9 de elevada afinidade, péptido p2Ca de afinidade intermédia, e péptido SL9 de afinidade reduzida, a maioria das células 2C T ligaram-se a

esferas revestidas com L^d , como avaliado por examinação microscópica após 4 horas de incubação (Tabela I). Foram obtidos resultados semelhantes (60-80% das células capturadas) em 5 experiências independentes. A ligação da célula foi específica desde que não ocorra na presença de complexos L^d -LCMV e L^d -MCMV não reactivos para 2C.

A adsorção foi também quantificada por citometria de fluxo utilizando um FACSScan® (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA) registando gráficos de pontos quer de fluorescência verde *versus* vermelha, ou gráficos de pontos de varrimento frontal *versus* lateral. Para aceder à formação do complexo célula-esfera utilizando gráficos de pontos de fluorescência verde *versus* vermelha, as esferas foram marcadas a vermelho com ficoeritrina (Figura 2A: esferas isoladas) e as células foram marcadas em verde com NHS-fluoresceína (Pierce, Rockford, IL) (Figura 2B: células isoladas). A formação do complexo célula-esfera foi avaliada pelo aparecimento de resultados verdes (G) e vermelhos (R). A percentagem de células complexadas às esferas, foi calculada como a proporção $RG/G+RG$, em que G é o número de resultados no quadrante inferior direito e RG é o número de resultados no quadrante superior direito. Foi verificado que nos tais gráficos de pontos fluorescentes verdes *versus* vermelhos (Figura 2), a formação de complexos célula-esfera foi francamente aparente na presença dos péptidos antigénicos QL9 (Figura 2C), p2Ca (Figura 2D) e SL9 (Figura 2E), com mais de 85% das células alterando-se para um valor elevado de fluorescência vermelha. Alguns resultados com cor vermelha e verde (2,2%) foram detectados na amostra incubada com um péptido de controlo (LCMV) (Figura 2F). Isto foi devido mais provavelmente à adsorção não-específica de uma pequena quantidade de fragmentos de células marcados com fluoresceína às esferas.

Os gráficos de pontos de varrimento lateral *versus* frontal foram também úteis para esta quantificação, devido ao facto que as células (Figura 3C) e as esferas (Figura 3B) possuíam varrimentos laterais e frontais muito diferentes, que tornou fácil de delinear regiões claramente distintas (Figura 3A) contendo as populações de resultados apresentando células e esferas respectivamente. O aparecimento de uma população adicional com resultados com um varrimento frontal superior do que as esferas e um varrimento lateral superior do que as células, reflectiu a formação do complexo célula-esfera; isto permitiu definir a região do complexo, distinta das regiões da célula e esfera. A percentagem das células adsorvidas às esferas foi calculada como a proporção $CO/CO+CE$, em que CO foi o número de resultados na região do complexo e CE era o número de resultados na região da célula. Tais medições de varrimento frontal *versus* lateral demonstraram adsorção específica de antigénio das células 2C T às esferas: na experiência apresentada na Figura 3, 91,0% e 78,9% das células foram adsorvidas a esferas revestidas com L^d na presença de QL9 (Figura 3D) e p2Ca (Figura 3E) respectivamente e 63,8% das células foram adsorvidas a esferas revestidas com K^{bm3} na presença de dEV-8 (Figura 3G) e 75,7% das células foram adsorvidas a esferas revestidas com K^b na presença de SIYR (não apresentado) após 4 horas de incubação. Várias populações, que diferiram pelos seus valores de varrimento lateral, foram visíveis na região do complexo; estes apresentavam provavelmente complexos contendo números diferentes de esferas. Foram verificados na região do complexo na presença de complexos L^d -LCMV não reactivo a 2C (Figura 3F), K^{bm3} -E1 (Figura 3H) e K^b -E1, respectivamente 2,6%, 1,1% e 0,2% de resultados.

Foi utilizada análise por citometria de fluxo para quantificar a influência de vários parâmetros na formação do complexo célula-esfera. A ligação das células às esferas esteve dependente do tempo. A ligação foi detectável após 5 min de incubação, aumentou subsequentemente para alcançar um patamar entre 1 e 4 horas, e diminuiu notavelmente após 6 horas (Figura 4A). As cinéticas da adsorção foram notavelmente paralelas para vários complexos péptido-MHC. A ligação foi também dependente da temperatura, como é mostrado na Figura 4B. A 4 °C, apenas uma pequena percentagem de células foi capturada nas esferas, mesmo após incubação prolongada. A adsorção à temperatura ambiente foi muito similar à adsorção a 37 °C com a exceção de L^d-p2Ca, para o qual os níveis de ligação a 37 °C foram cerca de 25% dos valores medidos à temperatura ambiente, consistente com a incapacidade de p2Ca estabilizar L^d a 37 °C (Cai e Sprent, 1996). Finalmente, a captura da célula dependente de CD8 variou com o complexo péptido-MHC: por exemplo, as capturas de L^d-QL9 e K^{bm3}-SIYR foram largamente independentes de CD8, enquanto que L^d-p2Ca e K^{bm3}-dEV-8 exibiram dependência de CD8 (Figura 4C).

EXEMPLO 3

Recuperação de células T específicas de antígeno misturadas com células T irrelevantes

As frequências do precursor das células T num animal *naïve* são tipicamente reduzidas. Foi verificado que as esferas magnéticas eram apropriadas em outros sistemas para enriquecer as populações de células de frequência reduzida (Sawada *et al.*, 1990; Kato e Radbruch, 1993). Para avaliar se as esferas magnéticas revestidas com MHC classe I poderiam ser utilizadas

para o enriquecimento do precursor das células T, foram misturadas células 2C T marcadas com fluoresceína com células T CD8⁺ purificadas a partir de murganhos *naïve* C57BL/6. Após incubação com esferas magnéticas revestidas com MHC na presença de péptido, as células adsorvidas foram eluídas e contadas, e a percentagem de células 2C T foi determinada por citometria de fluxo. Na experiência apresentada na Figura 5, as células 2C T não foram detectáveis na frequência inicial de 0,03%. Na adsorção seguinte utilizando esferas revestidas com K^{bm3} e péptido dEV-8 foi observado um pico conclusivo de fluorescência verde, exibindo a mesma intensidade que a população original de células 2C T coradas com fluoresceína. Este pico representou 65,1% das células eluídas. Nenhum pico foi observado quando foi utilizado um péptido de controlo em vez de dEV-8. Foi alcançado um enriquecimento de 800-1600 vezes em células 2C T em experiências comparáveis utilizando esferas revestidas com 3 diferentes complexos péptido-MHC (tabela II). Em todos os casos, as células não fluorescentes na população eluída representaram apenas uma reduzida fracção da população de células inicial (~0,2%).

EXEMPLO 4

Isolamento e expansão *in vitro* de CTL específico de antígeno de murganhos *naïve*

Citotoxicidade mediada por célula *in vitro*

Foram utilizadas como células alvo, células RMA.S expressando L^d, células EL4 (H-2^b), células MC57 (H-2^b) infectadas com LCMV Armstrong (48 h.; multiplicidade de

infecção: 1 PFU por célula) ou células CL-7 (H-2^d) de BALB/c infectadas com LCMV Armstrong (48 h.; multiplicidade de infecção: 1 PFU por célula). As células alvo foram carregadas com 100 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear, Wilmington, DE) por 10⁶ células a 37 °C durante 60 min, na presença de FCS a 20%. Estas foram lavadas três vezes e divididas em alíquotas em placas de 96 poços com 4000 a 10000 células por poço. Os péptidos e células efectoras foram então adicionadas. O volume final foi de 200 µL/poço. As placas foram incubadas a 37 °C durante 5 horas. Foram recolhidos cem µL de sobrenadante e contados num contador gama. A percentagem de lise específica foi calculada como reportado previamente (Wunderlich e Shearer, 1991).

Ensaio in vivo para a actividade de CTL

Os murganhos receptores foram injectados no dia 0 com 2x10³ PFU de LCMV Armstrong i.v. e transferidos adoptivamente i.v. com as células no dia 1. No dia 2, os murganhos foram sacrificados, e os baços foram ensaiados quanto aos títulos de vírus infecciosos por placa de ensaio em células Vero como anteriormente descrito (Byrne e Oldstone, 1984). Os títulos de vírus foram expressos como unidades formadoras de placas por grama de tecido (pfu/g).

Cultura celular

As células adsorvidas nas esferas foram recuperadas lavando as esferas 3 vezes como DMEM contendo FCS a 10%, e depois cultivadas em placas de 96 poços revestidas com a molécula de

MHC classe I e anticorpo anti-CD28 na presença de péptido a 10 μ M; estas condições são suficientes para activar as células 2C T em repouso. As placas de poços de fundo planos foram utilizadas para assegurar que cada célula esteja em contacto com as moléculas estimuladoras imobilizadas. Após 2 dias de cultura a 37 °C sob atmosfera húmida contendo CO₂ a 8%, metade do volume de meio foi substituído por meio fresco contendo 20% de sobrenadante da cultura de esplenócitos de rato activados por concanavalina A (sobrenadante conA). Após 8-12 dias, as células foram reestimuladas com células do baço pulsadas com péptido a 1 μ M, e cultivadas na presença de sobrenadante de conA a 10% e TGF β ₁ a 2 ng/mL (Lee e Rich, 1991; Zhang *et al.*, 1995).

Criação de linhas de CTL específicas de antigénio a partir de células T de murganhos naïve utilizando adsorção em esferas magnéticas revestidas com MHC; especificidade do antigénio do passo de isolamento

Para investigar se o método de captura seria aplicável para isolar células T específicas de antigénio a partir de um animal naïve, foram incubadas duas alíquotas de células T CD8⁺ purificadas a partir de nódulos linfáticos de murganhos C57BL/6 (haplotipo H-2^b) com esferas magnéticas revestidas com K^b na presença quer do péptido OVA-8 (alíquota 1) ou do péptido VSV-8 (alíquota 2) durante 4 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as células foram colocadas em cultura em 12 poços de uma placa de 96 poços revestida com K^b e mAb anti-CD28, na presença do péptido OVA-8 ou VSV-8 a 10 μ M. As culturas foram processadas como indicado no parágrafo anterior. O crescimento celular foi visível após 7 dias nos poços contendo células adsorvidas. As células foram reestimuladas ao dia 9 em células

de alimentação, e testadas quanto à actividade citotóxica ao dia 18. As células da alíquota 1 cultivadas com OVA-8 apresentaram actividade específica de CTL para o péptido OVA-8 (Figura 6A), e as células da alíquota 2 cultivadas com VSV-8 apresentaram actividade específica de CTL para VSV-8 (Figura 6C). Os controlos foram proporcionados por combinação reversa: as células capturadas utilizando péptido OVA-8 não continham precursores de CTL anti-VSV-8 detectáveis, uma vez que estes não criaram CTL anti-VSV-8 quando VSV-8 foi utilizado em vez de OVA-8 para os activar na cultura (Figura 6B); de um modo similar, as células capturadas utilizando péptido VSV-8 não continham precursores de CTL anti-OVA-8 (Figura 6D).

Para obter uma estimativa das frequências de CTLp após enriquecimento, repetiu-se a experiência de enriquecimento utilizando esferas revestidas com K^b e péptido OVA-8. Numa experiência representativa, as 12000 células que foram recuperadas por adsorção para esferas magnéticas revestidas com K^b -OVA-8 foram divididas em alíquotas e cultivadas separadamente em 12 poços de placas de 96 poços imediatamente após captura. Os CTL específicos foram recuperados a partir de células capturadas cultivadas em 3 poços, indicando que a frequência do precursor após captura foi aproximadamente de 1/3500. Foram obtidos resultados semelhantes em três experiências independentes.

Criação de CTL anti-CMV a partir de células T de murganho naíve; actividade anti-viral *in vitro* e *in vivo*

Foi derivado CTL anti-CMV incubando 10^7 de células T $CD8^+$ purificadas a partir de nódulos linfáticos de murganho BALB/c (haplotipo H-2^d) em conjunto com esferas magnéticas revestidas

com L^d na presença do péptido LCMV durante 4 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, foram recuperadas cerca de 10⁴ células e colocadas em cultura, em 12 poços de uma placa de 96 poços revestida com L^d e mAb anti-CD28, na presença do péptido LCMV a 10 µM. As células foram cultivadas como indicado no parágrafo anterior. Como apresentado na Figura 7A, foram obtidos linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos para o péptido LCMV. As células também eliminaram os alvos infectados com LCMV do haplotipo H-2^d, embora apresentando apenas uma actividade de fundo contra os alvos não infectados (Figura 7B). Estiveram também presentes uma actividade anti-alotípica (Figura 7C) bem como alguma actividade de NK/LAK (Figura 7D). Todas as células expressaram CD8, como avaliado por citometria de fluxo. O ensaio *in vivo* demonstrou que as células foram capazes de reduzir marcadamente os títulos de vírus em murganhos BALB/c (H-2^d) agudamente infectados com LCMV (Figura 8). Esta redução foi específica de MHC uma vez que não foi observada redução significativa dos títulos de vírus em murganhos C57/BL6 (H-2^b) a seguir à injeção de CTL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal GB, Linderman JJ (1996) Mathematical modeling of helper T lymphocyte/antigen presenting cell interactions: analysis of methods for modifying antigen processing and presentation. *J. Theor. Biol.* 182, 487-504.

Ashman RF (1973) Lymphocyte receptor movement induced by sheep erythrocyte binding. *J. Immunol.* 111, 212-220.

Altman JD, Moss PAH, Goulder JPR, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

Bellone G, Geuna M, Carbone A, Silvestri S, Foa R, Emanuelli G, Matera L (1995) Regulatory action of prolactin on the *in vitro* growth of CD34⁺ve human hemopoietic progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 163, 221-231.

Borrow P, Oldstone MBA (1997) Lymphocytic choriomeningitis virus. In: "*Viral Pathogenesis*", Neal Nathanson *et al.*, ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 593-627.

Cai Z, Sprent J (1996) Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8⁺ T cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 183, 2247-2257.

Cai Z, Brunmark A, Jackson MR, Loh D, Peterson PA, Sprent J (1996) Transfected *Drosophila* cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14736-14741.

Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, Al-Ramadi BK, Sang Kim Y, Maher SE, Bothwell ALM, Margulies DH (1994) T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 265, 946-949.

De Bruijn MLH, Nieland JD, Schumacher TNM, Ploegh HL, Kast WM, Melief CJM (1992) Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur. J. Immunol.* 22, 3013-3020.

Dillon SR, Jameson SC, Fink PJ (1994) V β 5⁺ T cell receptors skew toward OVA + H-2K^b recognition. *J. Immunol.* 152, 1790-1801.

Engelhard VH (1994) Structure of peptides associated with MMC class I molecules. *Current Opinion Immunol.* 6, 13-23.

Gold MR, DeFranco AL (1994) Biochemistry of B lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* 55, 221-295.

Grupp SA, Snow EC, Harmony JAK (1987) The phosphatidylinositol response is an early event in the physiologically relevant activation of antigen-specific B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 109, 181-191.

Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty, PC (1994) Virus-specific CD8⁺ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369, 652-654.

Irsch J, Irlenbusch S, Radl J, Burrows PD, Cooper MD, Radbruch AH (1994) Switch recombination in normal IgA₁⁺ B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1323-1327.

Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA (1992) Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12117-12121.

Kane KP, Goldstein SAN, Mescher MF (1988) Class I alloantigen is sufficient for cytolytic T lymphocyte binding and transmembrane signaling. *Eur. J. Immunol.* 18, 1925-1929.

Kane KP, Mescher MF (1993) Activation of CD8-dependent cytotoxic T lymphocyte adhesion and degranulation by peptide class I antigen complexes. *J. Immunol.* 150, 4788-4797.

Kato K, Radbruch A (1993) Isolation and characterization of CD34⁺ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 14, 384-392.

Klavinskis LS, Tishon A, Oldstone MBA (1989) Efficiency and effectiveness of cloned virus specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *J. Immunol.* 143, 2013-2016.

Kranz DM, Tonegawa S, Eisen HN (1994) Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7922-7926.

Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R (1994) Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369, 648-652.

Lee H, Rich S (1991) Co-stimulation of T cell proliferation by transforming growth factor β 1. *J. Immunol.* 147, 2991-3000.

Luxembourg AT, Cooper NR (1994) Modulation of signaling via the B cell antigen receptor by CD21, the receptor for C3dg and EBV. *J. Immunol.* 153, 4448-4467.

Matsui K, Jay Boniface J, Reay PA, Schild H, Fazekas de St. Groth B, Davis MM (1991) Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254, 1788-1791.

Mescher MF (1995) Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 146, 177-210.

Moore MD, DiScipio RG, Cooper NR, Nemerow GR (1989) Hydrodynamic, electron microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus/C3dg receptor (CR2). *J. Biol. Chem.* 264, 20576-20582.

Myers CD, Kriz MK, Sullivan TJ, Vitetta ES (1987) Antigen-induced changes in phospholipid metabolism in antigen-binding B lymphocytes. *J. Immunol.* 138, 1705-1711.

Nakanishi M, Brian AA, McConnell HM (1983) Binding of cytotoxic T-lymphocytes to supported lipid monolayers containing trypsinized H-2K^k. *Mol. Immunol.* 20, 1227-1231.

Noelle RJ, Snow EC (1990) Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol. Today* 11, 361-368.

Oehen S, Waldner H, Kundig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM (1992) Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J. Exp. Med.* 176, 1273-1281.

Radbruch A, Recktenwald D (1995) Detection and isolation of rare cells. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 270-273.

Ramensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995) MMC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.

Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI (1990) Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell. Physiol.* 142, 219-230.

Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY (1988) Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 335, 271-274.

Snow EC, Vitetta ES, Uhr JW (1983a) Activation of antigen-enriched B cells. I. Purification and response to thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 130, 607-613.

Snow EC, Noelle RJ, Uhr JW, Vitetta ES (1983b) Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens. *J. Immunol.* 130, 614-618.

Snow EC, Fetherson JD, Zimmer S (1986) Induction of the c-myc protooncogene after antigen binding to hapten-specific B cells. *J. Exp. Med.* 164, 944-949.

Stein P, Dubois P, Greenblatt D, Howard M (1986) Induction of antigen-specific proliferation in affinity-purified small lymphocytes: requirement for BSF-1 by type 2 but not type 1 thymus-independent antigens. *J. Immunol.* 136, 2080-2089.

Sun S, Cai Z, Langlade-Demoyen P, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J (1996) Dual function of Drosophila cells as APCs for naïve CD8 T cells: implications for tumor immunotherapy. *Immunity* 4, 555-564.

Sykulev Y, Brunmark A, Jackson M, Cohen RJ, Peterson PA, Eisen HN (1994a) Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* 1, 15-22.

Sykulev Y, Brunmark A, Tsomides TJ, Kageyama S, Jackson M, Peterson PA, Eisen HN (1994b) High-affinity reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11487-11491.

Tallquist MD, Pease LR (1995) Alloreactive 2C T cells recognize a self peptide in the context of the mutant Kb^{m3} molecule. *J. Immunol.* 155, 2419-2426.

Tallquist MD, Yun TJ, Pease LR (1996) A single T cell receptor recognizes structurally distinct MHC/peptide complexes with high specificity. *J. Exp. Med.* 184, 1017-1026.

Ukada K, Wiesmiller KH, Kienle S, Jung G, Walden P (1996) Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J. Immunol.* 157, 670-678.

Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Kajalainen K (1992) Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356, 793-796.

Wilson HA, Greenblatt D, Poenie M, Finkelman FD, Tsien RY (1987) Crosslinkage of B lymphocyte surface immunoglobulin by

anti-Ig or antigen induces prolonged oscillation of intracellular ionized calcium. *J. Exp. Med.* 166, 601-606.

Wunderlich J, Shearer G (1991) Induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In: *"Current Protocols in Immunology"* (Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds.) John Wiley and Sons, New York, pp. 3.11.1 - 3.11.15.

Zhang X, Giangreco L, Broome HE, Dargan CM, Swain SL (1995) Control of CD4 effector fate: transforming growth factor β 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J. Exp. Med.* 182, 699-709.

TABELA I:

Captura de células 2C T em esferas magnéticas revestidas com L^d na presença de vários péptidos como avaliado por examinação microscópica

<i>Péptido</i>	<i>% de Células capturadas</i>	<i>Afinidade do 2C TCR para o péptido L^d (M^{-1})</i>	<i>Afinidade do péptido para L^d (M^{-1})</i>
QL9	87%	10^7	2×10^8
p2Ca	83%	2×10^6	4×10^6
SL9	77%	$1,4 \times 10^4$	4×10^7
MCMV	<1%	$<10^3$	2×10^9

TABELA II:

Recolha de células 2C T misturadas com células T CD8⁺ de murganhos B6 naïve por adsorção em esferas magnéticas revestidas com MHC classe I

<i>Molécula MHC</i>	<i>Péptido</i>	<i>% de células 2C T antes do enriquecimento</i>	<i>% de células 2C T depois do enriquecimento</i>	<i>Enriquecimento de células 2C T</i>	<i>Recuperação das células 2C T</i>	<i>Número de experiências</i>
L ^a	QL9	0,03%	24,8 ± 6,9 %	828 ± 230 vezes	90,8 ± 14,0 %	3
K ^{bm3}	dEV-8	0,03%	50,9 ± 14,2 %	1697 ± 473 vezes	47,7 ± 1,7 %	2
K ^b	SIYR	0,03%	47,6 ± 2,1 %	1588 ± 71 vezes	56,8 ± 0,6 %	2

Lisboa, 5 de Janeiro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Método para enriquecimento de linfócitos T específicos de antígeno compreendendo os passos de:

(a) colocar em contacto uma população heterogénea de linfócitos T específicos de antígeno com um substrato para capturar antígenos, o referido substrato compreendendo:

(i) um suporte possuindo na sua superfície uma população homogénea de moléculas MCH classe I vazias imobilizadas, em que as referidas moléculas de Classe I são capazes de se ligar a um ou mais antígenos, e as referidas moléculas de Classe I são as moléculas K^{bm3} ou L^d , expressas a partir de uma linha celular de *Drosophila* recombinante; e

(ii) uma esfera;

à qual foram ligados um ou mais antígenos, durante um período de tempo suficiente para permitir que interajam os linfócitos T específicos de antígeno com o substrato; e

(b) eluir os antígenos específicos de linfócitos T a partir do substrato para proporcionar uma população enriquecida de linfócitos T específicos de antígeno.

2. Método da reivindicação 1 em que a referida esfera é uma esfera magnética.
3. Método da reivindicação 1 ou 2 em que um ou mais antigénios são péptidos.

Lisboa, 5 de Janeiro de 2007

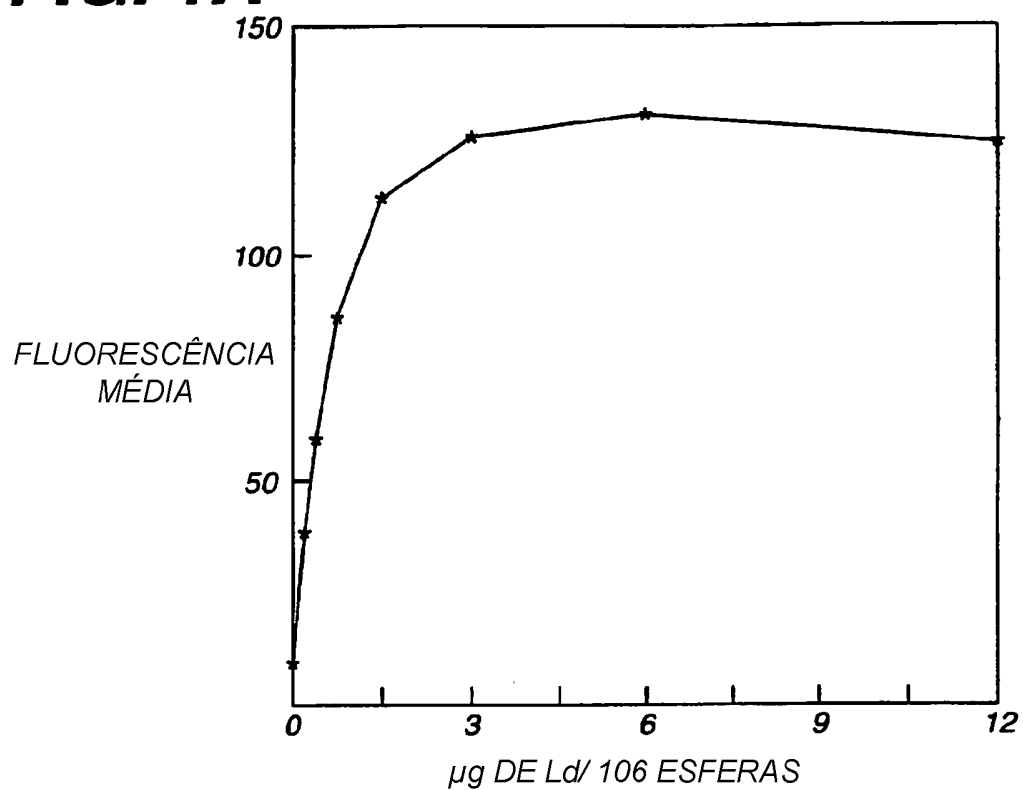
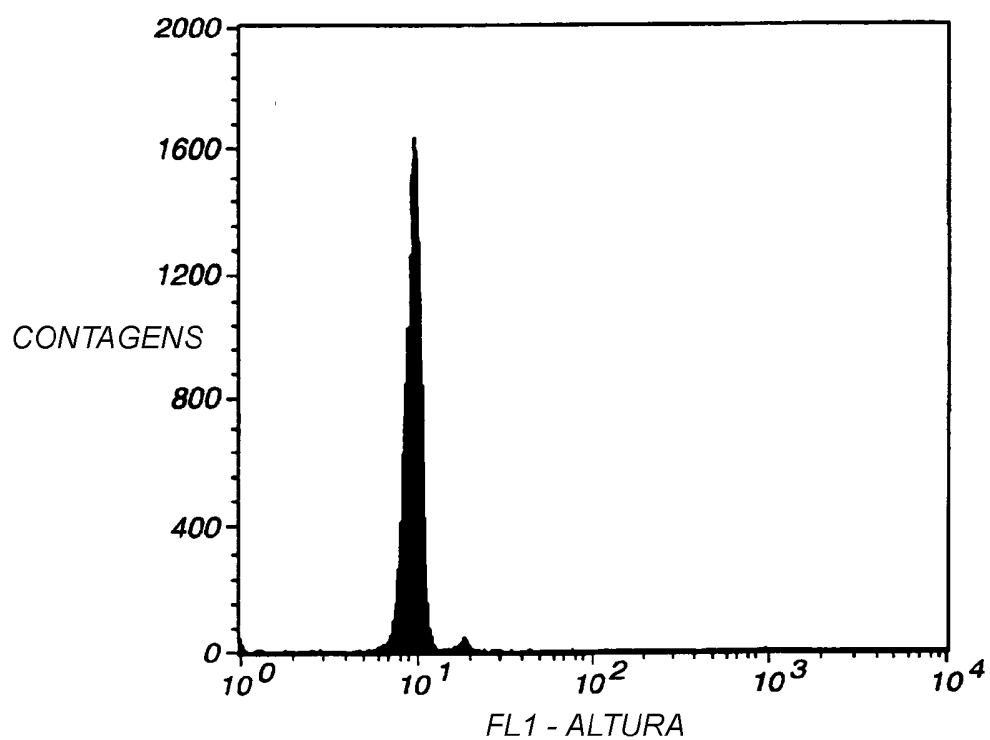
FIG. 1A**FIG. 1B**

FIG. 1C

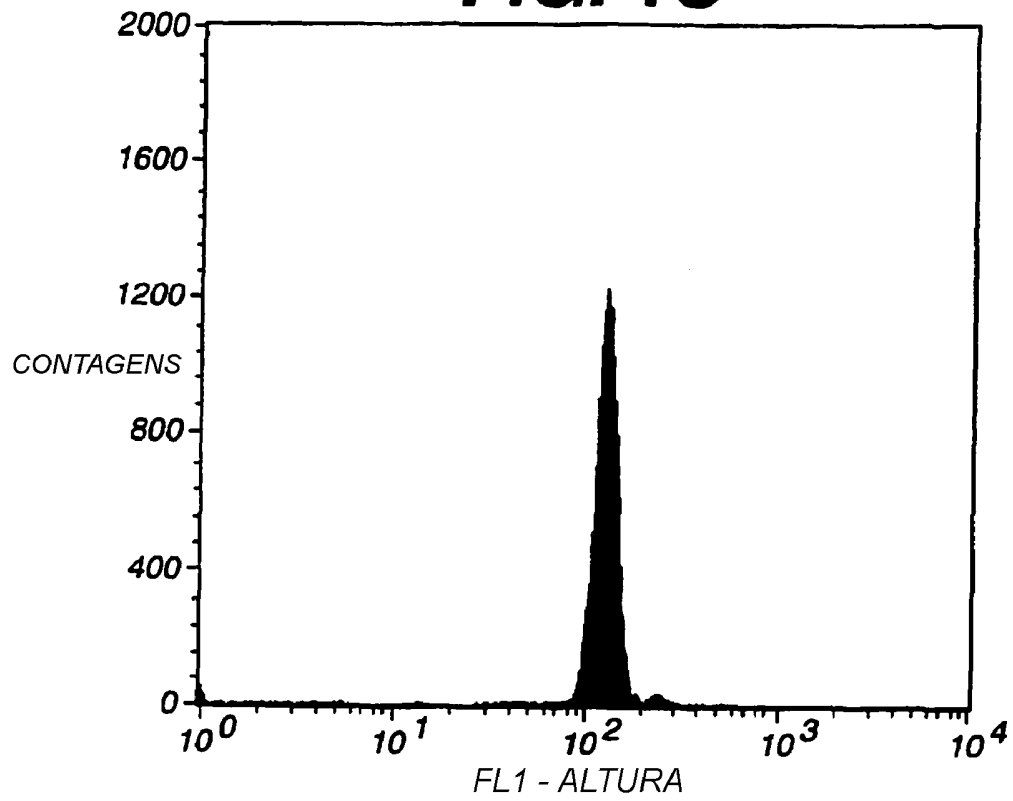


FIG. 1D

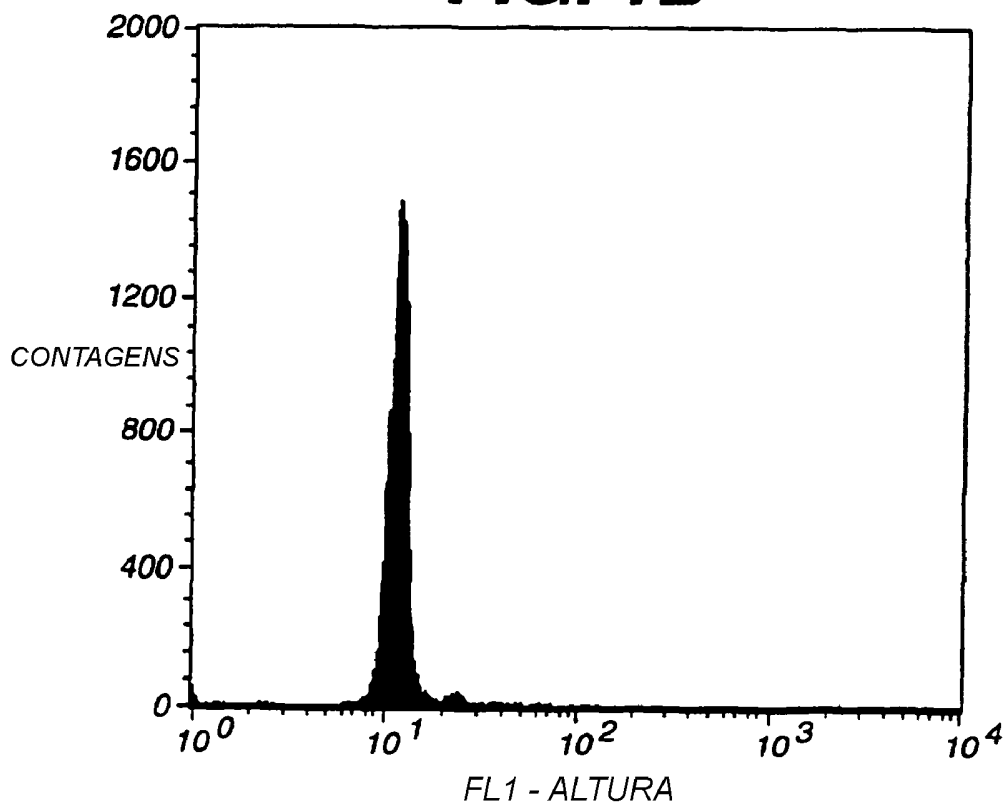


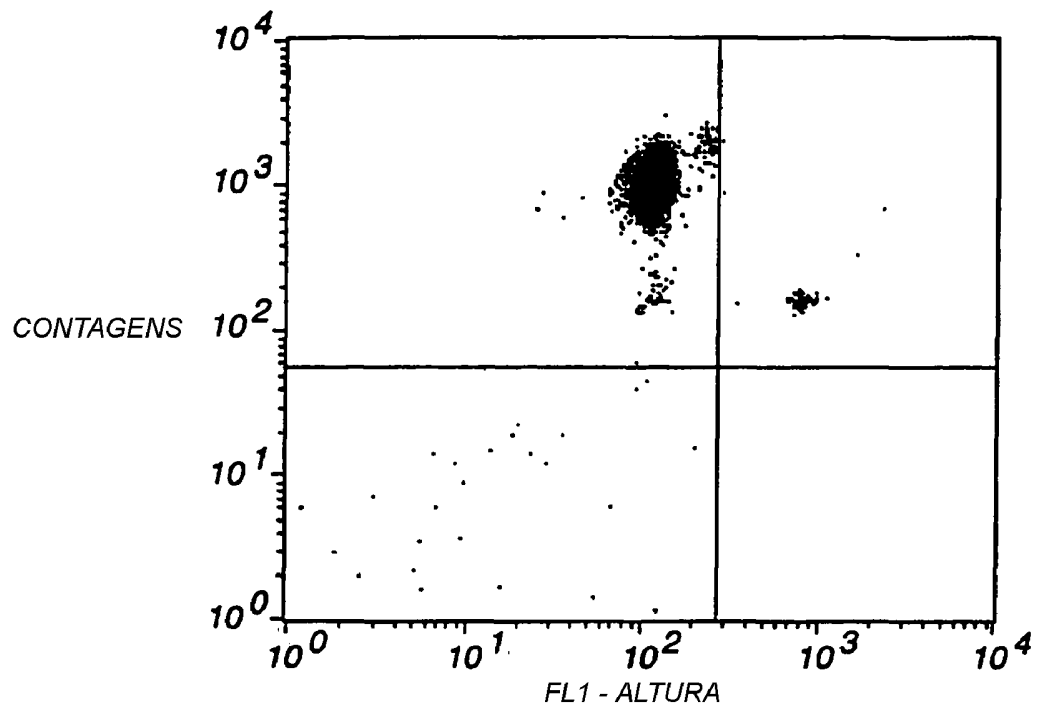
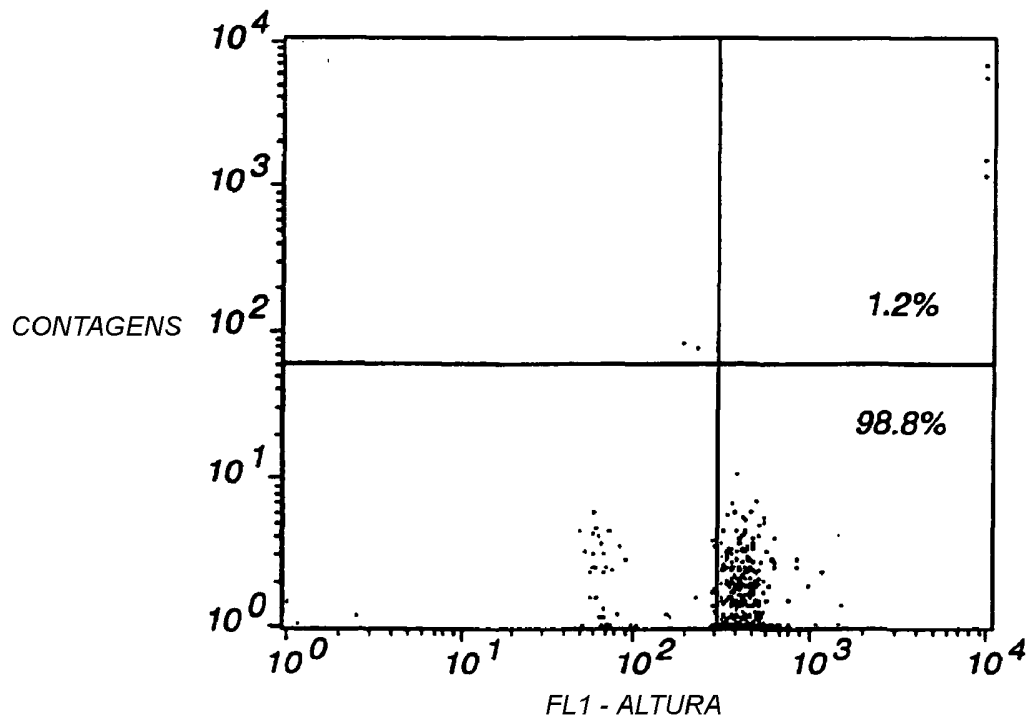
FIG. 2A**FIG. 2B**

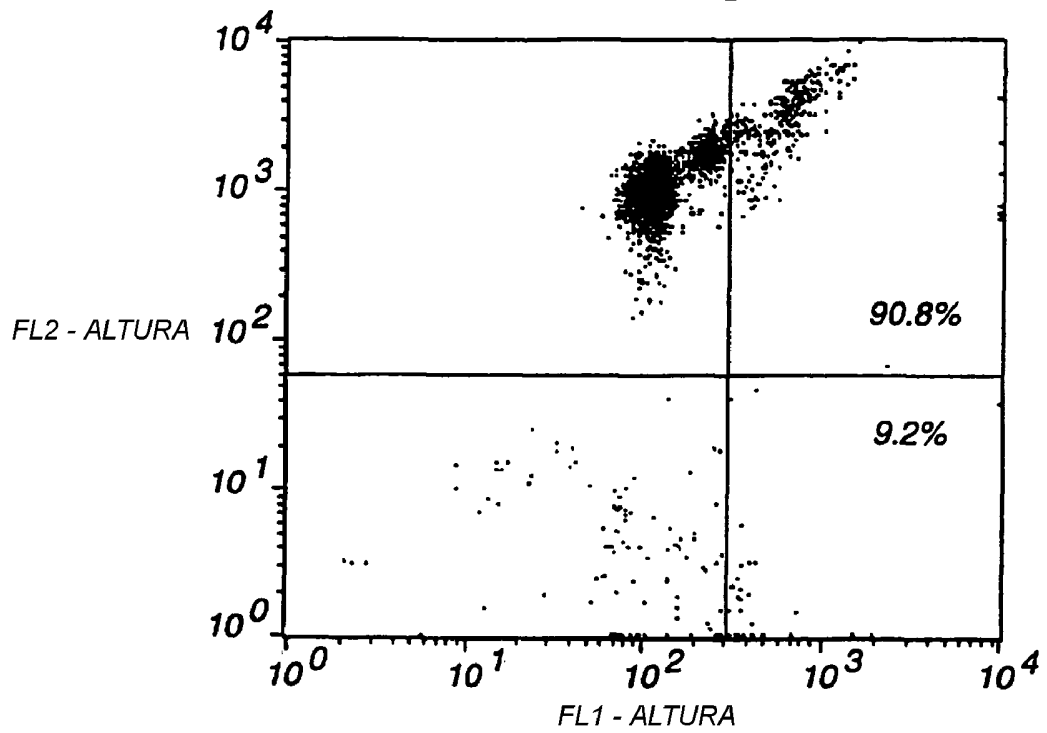
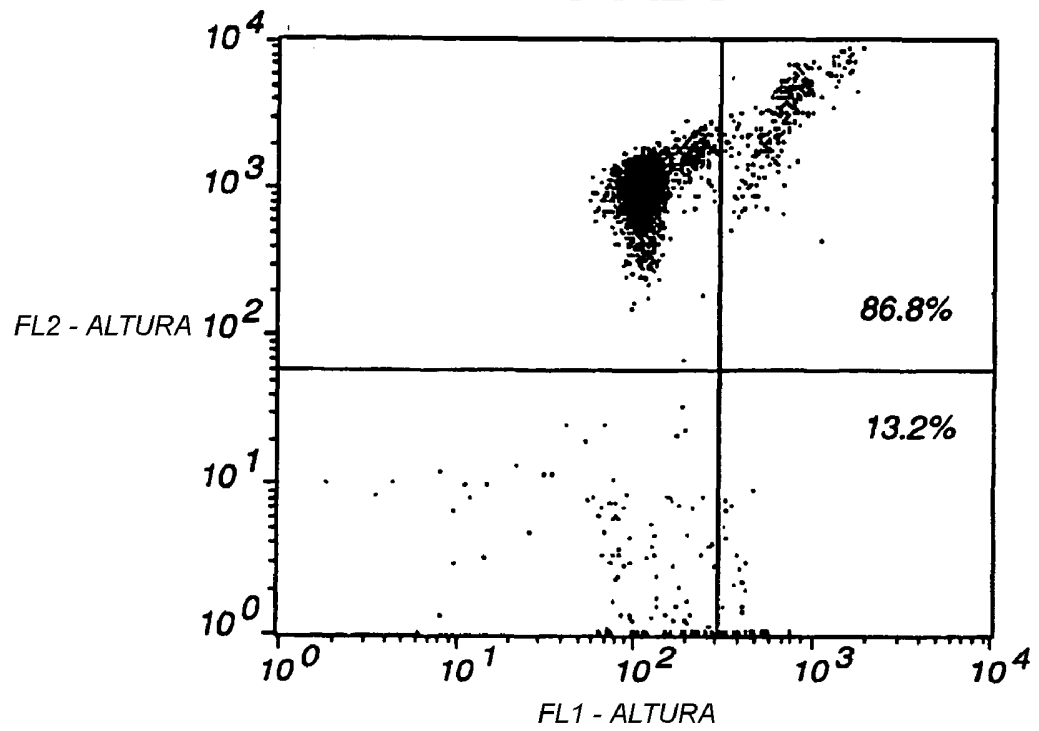
FIG. 2C**FIG. 2D**

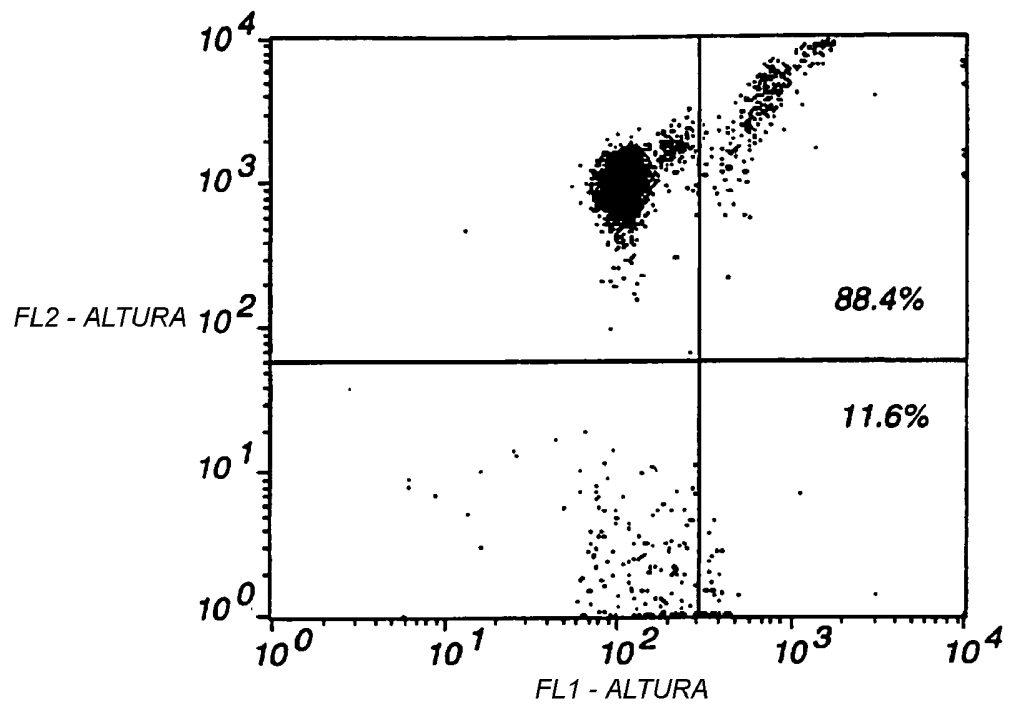
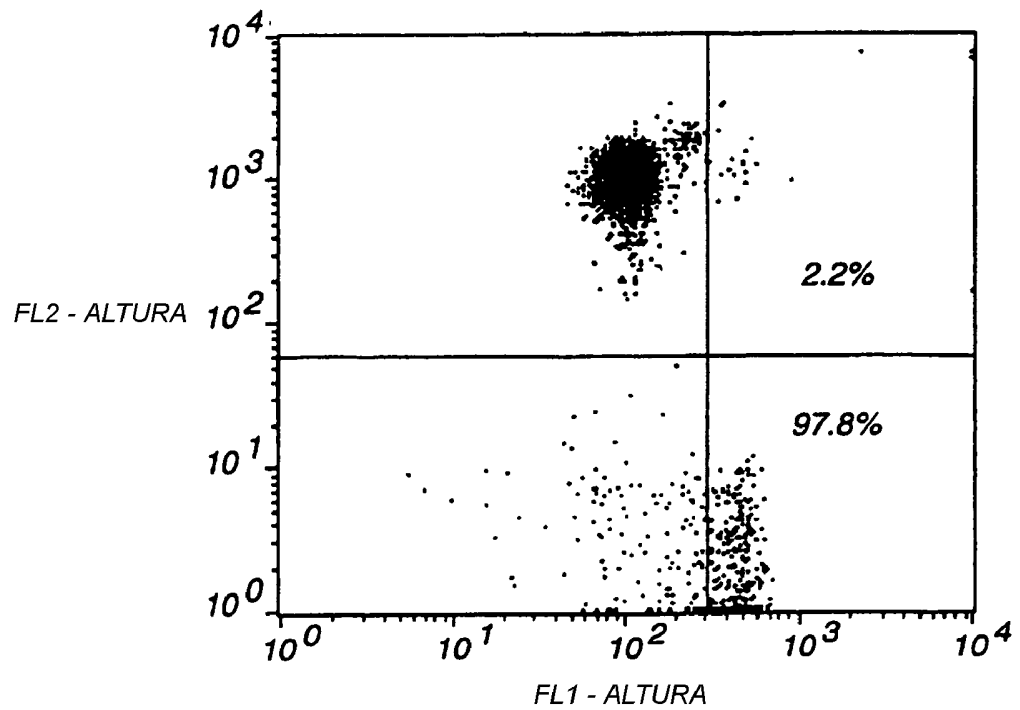
FIG. 2E**FIG. 2F**

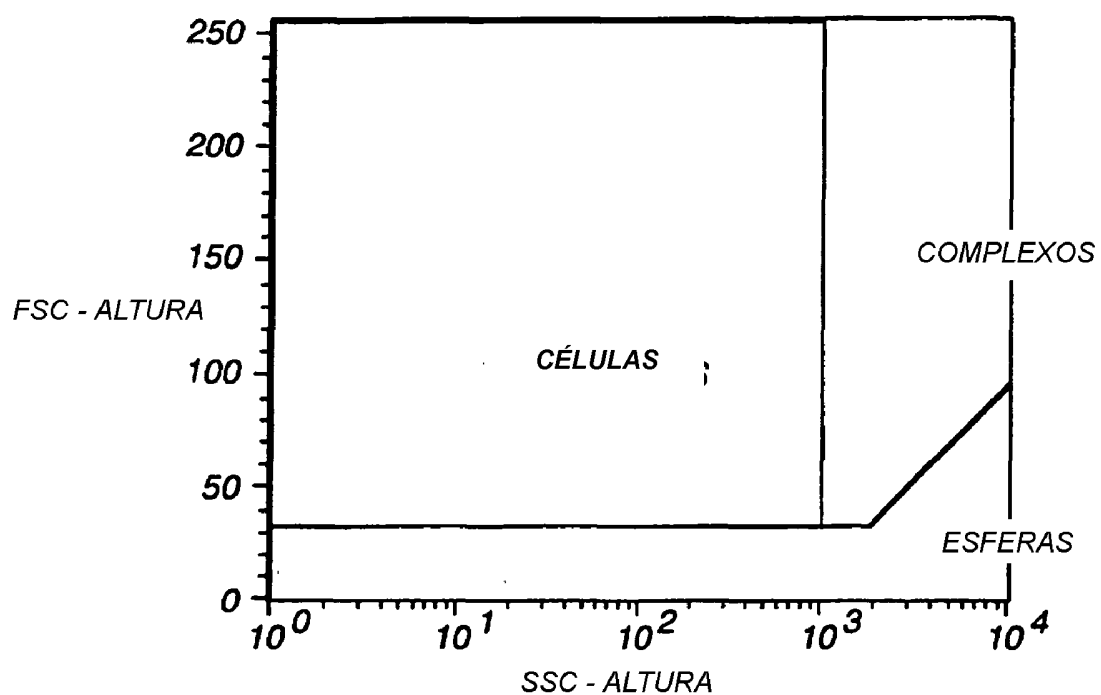
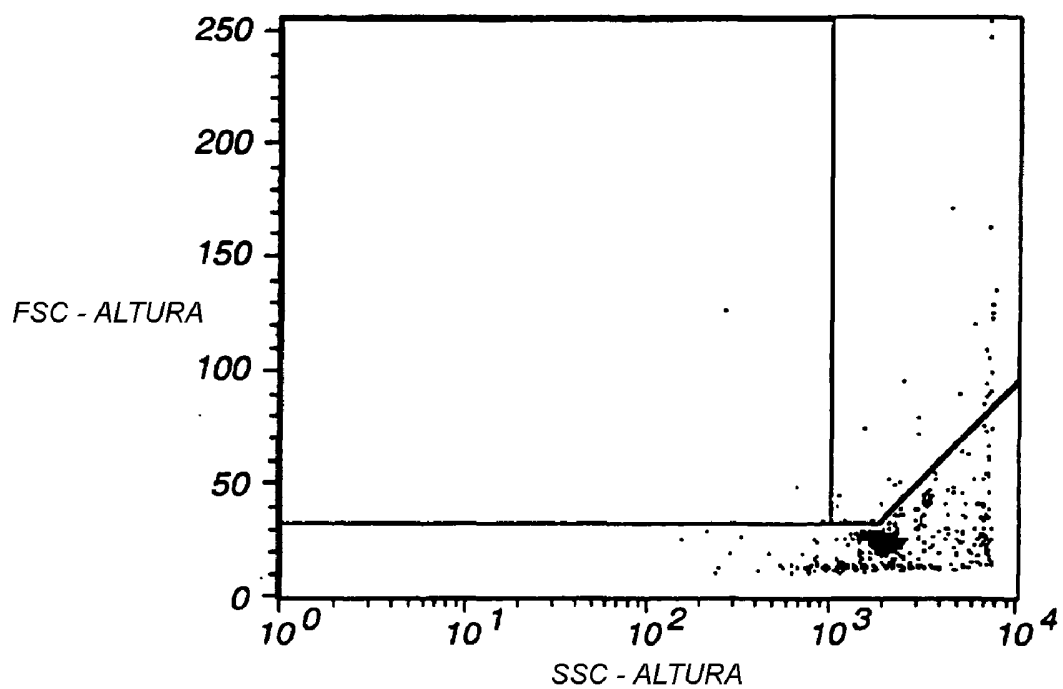
FIG. 3A**FIG. 3B**

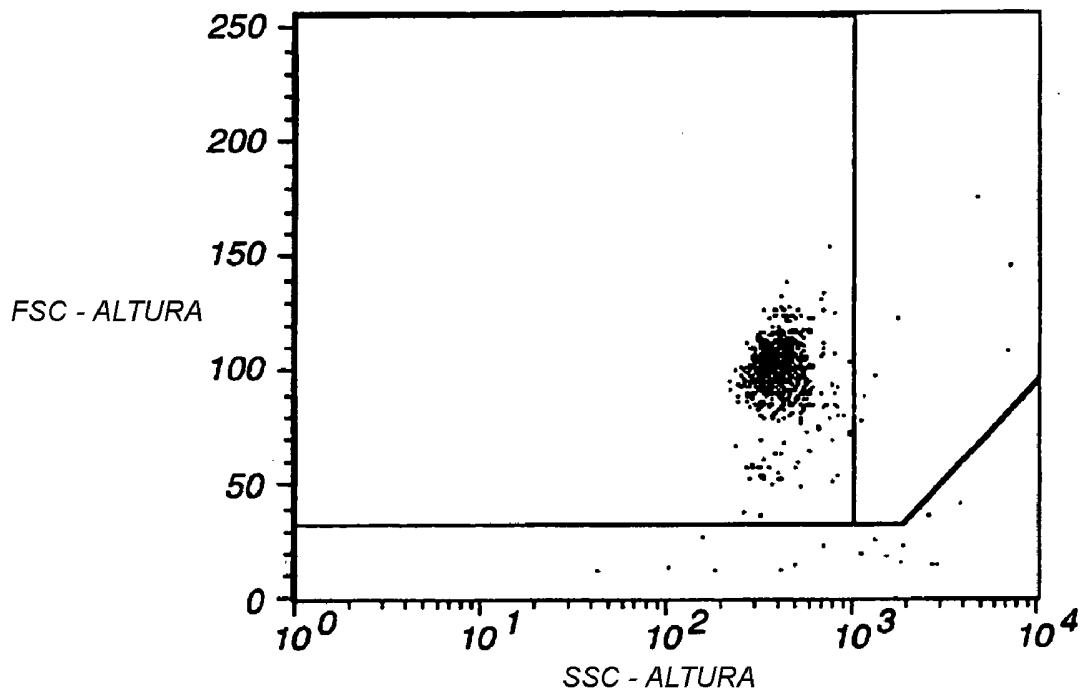
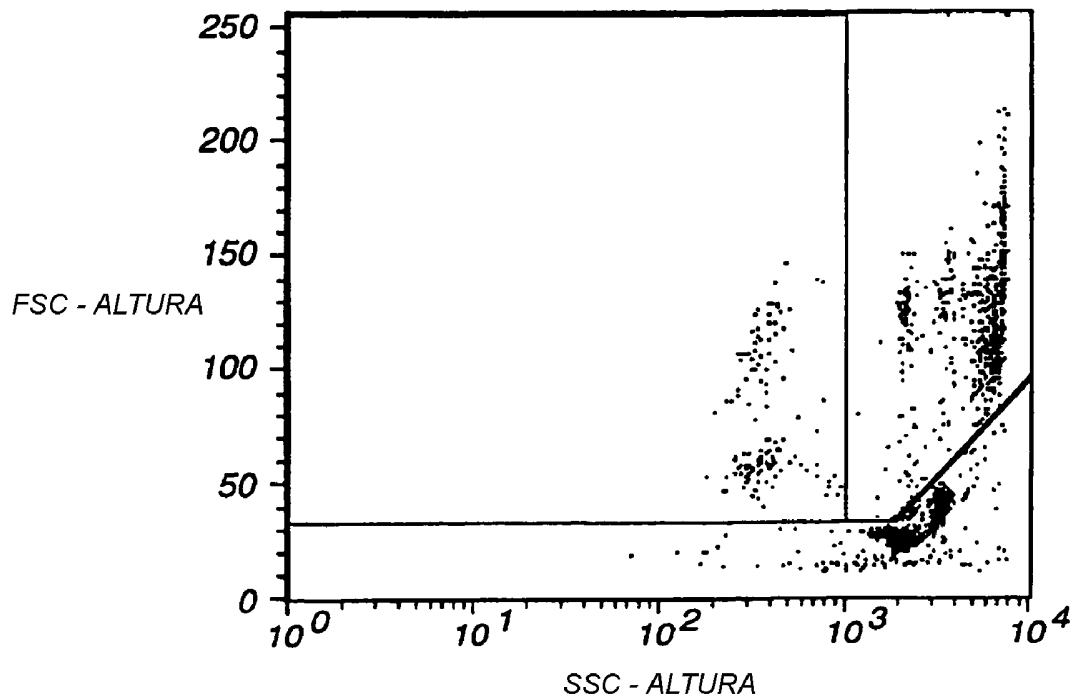
FIG. 3C**FIG. 3D**

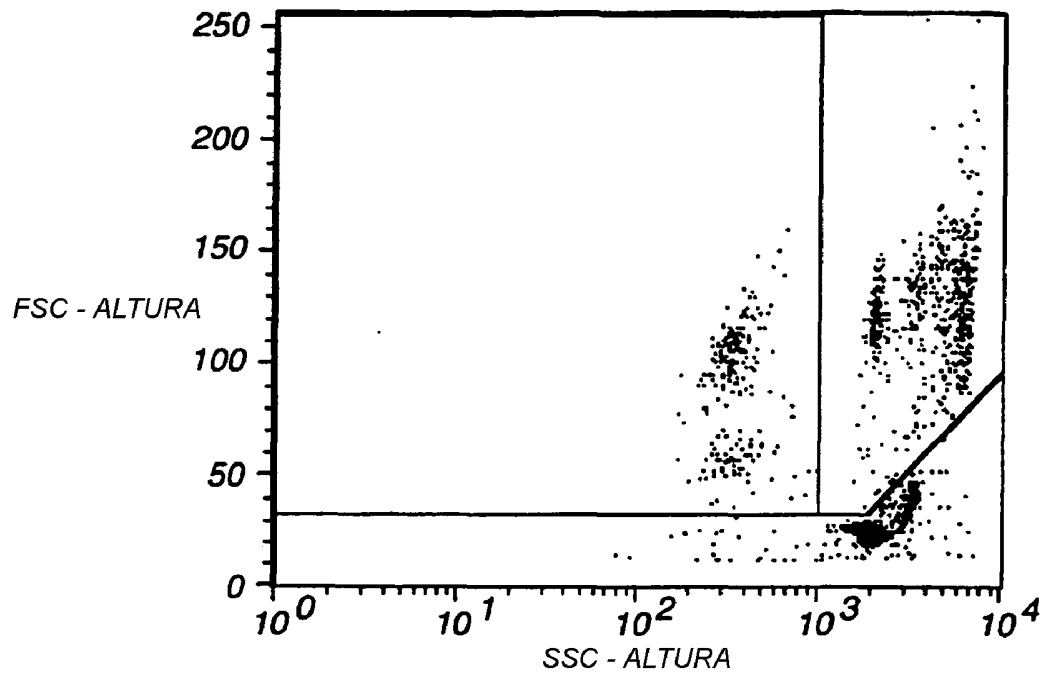
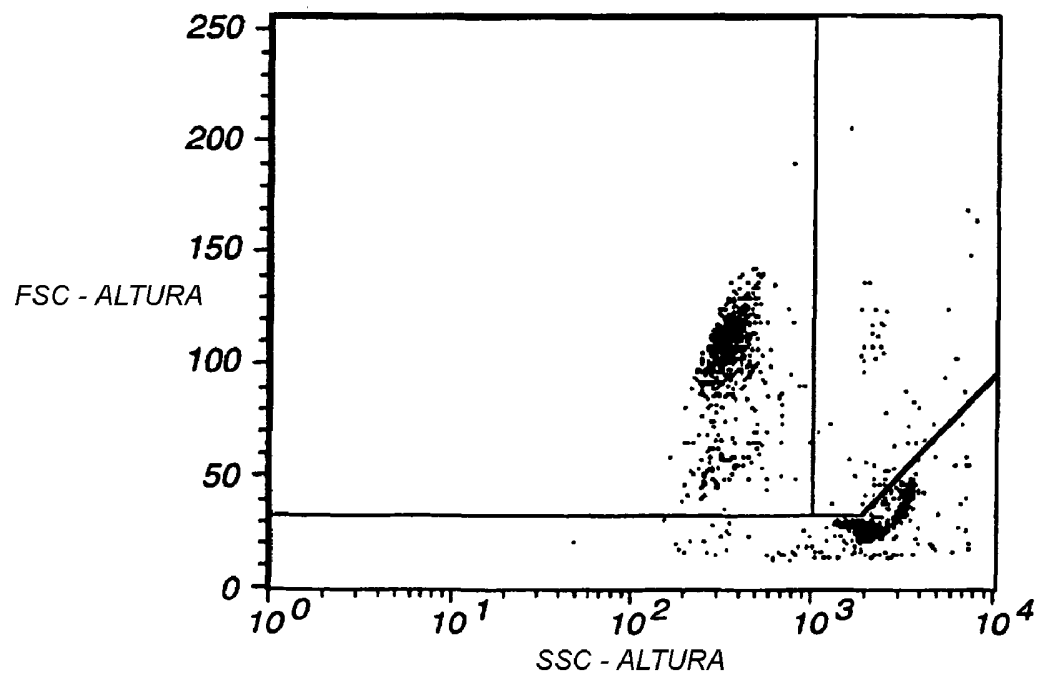
FIG. 3E**FIG. 3F**

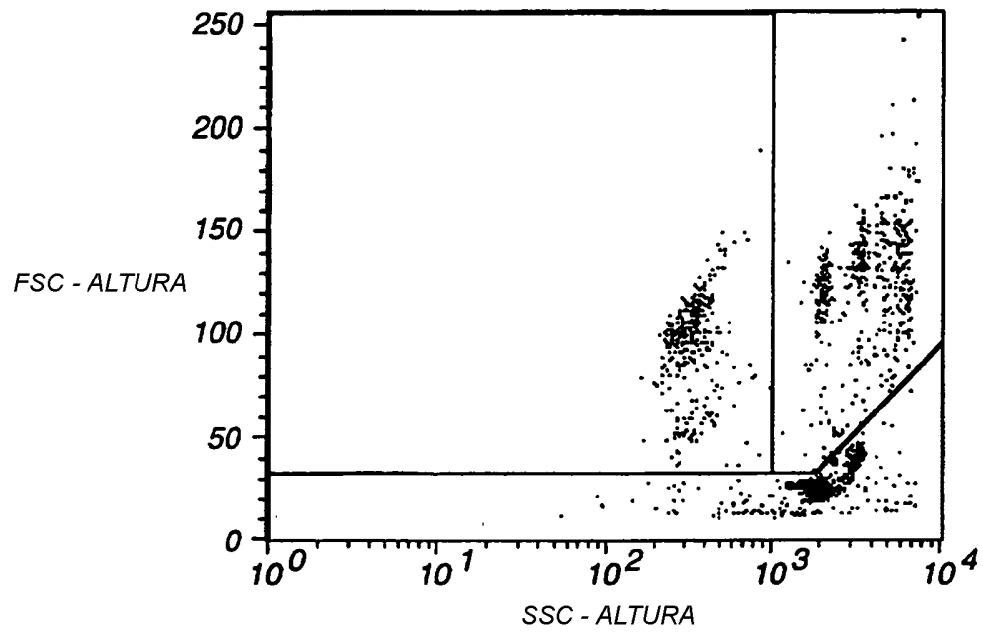
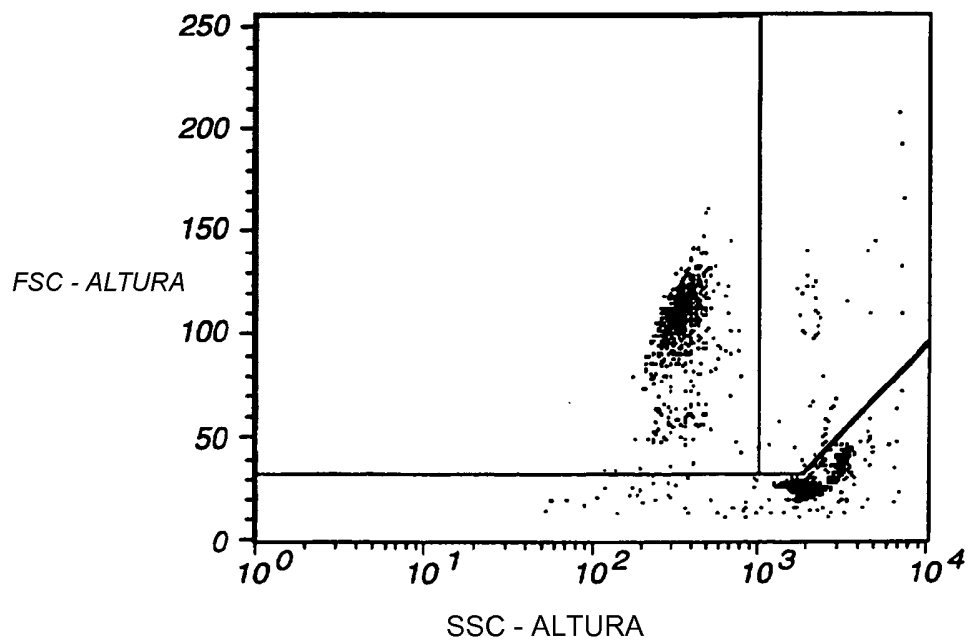
FIG. 3G**FIG. 3H**

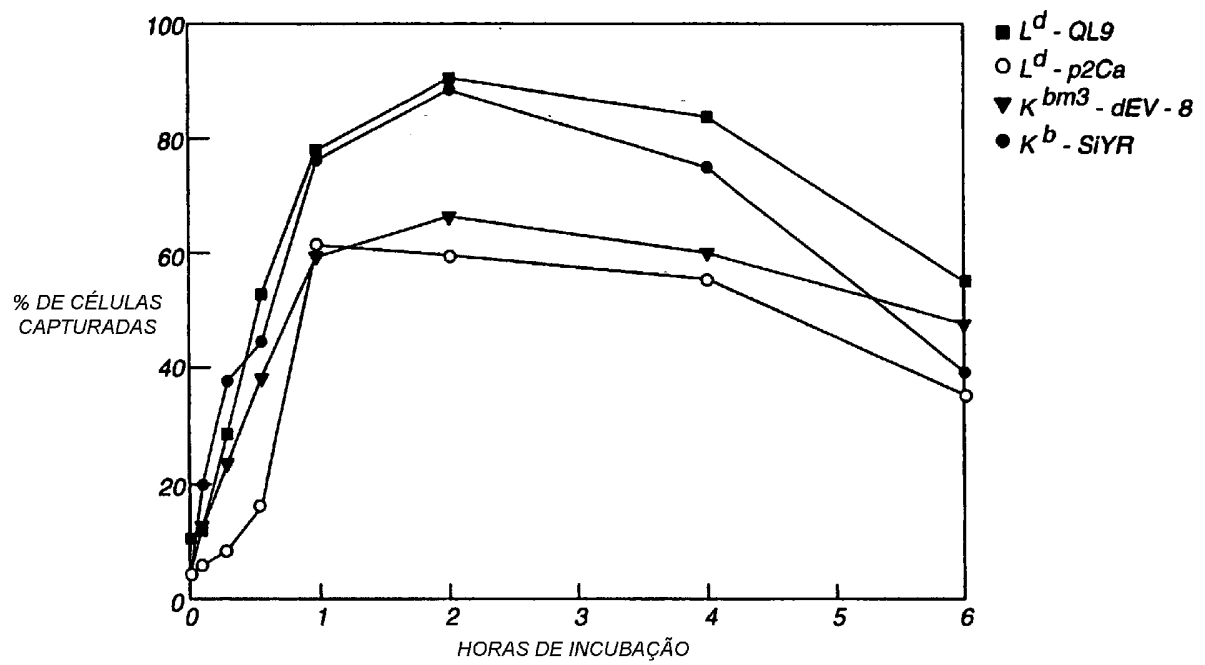
FIG. 4A

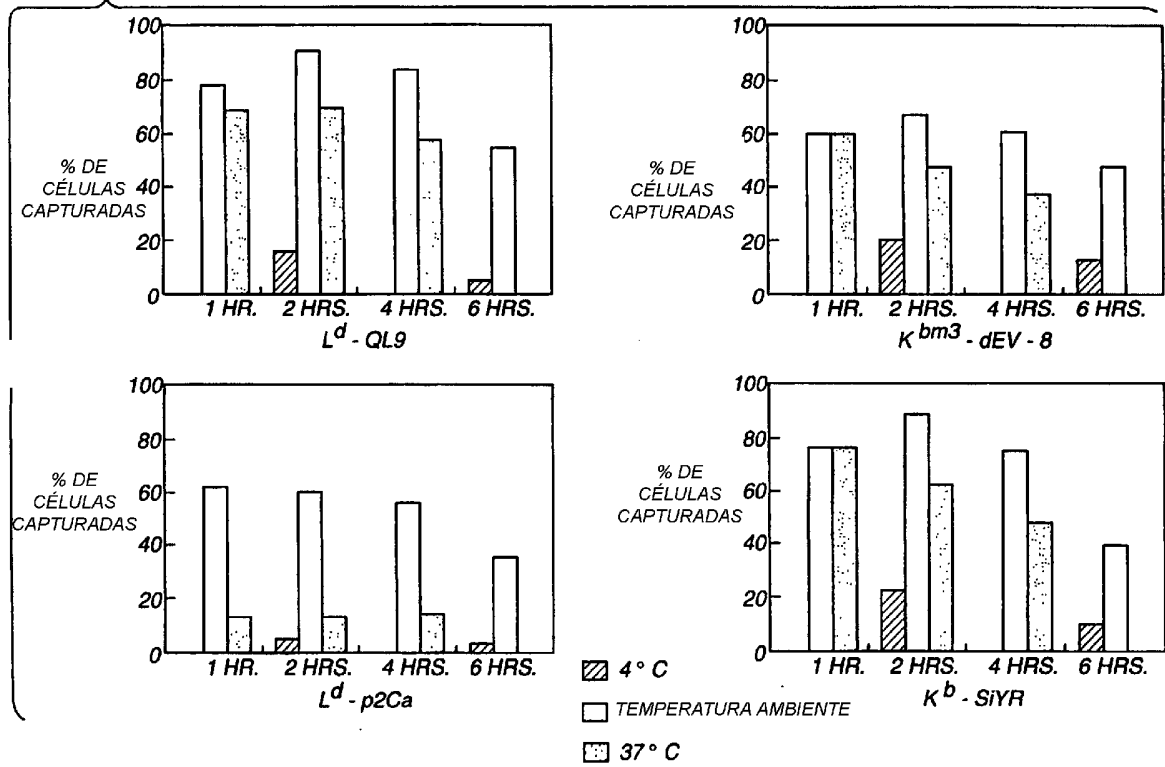
FIG. 4B

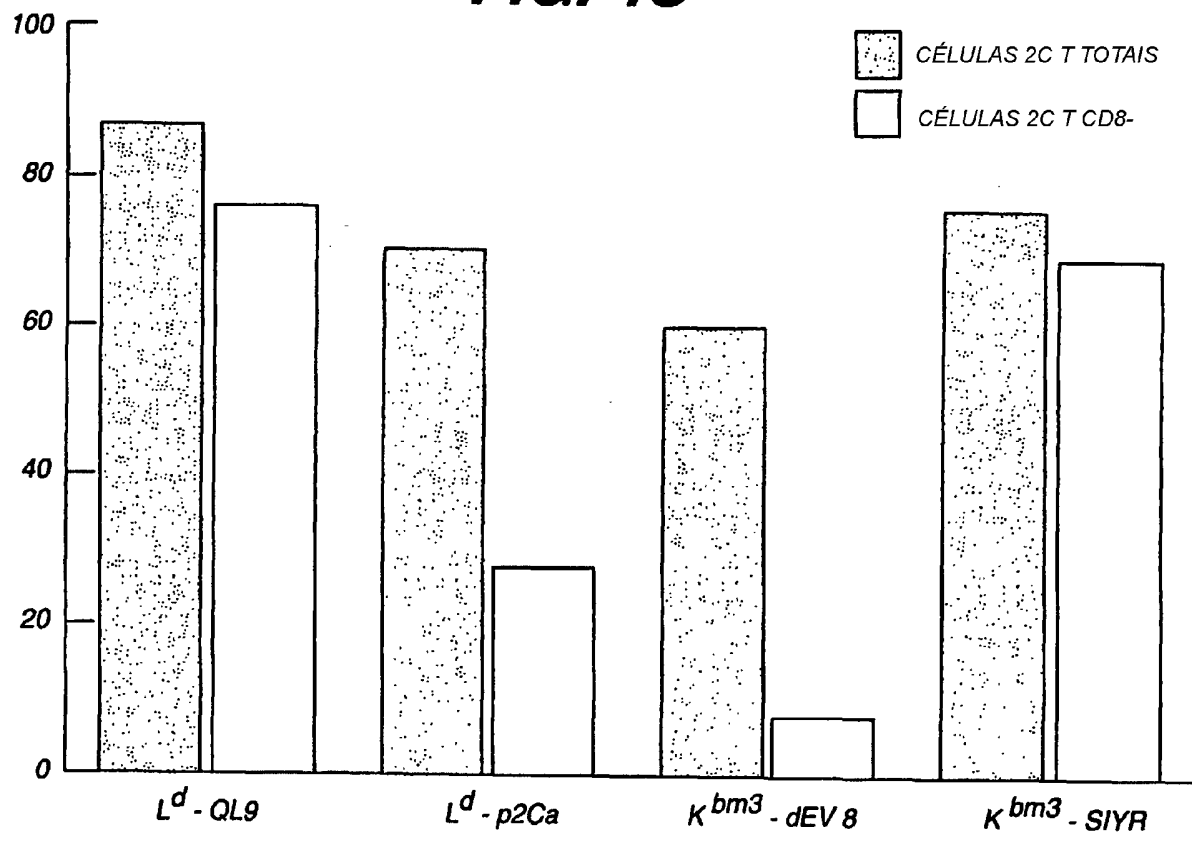
FIG. 4C

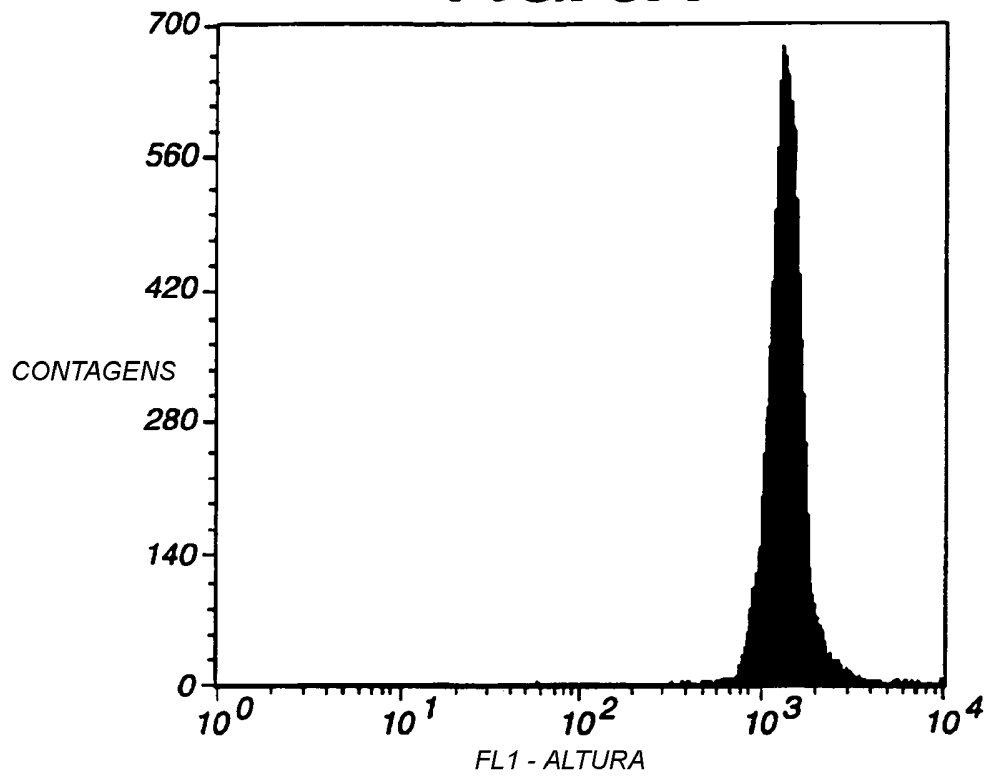
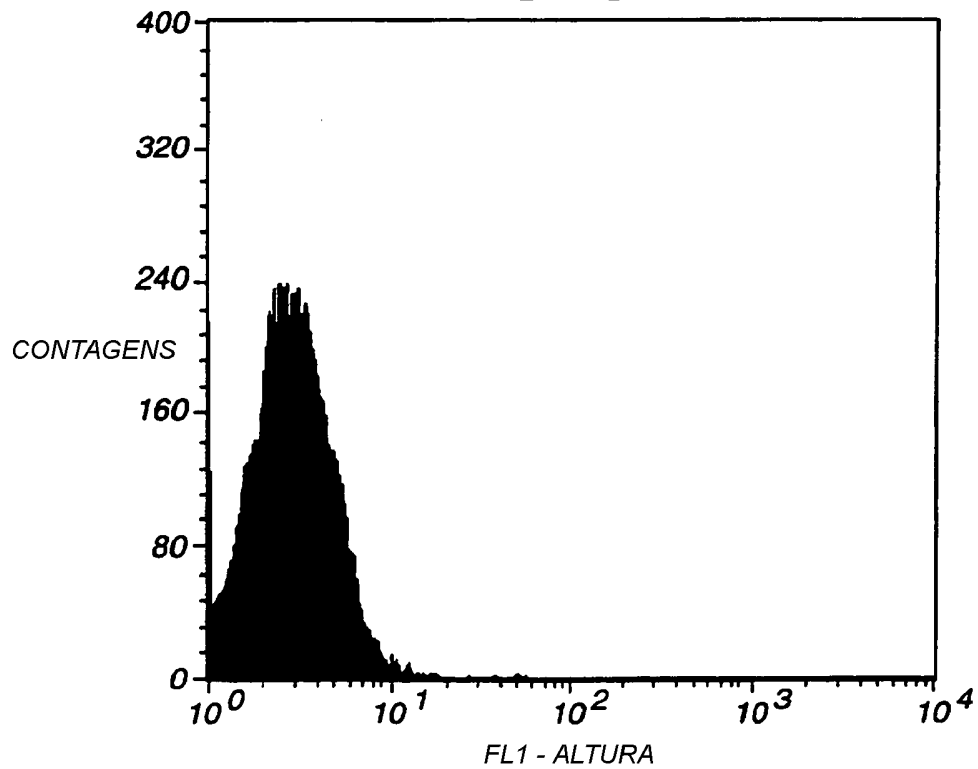
FIG. 5A**FIG. 5B**

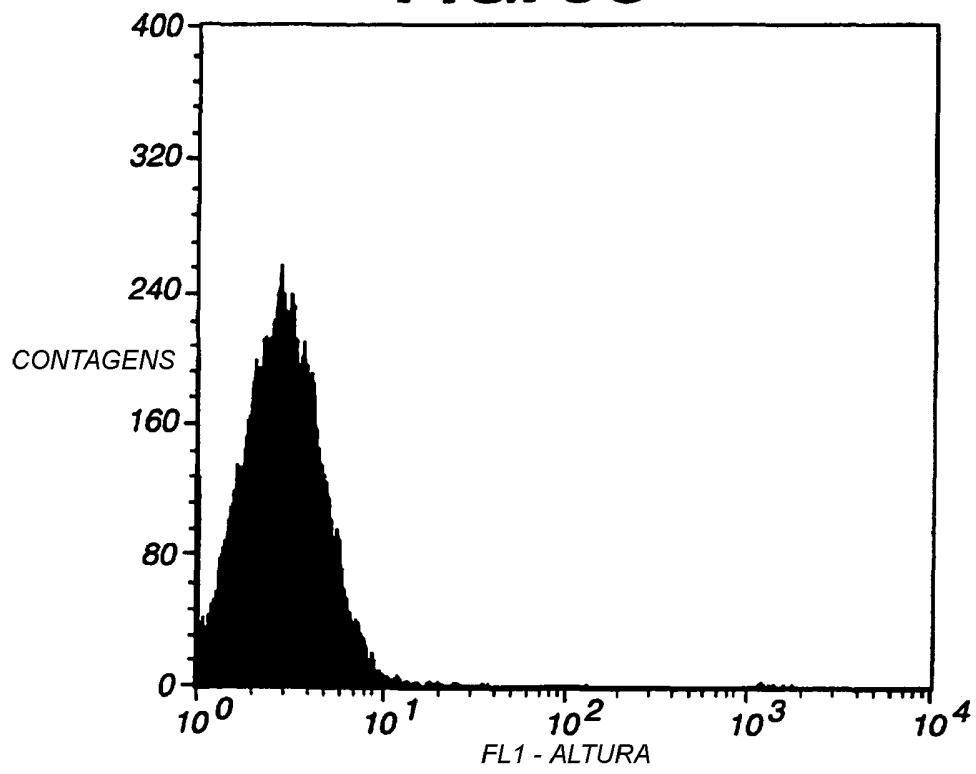
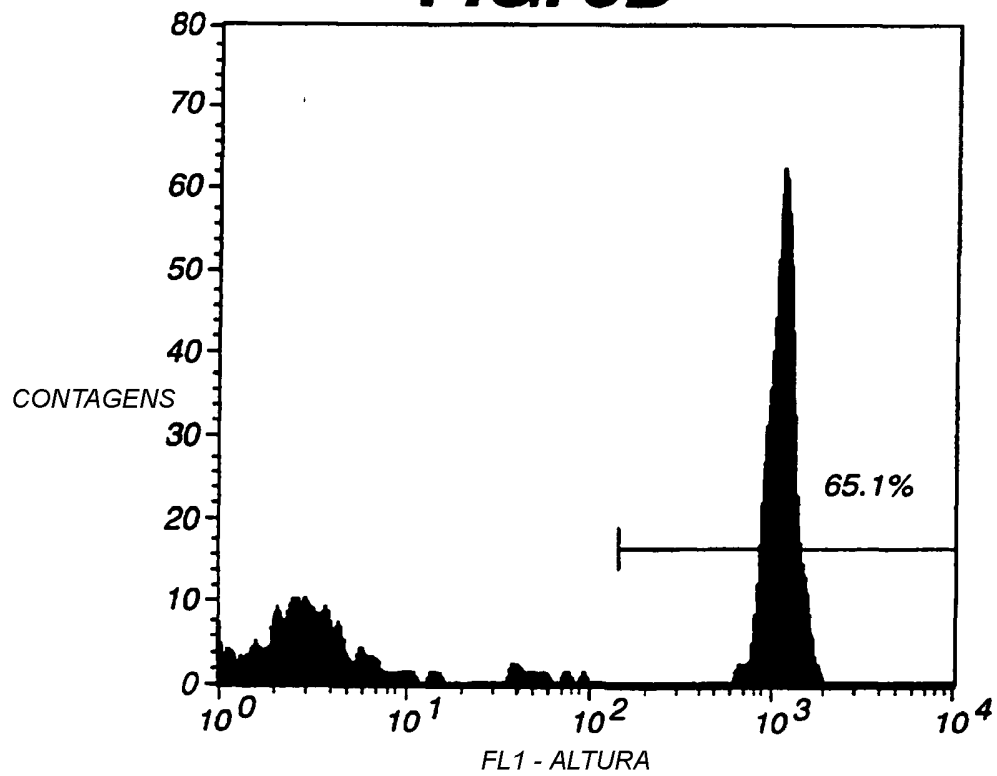
FIG. 5C**FIG. 5D**

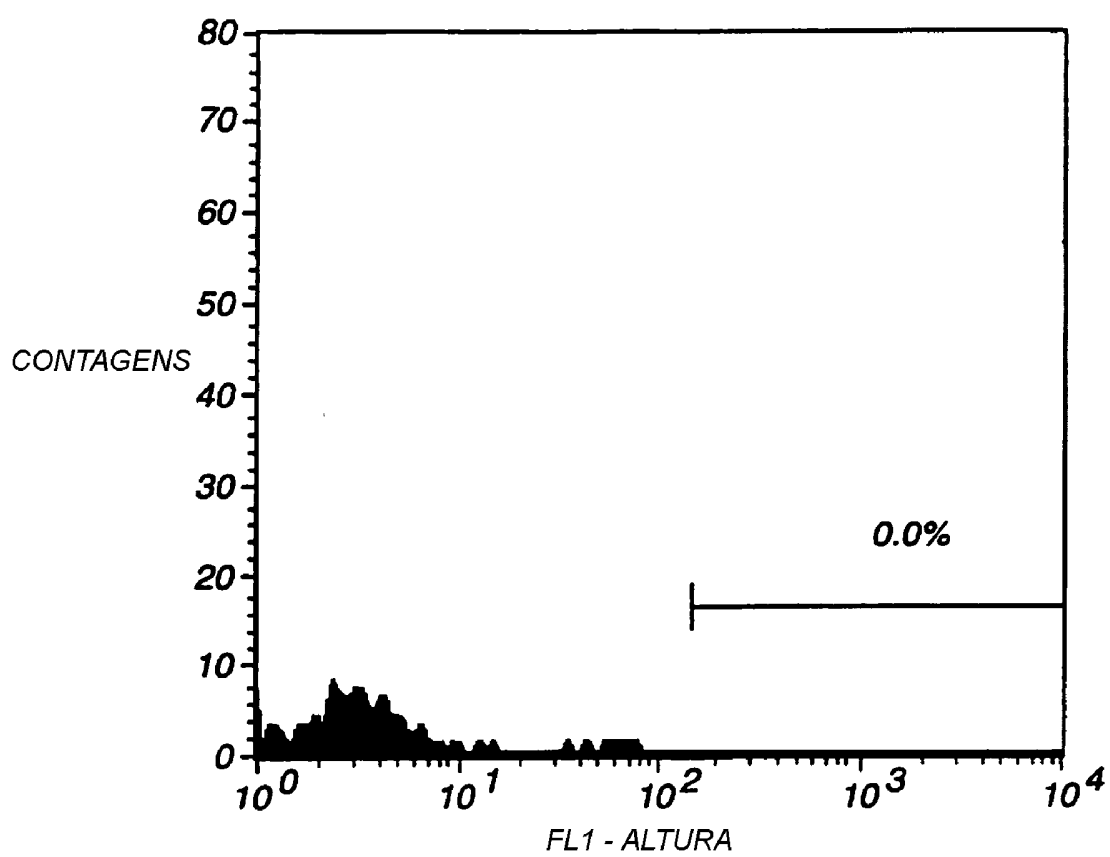
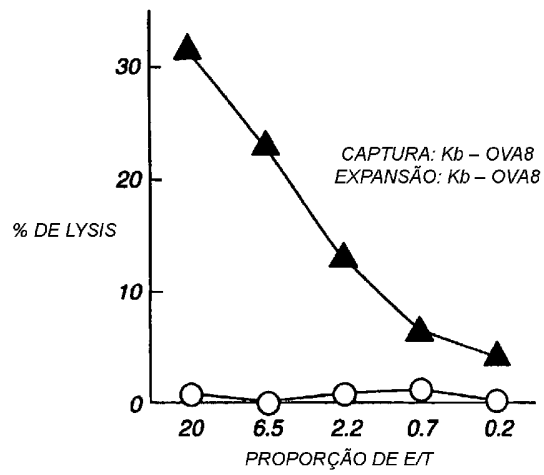
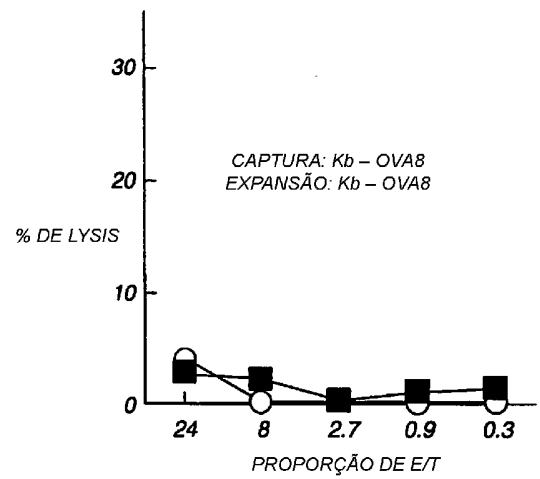
FIG. 5E

FIG. 6A

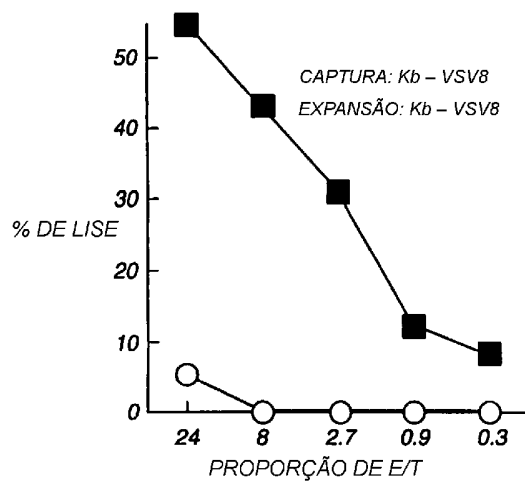
PÉPTIDOS UTILIZADOS PARA O
ENSAIO DE LIBERTAÇÃO DE CRÓMIO

▲ OVA8
○ SEM PÉPTIDO

FIG. 6B

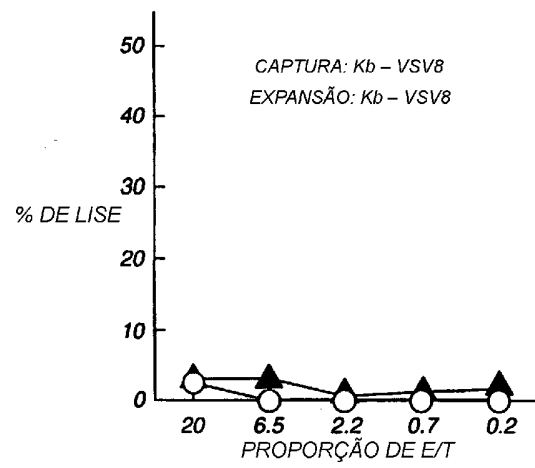
PÉPTIDOS UTILIZADOS PARA O
ENSAIO DE LIBERTAÇÃO DE CRÓMIO

■ VSV8
○ SEM PÉPTIDO

FIG. 6C

PÉPTIDOS UTILIZADOS PARA O
ENSAIO DE LIBERTAÇÃO DE CRÔMIO

■ VSV8
○ SEM PÉPTIDO

FIG. 6D

PÉPTIDOS UTILIZADOS PARA O
ENSAIO DE LIBERTAÇÃO DE CRÔMIO

▲ OVA8
○ SEM PÉPTIDO

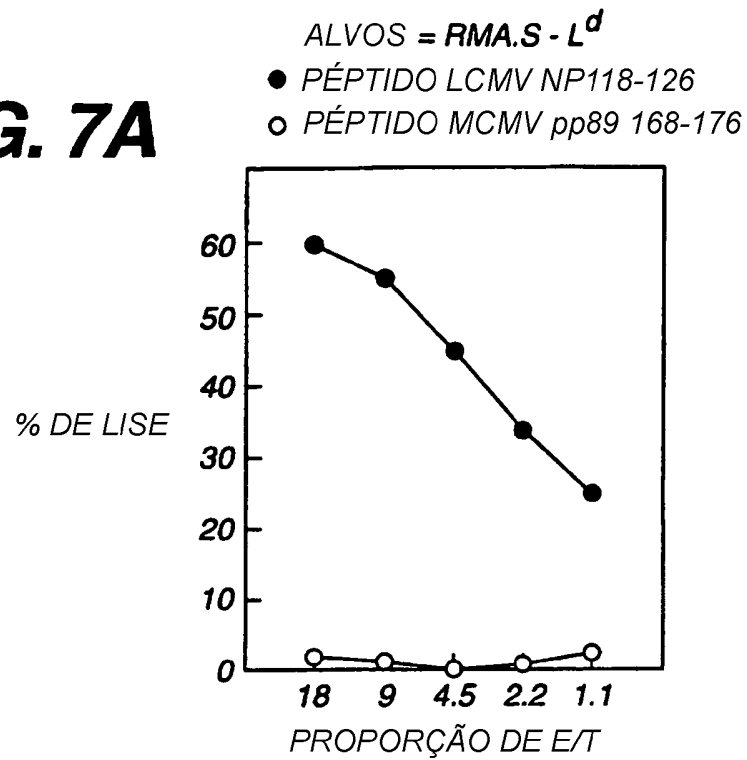
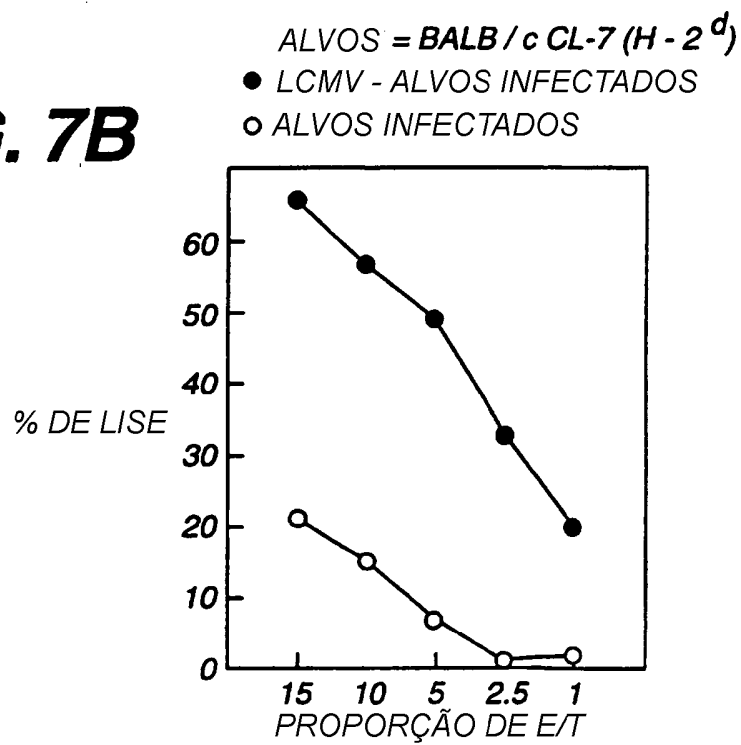
FIG. 7A**FIG. 7B**

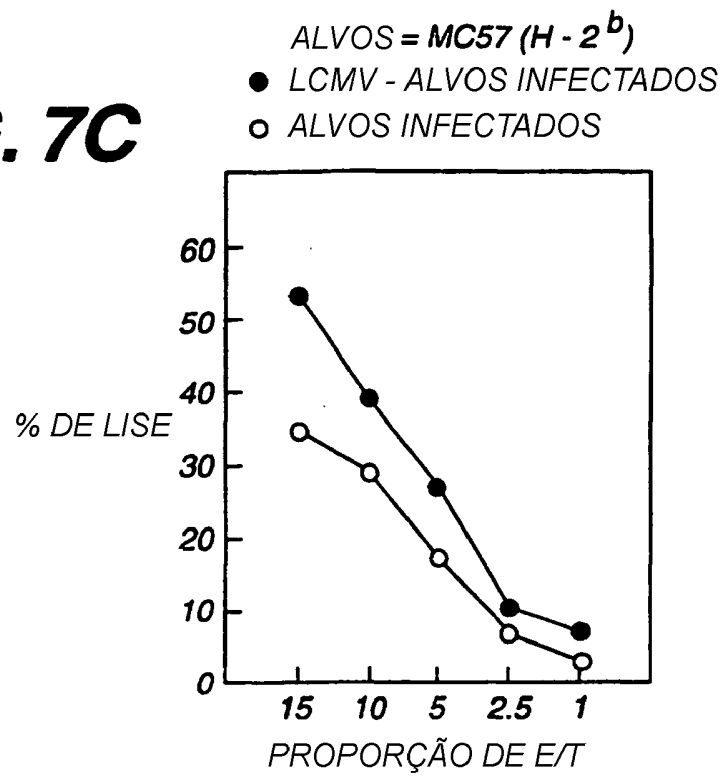
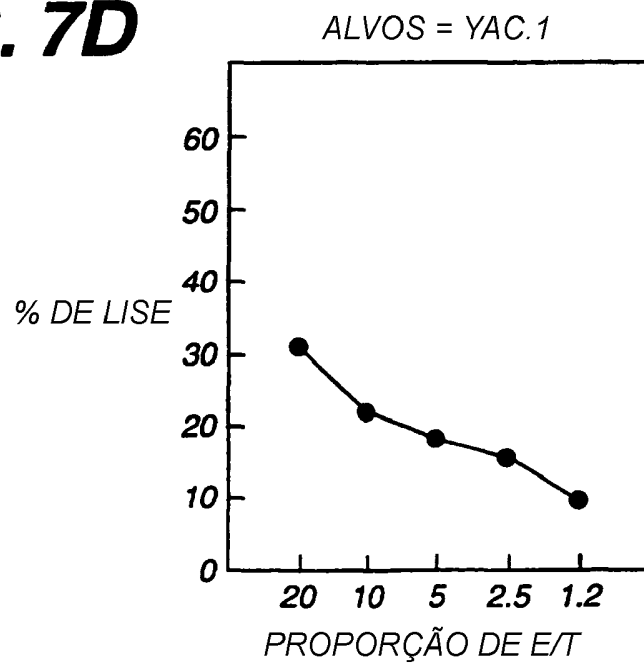
FIG. 7C**FIG. 7D**

FIG. 8