

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.08.06	(73) Titular(es): BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE ONE BAYLOR PLAZA HOUSTON, TX 77030 US OPEXA PHARMACEUTICALS, INC. US
(30) Prioridade(s): 2002.08.08 US 402521 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.09.07	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.01 192/2015	(72) Inventor(es): JINGWU Z. ZANG US
	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A VACINAS DE CÉLULAS T AUTÓLOGAS MELHORADAS E MÉTODOS MELHORADOS PARA A SUA PRODUÇÃO. A INVENÇÃO TAMBÉM É DIRIGIDA A MÉTODOS PARA TRATAR DOENÇAS AUTOIMUNES, TAIS COMO ESCLEROSE MÚLTIPLA OU ARTRITE REUMATÓIDE UTILIZANDO VACINAS DE CÉLULAS T AUTÓLOGAS. A INVENÇÃO É AINDA DIRIGIDA AO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A CÉLULAS T.

RESUMO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T

A presente invenção refere-se a vacinas de células T autólogas melhoradas e métodos melhorados para a sua produção. A invenção também é dirigida a métodos para tratar doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla ou artrite reumatóide utilizando vacinas de células T autólogas. A invenção é ainda dirigida ao diagnóstico de doenças associadas a células T.

DESCRIÇÃO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, em geral, ao campo de diagnóstico e tratamento de doença autoimune, tal como esclerose múltipla (MS). Mais particularmente, diz respeito ao isolamento de células T específicas de antígeno. Além disso, a presente invenção diz respeito à utilização de células T específicas de antígeno para o tratamento de doença autoimune, tal como MS.

ANTECEDENTES

Complexos de reconhecimento intercelular formados pelos recetores de células T (TCR) em linfócitos T citotóxicos ou células auxiliares T e complexos MHC/péptido em células apresentadoras de antígeno (APC) são um componente de reconhecimento comum num conjunto diverso de encontros célula-célula que ativam células T tanto durante o desenvolvimento do repertório de células T dentro de um organismo individual (seleção positiva; seleção negativa; sobrevivência periférica) e durante o controlo (auxiliar T) e estádios efetores (exterminadora T) de uma resposta imune adaptativa.

Na resposta imune adaptativa, os antígenos são reconhecidos por moléculas hipervariáveis, tais como anticorpos ou TCRs, que são expressos com estruturas suficientemente diversas para conseguirem reconhecer qualquer antígeno. Anticorpos podem-se ligar a qualquer parte da superfície de um antígeno. TCRs, contudo, estão restritos à ligação a péptidos curtos ligados a moléculas de classe I ou classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na superfície de APCs. O reconhecimento de TCR de um complexo péptido/MHC despoleta ativação (expansão clonal) da célula T.

TCRs são heterodímeros compostos por duas cadeias que podem ser $\alpha\beta$ (alfa-beta) ou $\gamma\delta$ (gama-delta). A estrutura dos TCRs é muito semelhante à das imunoglobulinas (Ig). Cada cadeia tem dois domínios extracelulares que são dobras de imunoglobulina. O domínio amino-terminal é altamente variável e chamado o domínio variável (V). O domínio mais próximo da membrana é o domínio constante (C). Estes dois domínios são análogos aos das imunoglobulinas e parecem-se com fragmentos Fab. O domínio V de cada cadeia tem três regiões determinantes de complementaridade (CDR). Próximo da membrana, cada cadeia TCR tem uma curta sequência de ligação com um resíduo de cisteína que forma uma ligação dissulfido entre duas cadeias.

Os genes que codificam os heterodímeros $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ só são expressos na linhagem das células T. Os quatro loci TCR (α , β , γ e δ) têm uma organização germinativa muito semelhante à da Ig. As cadeias α e γ são produzidas por re-arranjos dos segmentos V e J, ao passo que as cadeias β e δ são produzidas por re-arranjos dos segmentos V, D e J. Os segmentos do gene para cadeias TCR estão localizados em diferentes cromossomas, exceto os segmentos do gene da cadeia δ que estão entre os segmentos do gene V e J da cadeia α . A localização dos segmentos do gene da cadeia δ tem uma significância: um re-arranjo produtivo dos segmentos do gene da cadeia α deleta genes C da cadeia δ , de modo que numa dada célula o heterodímero $\alpha\beta$ não pode ser co-expresso com o recetor $\gamma\delta$.

Em ratinhos, existem cerca de 100 segmentos do gene V α e 50 J α e apenas um segmento C α . A família de genes de cadeia δ tem cerca de 10 V, 2 D e 2 J segmentos de gene. A família de genes de cadeia β tem 20-30 V segmentos e duas repetições idênticas contendo 1 D β , 6 J β e 1 C β . Finalmente, a família de genes de cadeia γ contém 7 V e 3 repetições J-C diferentes. Em humanos a organização é semelhante à dos ratinhos, mas o número de segmentos varia.

Os re-arranjos dos segmentos de genes nas cadeias α e β é semelhante à dos Igs. A cadeia α , como a cadeia leve da Ig é codificada pelos segmentos dos genes V, J e C. A cadeia β , como a cadeia pesada da Ig, é codificada pelos segmentos dos genes V, D e J. Os re-arranjos dos segmentos de genes de uma cadeia resultam na junção de VJ e os re-arranjos da cadeia β resultam na junção de VDJ. Após transcrição dos genes re-arranjados, processamento do ARN e translação as cadeias α e β são expressas ligadas por uma ligação dissulfido na membrana das células T.

Os segmentos do gene TCR são flanqueados pelo reconhecimento de sequências sinal (RSS) contendo um heptâmero e nonâmero com uma sequência interveniente ou de 12 nucleotídeos (uma curva) ou 23 nucleotídeos (duas curvas). Como nas Igs, as enzimas codificadas por genes ativadores de recombinação (RAG-1 e RAG-2) são responsáveis pelos processos de recombinação. RAG1/2 reconhece o RSS e junta os segmentos V-J e V-D-J da mesma forma que os re-arranjos da Ig. Em suma, estas enzimas cortam uma cadeia de ADN entre o segmento do gene e o RSS e catalizam a formação de um grampo na sequência codificadora. A sequência sinal é subsequentemente excisada.

A junção combinatória dos segmentos V e J nas cadeias α e segmentos V, D e J nas cadeias β produz um grande número de moléculas possíveis, criando, assim, uma diversidade de TCRs. A diversidade também é conseguida nos TCRs por junção alternativa dos segmentos dos genes. Por oposição a Ig, os segmentos dos genes β e δ podem ser juntos de formas alternativas. Os segmentos dos genes flanqueadores RSS nos segmentos dos genes β e δ podem gerar VJ e VDJ na cadeia β e VJ, VDJ e VDDJ na cadeia δ . Como no caso da Ig, a diversidade também é produzida pela variabilidade na junção dos segmentos dos genes.

Laços hipervariáveis do TCR, conhecidos como regiões determinantes de complementaridade (CDRs), reconhecem a

superfície composta feita de uma molécula MHC e um péptido ligado. Os laços CDR2 de α e β contactam apenas a molécula MHC na superfície de APC, enquanto que os laços CDRI e CDR3 contactam ambos o péptido e a molécula MHC. Comparado com Ig, TCRs têm uma diversidade mais limitada na CDRI e CDR2. Contudo, a diversidade dos laços CDR3 em TCRs é maior do que a da Ig, porque os TCRs podem juntar mais de um segmento D conduzindo a diversidade de junção aumentada.

Pensa-se que a patogénese de um número de doenças autoimunes é causada por respostas de células T autoimunes a auto-antígenos presentes no organismo. Nem todas as células T auto-reativas são eliminadas no timo, contrariando o paradigma de seleção clonal. Aquelas células T com TCRs para um espectro amplo de auto-antígenos representa parte do repertório normal de células T e circulam naturalmente na periferia. Não é claro porque razão as células T auto-reativas são permitidas, durante a sua evolução, passarem por diferenciação no timo e serem acomodadas na periferia. Ainda que o seu papel fisiológico não seja compreendido, estas células T auto-reativas, quando ativadas, apresentam um risco potencial na indução de patologias autoimunes. Células T auto-reativas também podem ser isoladas de indivíduos normais sem as consequências das doenças autoimunes. Foi estabelecido que o reconhecimento pelo antígeno da auto-reatividade por si próprio não é suficiente para mediar o processo autodestrutivo. Um dos pré-requisitos para as células T auto-reativas serem patogénicas é que elas têm de ser ativadas.

Células T auto-reativas estão implicadas na patogénese de doenças autoimunes, tais como esclerose múltiplas (MS) e artrite reumatóide (RA). A patogénese das células T auto-reativas na MS é geralmente considerada como surgindo das respostas das células T a antígenos de mielina, em particular proteína básica da mielina (MBP). Observa-se que

as células T reativas a MBP passam por ativação *in vivo* e ocorrem a uma frequência precursora mais elevada no sangue e fluído cerebrospinal em pacientes com MS por oposição a indivíduos controlo. Estas células T reativas a MBP produzem citocinas T_H1 , por exemplo, IL-2, TNF α e γ -interferão (IFN γ), que facilitam a migração das células inflamatórias para o sistema nervoso central e exacerbam respostas inflamatórias destrutivas de mielina em MS.

Também se demonstrou que as células T reativas a mielina estão envolvidas na patogénese de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais, que se parece a MS. EAE pode ser induzida ativamente em animais suscetíveis injetando proteínas mielina emulsionadas num adjuvante ou passivamente injetando linhas de células T reativas a mielina e clones derivados de animais sensibilizados a mielina. Quando ativadas *in vitro*, são precisos números muito pequenos de células T reativas a mielina para induzir EAE, enquanto que 100 vezes mais células T em descanso com a mesma reatividade são incapazes de mediar EAE.

Demonstrou-se que EAE é prevenida e também tratada por vacinação com células T reativas a mielina desativadas, um procedimento designado vacinação com células T (Ben-Nun et al., Nature, 1981; 292: 60-61). A vacinação com células T induz respostas imunes reguladores compreendidas de células T anti-idiotípicas e células T ergotípicas, que conduzem à depleção de células T reativas a mielina. Ao depletar células T reativas a mielina, são observados efeitos terapêuticos na EAE e noutros modelos de doença autoimune experimental (Líder et al., Science, 1988; 239:820-822; Lohse et al., Science, 1989; 244: 820-822).

Devido ao sucesso nos modelos de doença autoimune, a vacinação de células T avançou recentemente para ensaios clínicos em pacientes com MS. Com base nos resultados em modelos experimentais tais como EAE, pensa-se que a depleção de células T auto-reativas pode melhorar o curso

clínico de MS e outras doenças autoimunes.

Num ensaio clínico piloto, a vacinação com clones de células T reativos a MBP autólogos irradiados despoletaram respostas de células T citolíticas CD8⁺ que reconheceram especificamente e lisaram células T reativas a MBP circulantes (Zhang et al., Science, 1993; 261: 1451-1454, Medaer et al.. Lancet 1995: 346:807-808). Três inoculações subcutâneas com clones de células T reativos a MBP irradiados resultaram na depleção de células T reativas a MBP circulantes em pacientes com MS.

Num ensaio clínico preliminar, células T reativas a MBP circulantes foram depletadas na recaída de pacientes com MS remitentes e pacientes com MS progressiva secundária (Zhang et al., J Neurol., 2002; 249:212-8) vacinando os pacientes com três injeções subcutâneas de células T reativas a MBP autólogas irradiadas. A vacinação com células T foi benéfica para cada grupo de pacientes conforme medida pela taxa de reincidência, classificação de escala de incapacidade expandida e atividade de lesão MRI. Contudo, houve uma tendência para uma progressão acelerada após cerca de doze meses após a última injeção. A significância da progressão acelerada aparente é desconhecida, mas pode estar associada com um declínio gradual da imunidade induzida pela vacinação com células T contra células T reativas a MBP. Em aproximadamente 10-12% dos pacientes imunizados, células T reativas a MBP reapareceram sensivelmente ao mesmo tempo que a progressão acelerada. Nalguns casos, as células T reativas a MBP que reapareceram originaram-se de diferentes populações clonais que não foram detetadas antes da vacinação, o que sugere que células T reativas a MBP podem passar por mudança clonal ou dispersão de epítipo. A mudança clonal de células T reativas a MBP foi observada em estudos anteriores (Zhang et al. 1995) e pode estar associada com o processo de doença em curso.

Apesar da vacinação com células T ter sido demonstrada ser eficaz para depletar células T reativas a mielina e potencialmente benéfica para pacientes com MS, existem vários problemas com o tratamento. O tratamento com vacina com células T para cada paciente tem de ser individualizado, porque os recetores das células T de células T reativas a mielina são altamente diversos e variam entre diferentes pacientes com MS (Vandevyver et al., Eur. J. Immunol., 1995; 25:958-968, Wucherpfennig et al., J. Immunol., 1994; 152:5581-5592, Hong et al., J. Immunol., 1999; 163:3530-3538).

Além de ser individualizado para cada paciente, são necessárias até 8 semanas para produzir uma dada vacina com células T utilizando procedimentos atuais. A produção de uma vacina com células T começa com o isolamento de células mononucleares do fluído cerebrospinal (CSFMCs) ou sangue periférico (PBMCs) de um paciente. As células mononucleares isoladas são depois cultivadas com péptidos de mielina durante 7-10 dias para ativar células T reativas a mielina. As culturas são depois testadas em relação a proliferação específica a péptidos de mielina medindo a incorporação de [³H]-timidina na presença de péptidos de mielina ao longo de um período de 3 dias. As culturas que testam positivo para proliferação específica a são depois diluídas em série para obter linhas de células T clonais ou diretamente expandidas. As células são depois cultivadas até 6-8 semanas para expandir as células T. Quando o produto da vacina com células T final é clonal, as células T são homogéneas com um único padrão de utilização de gene V β -D β -J β . Normalmente, três a seis das linhas de células clonais são combinadas para produzir uma formulação heterogénea com padrões múltiplos de utilização de gene V β -D β -J β . Quando o produto da vacina com células T final é produzido por expansão direta, as células T são heterogéneas com mais de um padrão de utilização de gene V β -D β -J β .

A natureza individualizada da vacinação com células T e a cultura de células prolongada necessária para produção de cada vacina tornam o tratamento caro e laborioso com as metodologias atuais. O tempo adicional necessário para o cultivo de células também cria um risco significativo de contaminação. Finalmente, a probabilidade de mudança clonal ou dispersão de epítipo das células T reativas a mielina pode requerer a produção subsequente de uma vacina com células T para cada paciente com um diferente padrão de utilização de gene V β -D β -J β .

Logo, existe uma necessidade de desenvolver métodos melhorados de isolar células T com especificidade para antigénios, tais como MBP, que possam ser utilizadas para produzir vacinas com células T para o tratamento de pacientes com doenças mediadas por células T, tais como MS. Também existe uma necessidade de desenvolver métodos melhorados para produzir vacinas com células T com um padrão heterogéneo de utilização de gene V β -D β -J β para precaver a mudança clonal de células T auto-reativas.

P. Stinissen *et al.* descrevem respostas de células T gama-delta a células T activadas em paciente com esclerose múltipla induzidas pela vacinação com células T (J. NEUROIMMUNOLOGY, Vol. 87, n.º 1-2, 1 de julho de 1998, páginas 94-104).

P. Stinissen *et al.* descrevem a vacinação com clones de células T autoreativas na esclerose múltipla e fornecem uma visão geral de dados imunológicos e clínicos (J. NEUROSCIENCE RESEARCH, Vol. 45, n.º 4, 15 de agosto de 1996, páginas 500-511).

J. Zhang *et al.* descrevem vacinações com células T e aplicações clínicas em doenças autoimunes (J. MOLECULAR MEDICINE, Vol. 74, n.º 11, 1996, páginas 653-662).

J. Zhang *et al.* descrevem a depleção restringida por MHC de células T reativas para proteína básica da

mielina através da vacinação com células T (SCIENCE, Vol. 261, n.º 5127, 10 de setembro de 1993, páginas 1451-1454).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O presente está geralmente dirigido a métodos de isolar células T específicas de antígeno e, mais particularmente, células T específicas para auto-antígenos. Os métodos para isolar uma ou mais células T específicas para um antígeno de interesse geralmente compreendem incubar uma amostra que compreende células T obtidas de um paciente com dito antígeno ou um derivado do mesmo; selecionar uma ou mais células T que expressam um ou mais primeiros marcadores selecionados do grupo que consiste em CD69, CD4, CD25, CD36 e HLADR; e um ou mais segundos marcadores selecionados do grupo que consiste em IL-2, IFN γ , TNF α , IL5, IL-10 e IL-13.

Os métodos da divulgação são particularmente úteis para isolar células T auto-reativas que desempenham um papel na patogénese de doenças autoimunes.

Os métodos da divulgação também permitem o diagnóstico de doença auto-imune bem como a monitorização da progressão da doença e para a monitorização da eficácia dos tratamentos para a doença.

Os métodos da invenção também permitem a preparação de vacinas com células T autólogas para o tratamento de doenças autoimunes relacionadas com células T.

Os métodos para a preparação da vacina envolvem geralmente o isolamento de células T específicas de antígeno, conforme descrito anteriormente, seguido, opcionalmente, de etapas de cultivo subsequentes que permite a expansão da população de células T específicas de antígeno isoladas.

A invenção também está dirigida a vacinas com células T e composições farmacêuticas que compreendem células T específicas de antígeno isoladas utilizando os métodos da

invenção.

Os métodos da divulgação também são úteis para a caracterização de recetores de células T e dos seus ácidos nucleicos codificantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 demonstra a identificação por FACS de células que expressam CD69 e γ IFN (topo) e CD69 e TNF α (baixo) num paciente com esclerose múltipla antes da estimulação (esquerda), após estimulação com os resíduos 83-99 de MBP (meio) e após estimulação com os resíduos 83-99 de MBP (direita).

A Figura 2 demonstra a identificação por FACS de células que expressam CD69 e γ IFN (topo) e CD69 e TNF α (baixo) num paciente controlo saudável antes da estimulação (esquerda), após estimulação com os resíduos 83-99 de MBP (meio) e após estimulação com os resíduos 83-99 de MBP (direita).

DESCRIÇÃO DETALHADA

1. Definições

Para auxiliar no entendimento da presente invenção, são definidos a seguir vários termos.

"Auto-antigénio" ou "auto-antigénio", conforme utilizado aqui, refere-se a um antigénio ou epítopo que é nativo do mamífero que é imunogénico em dito mamífero e é conservado nessa espécie de mamífero e que pode estar envolvido na patogénese de doença autoimune.

"CD," "grupo de diferenciação" ou "determinante comum", conforme utilizado aqui, refere-se a moléculas da superfície celular reconhecidas pelos anticorpos. A expressão de algumas CDs é específica para células de uma linhagem particular ou via de maturação e a expressão de outras varia de acordo com o estado de ativação, posição ou diferenciação das mesmas células.

"Derivado de" ou "um derivado do mesmo," no context de sequências nucleotídicas significa que a sequência

nucleotídica não está limitada à sequência específica descrita, mas também inclui variações nessa sequência, que podem incluir adições, deleções, substituições ou modificações de nucleotídeos na medida em que as variações à sequência descrita retenham a capacidade de hibridizar em condições de estringência moderadas a altas com o complemento da sequência descrita. No contexto de sequências peptídicas ou polipeptídicas, "derivado de" ou "um derivado do mesmo" significa que o péptido ou polipeptídeo não está limitado à sequência específica descrita, mas também inclui variações nessa sequência, que podem incluir adições, deleções, substituições ou modificações de aminoácidos na medida em que as variações na sequência litada retenham a capacidade de despoletar uma resposta imune à sequência descrita.

"Imunogénico," quando utilizado para descrever um péptido ou polipeptídeo, significa que o péptido ou polipeptídeo é capaz de induzir uma resposta imune, seja mediada por células T, anticorpo ou ambos.

"Doença relacionada com imunidade" significa uma doença na qual o sistema imune está envolvido na patogénese da doença. Um subconjunto de doenças relacionadas com imunidade são as doenças autoimunes. As doenças autoimunes incluem, mas não se limitam a, artrite reumatóide, miastenia grave, esclerose múltipla, psoríase, lúpus eritematoso sistémico, tiroidite autoimune (tiroidite de Hashimoto), doença de Graves, doença inflamatória intestinal, uveoretinite autoimune, polimiosite e certos tipos de diabetes. Com vista à presente revelação, alguém habilitado na arte pode prontamente perceber outras doenças autoimunes tratáveis pelas composições e métodos da presente invenção.

"PCR" significa a reação em cadeia da polimerase, por exemplo, conforme geralmente descrita na Patente U.S. N.º 4 683 202 (emitida em 28 de julho de 1987 para Mullis). PCR é

uma técnica de amplificação em que oligonucleotídeos selecionados, ou iniciadores, podem ser hibridizados com moldes de ácidos nucleicos na presença de um agente de polimerização (tal como uma polimerase de ADN ou ARN) e nucleotídeo de trifosfatos, pelo que podem ser formados produtos de extensão a partir dos iniciadores. Estes produtos podem depois ser desnaturados e utilizados como moldes numa reação de ciclagem que amplifica o número e quantidade de ácidos nucleicos existentes que podem facilitar a sua subsequente deteção. São conhecidas uma variedade de técnicas de PCR na arte e podem ser utilizadas em ligação com a revelação aqui.

Um "péptido" ou "polipeptídeo" é uma sequência ligada de aminoácidos e pode ser natural, sintético ou uma modificação ou combinação de natural e sintético.

"Iniciador" significa um oligonucleotídeo, seja natural, sintético ou uma modificação do mesmo, capaz de agir como um ponto de iniciação de síntese nucleotídica suficientemente complementar a uma sequência nucleotídica específica numa molécula molde.

"Sonda" significa um oligonucleotídeo, seja natural, sintético ou uma modificação do mesmo, capaz de ligar especificamente a uma síntese nucleotídica suficientemente complementar.

"Doença mediada por células T" significa uma doença que surge como um resultado das células T reconhecerem auto-antígenos.

"Tratamento" ou "tratar," quando se refere à proteção de um animal de uma doença, significa prevenir, suprimir, reprimir ou eliminar completamente a doença. Prevenir a doença envolve administrar uma composição da presente invenção a um animal antes do despoletar da doença. Suprimir a doença envolve administrar uma composição da presente invenção a um animal após indução da doença, mas antes do seu aparecimento clínico. Reprimir a doença

envolve administrar uma composição da presente invenção a um animal após o aparecimento clínico da doença.

2. Isolamentos de células T específicas de antígeno

a. Isolamento de células T específicas de antígeno monoclonais

Células T podem ser ativadas e expandidas na cultura de células por incubação com um alvo antigénico e células apresentadoras de antígeno. Uma vez ativadas, as células T passam por uma cascada complexa de sinalização celular que conduz à transcrição e expressão de muitos produtos génicos. A invenção descrita aqui tira partido de produtos génicos específicos para células T ativadas para a identificação e isolamento de células T com especificidade de antígeno desejada.

Num primeiro aspeto, a presente divulgação está dirigida a um método para isolar uma célula T que é específica por um antígeno de interesse. Uma amostra que compreende células T é incubada com um antígeno particular, que causa a ativação de uma célula T específica por um antígeno de interesse. A amostra pode ser incubada com o antígeno durante 1 a 7 dias. A amostra também pode ser incubada com o antígeno durante menos de 1 dia. A amostra também pode ser incubada com o antígeno durante menos de 16 horas. A amostra também pode ser incubada com o antígeno durante menos de 12 horas. A amostra também pode ser incubada com o antígeno durante menos de 8 horas. A amostra também pode ser incubada com o antígeno durante menos de 4 horas. A amostra também pode ser incubada com o antígeno durante menos de 2 horas.

Uma célula T específica por um antígeno de interesse pode depois ser isolada selecionando células T que expressam produtos génicos de células T ativadas, conforme descrito anteriormente. Subconjuntos de células T ativadas podem ser isoladas selecionando células T com produtos génicos específicos de subconjunto ou marcadores de

superfície celular (por exemplo, CD4 vs. CD8).

O antígeno de interesse inclui proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP), glicoproteína oligodendrócito-mielina (MOG) ou um fragmento da mesma. O antígeno de interesse também pode ser um fragmento imunodominante incluindo, mas não limitado a, resíduos 83-99 ou resíduo 151-170 de MBP. O antígeno de interesse também pode ser uma combinação de dois ou mais antígenos individuais de interesse.

O antígeno ou um derivado do mesmo, utilizado para ativar as células T pode ser qualquer imunogene que é capaz de despoletar uma resposta imune ao antígeno de interesse. O antígeno ativador pode ser o antígeno de interesse, ou um derivado do mesmo. O antígeno ativador pode ser MBP, PLP, MOG ou um fragmento e/ou derivado do mesmo. O antígeno ativador também pode ser um fragmento imunodominante incluindo, mas não limitado a, resíduos 83-99 o resíduo 151-170 de MBP ou um fragmento e/ou derivado do mesmo. O antígeno ativador também pode ser uma combinação de dois ou mais antígenos ativadores individuais. O antígeno ativador pode ser utilizado uma ou mais vezes para ativar células T específicas por um antígeno de interesse.

As células T podem estar presentes em qualquer amostra que compreende células mononucleares. A amostra pode ser isolada a partir do sangue periférico ou fluído cerebrospinal de um paciente com MS ou a partir de um fluído sinovial de um paciente com RA. Células T de pacientes com outras doenças autoimunes podem ser isoladas de forma semelhante a partir de sangue periférico e/ou tecidos envolvidos com a doença. As células mononucleares podem ser enriquecidas na amostra utilizando técnicas de centrifugação conhecidas daqueles na arte incluindo, mas não limitadas a, gradientes Ficoll®. Células T também podem ser enriquecidas na amostra utilizando seleção positiva,

seleção negativa ou uma combinação das mesmas para expressão de produtos génicos de células T.

O produto génico para identificar ou selecionar negativamente células T ativadas pode ser um marcador de superfície celular ou citocina ou uma combinação dos mesmos. Marcadores de superfície celular para identificar células T ativadas incluem, mas não se limitam a, CD69, CD4, CD8, CD25, HLA-DR, CD28 e CD134. CD69 é um marcador de ativador precoce encontrado em linfócitos B e T, células NK e granulócitos. CD25 é um recetor IL-2 e é um marcador para células T ativadas e células B. CD4 é um co-recetor TCR e é um marcador para timócitos, células T de tipo T_H1 e T_H2 , monócitos e macrófagos. CD8 é também um co-recetor TCR e é um marcador para células T citotóxicas. CD134 é expressa apenas em células T $CD4^+$ ativadas.

Marcadores de superfície celular para selecionar negativamente células T ativadas incluem, mas não se limitam a, CD36, CD40 e CD44. CD28 age como uma via de ativação de células T estimuladoras independente da via do recetor de células T e é expresso em células $CD4^+$ e $CD8^+$. CD36 é uma glicoproteína de membrana e é um marcador para plaquetas, monócitos e células endoteliais. CD40 é um marcador para células B, macrófagos e células dendríticas. CD44 é um marcador para macrófagos e outras células fagocíticas. Subconjuntos de células T podem ser isolados utilizando seleção positiva, seleção negativa ou uma combinação das mesmas para expressão de produtos génicos da superfície celular de células T auxiliares ou células T citotóxicas (por exemplo, CD4 vs. CD8).

Citocinas para identificar células T incluem, mas não se limitam a, citocinas produzidas por células T de tipo T_H1 (resposta mediada pela célula) e células T de tipo T_H2 (resposta de anticorpo). Citocinas para identificar células T de tipo T_H1 ativadas incluem, mas não se limitam a, IL-2, interferão gama (γ IFN) e fator de necrose de tecido alfa

(TNF α). Citocinas para identificar células T de tipo T_H2 ativadas incluem, mas não se limitam a, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Subconjuntos de células T também podem ser isolados utilizando seleção positiva, seleção negativa ou uma combinação das mesmas para expressão de produtos de genes de citocinas de células T auxiliares ou células T citotóxicas (por exemplo, γ IFN vs. IL4).

Uma célula T de tipo T_H1 ativada específica por um antígeno de interesse pode ser isolada identificando células que expressam CD69, CD4, CD25, IL-2, IFN γ , TNF α ou uma combinação dos mesmos. Uma célula T de tipo T_H1 ativada específica por um antígeno de interesse também pode ser isolada identificando células que expressam CD69 e CD4 juntos com IFN γ ou TNF α . Uma célula T de tipo T_H2 ativada específica por um antígeno de interesse também pode ser isolada identificando células que expressam CD69, CD4, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ou uma combinação dos mesmos. Uma combinação de uma célula T de tipo T_H1 ativada e uma célula T de tipo T_H2 específica por um antígeno de interesse pode ser isolada identificando células que expressam CD69, CD4, CD25, IL-2, IFN γ , TNF α ou uma combinação dos mesmos e células que expressam CD69, CD4, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ou uma combinação dos mesmos.

Os produtos génicos utilizados para seleção positiva ou negativa de células T ativadas podem ser identificados por técnicas imunoseleção conhecidas daqueles na arte que utilizam anticorpos incluindo, mas não limitadas a, classificação de células ativadas por fluorescência (FACS), classificação de células magnética, panning e cromatografia. A imunoseleção de dois ou mais marcadores em células T ativadas pode ser realizada numa ou em mais etapas, em que cada etapa seleciona positiva ou negativamente um ou mais marcadores. Quando a imunoseleção de dois ou mais marcadores é realizada numa etapa utilizando FACS, os dois ou mais anticorpos diferentes

podem ser rotulados com diferentes fluoróforos.

A classificação de células magnética pode ser realizada utilizando micropérolas super-paramagnéticas compostas de óxido de ferro e um revestimento de polissacarídeo. Preferencialmente as micropérolas podem ter aproximadamente 50 nanómetros de diâmetro e ter um volume de cerca de um milionésimo o de uma célula de mamífero típica. As micropérolas são preferencialmente pequenas o suficiente para permanecerem em suspensão coloidal que permite ligação rápida, eficiente a antígenos da superfície celular. As micropérolas preferencialmente não interferem com citometria de fluxo, são biodegradáveis e têm efeitos insignificantes nas funções celulares. A ligação do anticorpo às micropérolas pode ser direta ou indireta, através de um segundo anticorpo a um ligando, tal como fluoresceína.

O anticorpo pode ser das classes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE ou fragmentos ou derivados dos mesmos, incluindo Fab, $F(ab')_2$, Fd e anticorpos de cadeia simples, diácorpos, anticorpos bispecíficos, anticorpos bifuncionais e derivados dos mesmos. O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, anticorpo policlonal, anticorpo purificado de afinidade ou misturas dos mesmos que exhibe especificidade de ligação suficiente por um epítipo de um produto génico específico para células T ativadas ou uma sequência derivada dele. O anticorpo também pode ser um anticorpo quimérico.

O anticorpo pode ser derivado pela anexação de uma ou mais frações químicas, peptídicas ou polipeptídicas conhecidas na arte que permitem a identificação e/ou seleção de células T ativadas às quais o anticorpo é ligado. O anticorpo pode ser conjugado com uma fração química, tal como um corante fluorescente. Uma célula T ativada ligada por um anticorpo rotulado fluorescentemente pode ser isolada utilizando técnicas incluindo, mas não

limitadas a, classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). O anticorpo também pode ser conjugado com uma partícula magnética, tal como uma micropêrola paramagnética (Miltenyi Biotec, Alemanha). Uma célula T ativada ligada por um anticorpo rotulado magneticamente pode ser isolado utilizando técnicas incluindo, mas não limitadas a, classificação de células magnética.

Para produtos génicos expressos na superfície celular, o anticorpo pode ligar diretamente ao produto génico e pode ser utilizado para seleção celular. Para produtos génicos na superfície celular expressos a baixas concentrações, podem ser utilizados lipossomas magnetofluorescentes (Scheffold, et al. *Nature Med* 6:107-110, 2000) para seleção celular. A baixos níveis de expressão, os anticorpos rotulados fluorescentemente convencionais podem não ser sensíveis o suficiente para detetar a presença do produto génico expresso na superfície celular. Lipossomas contendo fluoróforos podem ser conjugados a anticorpos com a especificidade de interesse, permitindo, assim, a deteção do produto génico expresso na superfície celular.

Para produtos génicos intracelulares, tais como citocinas, o anticorpo pode ser utilizado após permeabilizar as células. Em alternativa, para evitar matar as células por permeabilização, o produto génico intracelular se é basicamente segregado da célula pode ser detetado à medida que é segregado pela membrana celular utilizando um anticorpo "catch" na superfície celular. O anticorpo catch pode ser um anticorpo duplo que é específico para dois antígenos diferentes: (i) o produto génico segregado de interesse e (ii) uma proteína de superfície celular. A proteína de superfície celular pode ser qualquer marcador de superfície presente em células T, em particular, ou linfócitos em geral (por exemplo, CD45). O anticorpo catch pode primeiro ligar à proteína de superfície celular e depois ligar ao produto génico

intracelular de interesse à medida que é segregado pela membrana, retendo, assim, o produto génico na superfície da célula. Um anticorpo rotulado específico para o produto génico capturado pode depois ser utilizado para ligar ao produto génico capturado, que permite a seleção da célula T ativada (Manz, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1921-1925, 1995).

Certas formas de citocinas também são encontradas expressas a baixa concentração na superfície celular. Por exemplo, γ IFN é exibido a uma baixa concentração à superfície celular com cinética semelhante à dos de expressão de γ IFN intracelular (Assenmacher, et al. Eur J. Immunol, 1996, 26:263-267). Para formas de citocinas expressas à superfície celular, anticorpos rotulados fluorescentemente convencionais ou lipossomas contendo fluoróforos podem ser utilizados para detetar a citocina de interesse. Alguém com habilitação comum na arte reconhecerá outras técnicas para detetar e selecionar produtos génicos extracelulares e intracelulares específicos para células T ativadas.

As células T podem ser enriquecidas em pelo menos 90% do sangue inteiro. As células T também podem ser enriquecidas em pelo menos 95% do sangue inteiro. As células T também podem ser enriquecidas em pelo menos 98% do sangue inteiro. As células T também podem ser isoladas em pelo menos 99,5% do sangue inteiro.

b. Células T específicas de antígeno monoclonal isoladas

Num segundo aspeto, a célula T específica para um antígeno de interesse é isolada através do método do primeiro aspeto.

c. Isolamento de células T específicas de antígeno policlonal

Num terceiro aspeto, a presente divulgação é dirigida a um método para isolar células T que são específicas para um ou mais antígenos, de interesse. Uma amostra que

compreende células T é incubada com um ou mais antigénios que causam a ativação de células T específicas para um ou mais antigénios. Células T específicas para um ou mais antigénios podem depois ser isoladas.

As células T podem ter um padrão heterogéneo de utilização de genes $V\beta$ - $D\beta$ - $J\beta$ que expressam diferentes TCRs que são cada específicos por um antigénio de interesse. As células T podem ter um padrão heterogéneo de utilização de genes $V\beta$ - $D\beta$ - $J\beta$ que expressam diferentes TCRs que são específicos por mais de um antigénio de interesse. Conforme descrito anteriormente, as células T que compreendem um padrão heterogéneo de utilização de genes $V\beta$ - $D\beta$ - $J\beta$ podem ser utilizadas para formular uma vacina de células T policlonais que pode prevenir o epítipo de dispersar em pacientes vacinados.

d. Células T específicas de antigénio policlonal isoladas

Num quarto aspeto, as células T específicas por um ou mais antigénios de interesse isolados pelo método do terceiro aspeto.

3. Quantificar o número de células T específicas de antigénio

Num quinto aspeto, um método de determinar a frequência relativa de células T específicas por um ou mais antigénios de interesse numa amostra determinando o número de células T isoladas pelo método do primeiro ou terceiro aspetos.

4. Diagnosticar uma doença autoimune

Num sexto aspeto, um paciente com uma doença autoimune pode ser diagnosticado obtendo uma amostra de um paciente e isolando células T auto-reativas pelo método do primeiro ou terceiro aspetos. A doença autoimune pode ser diagnosticada comparando o nível de células T auto-reativas num paciente com um controlo. O nível de células T auto-reativas pode ser determinado de acordo com o método do quinto aspeto.

5. Monitorizar o progresso de uma doença autoimune

Num sétimo aspeto, uma doença autoimune pode ser monitorizada determinando a frequência de células T auto-reativas numa amostra de um paciente com uma doença autoimune de acordo com o quinto aspeto. A severidade dos sintomas da doença autoimune pode correlacionar com o número de células T auto-reativas. Além disso, um aumento no número de células T auto-reativas na amostra pode ser utilizado como uma indicação para aplicar tratamentos pretendidos para minimizar a severidade dos sintomas e/ou tratar a doença antes dos sintomas aparecerem.

6. Produzir uma vacina para o tratamento de uma doença autoimune

Num oitavo aspeto da presente invenção, pode ser produzida uma composição para tratar uma doença autoimune desativando células T auto-reativas que foram isoladas (e opcionalmente expandidas em cultura conforme descrito aqui) pelo método do primeiro ou terceiro aspetos. As células T auto-reativas podem ser desativadas utilizando um número de técnicas conhecidas daqueles na arte incluindo, mas não limitadas a, inativação química ou irradiação. As células T auto-reativas podem ser preservadas antes ou depois da inativação utilizando um número de técnicas conhecidas daqueles na arte incluindo, mas não limitadas a, criopreservação. Conforme descrito a seguir, a composição pode ser utilizada como uma vacina para depletar células T auto-reativas em pacientes autoimunes.

A composição pode ser uma composição farmacêutica, que pode ser produzida utilizando métodos bem conhecidos na arte. Composições farmacêuticas utilizadas como terapêuticas pré-clínicas e clínicas no tratamento de doença ou distúrbios podem ser produzidas por aqueles com habilitação, empregando princípios de diagnóstico e tratamento aceites. Tais princípios são conhecidos na arte e são apresentados, por exemplo, em Braunwald et al.,

editores, Harrison's Principles of Internal Medicine, 11^a Edição, McGraw-Hill, editor, Nova Iorque, N.Y. (1987). A composição farmacêutica pode ser administrada a qualquer animal que possa experimentar os efeitos benéficos da composição. Animais que recebem a composição farmacêutica podem ser humanos ou outros mamíferos.

a. Vacina

Num nono aspeto, a presente invenção é desenhada para uma composição produzida pelo método do oitavo aspeto da presente invenção. A composição pode ser uma vacina, que pode ser utilizada para depletar células T auto-reativas em pacientes autoimunes.

7. Tratamento de uma doença autoimune

Num décimo aspeto, uma doença autoimune pode ser tratada em pacientes com células T auto-reativas administrando uma composição de acordo com o nono aspeto da presente invenção. A composição pode ser uma vacina, que pode conduzir à depleção de células T auto-reativas no paciente.

Uma vacina pode compreender células T auto-reativas compreendendo padrões homogêneos ("monoclonal") ou heterogêneos ("policlonal") de utilização de genes V β -D β -J β . Estudos clínicos indicam que pacientes autoimunes que recebem vacinação com células T monoclonais autólogas podem mostrar um declínio gradual na imunidade contra células T reativas a mielina. Nalguns casos, as células T auto-reativas que reaparecem podem-se originar de diferentes populações clonais, o que sugere que as células T reativas a mielina podem sofrer mudança clonal ou dispersão de epítipo potencialmente associado com o processo de doença em curso. Mudança clonal ou dispersão de epítipo pode ser um problema em doenças autoimunes mediadas por células T auto-reativas. Uma vacina que compreende células T auto-reativas policlonais capazes de depletar múltiplas populações de células T auto-reativas pode evitar problemas

com mudança clonal ou dispersão de epítopo.

A composição pode ser uma composição farmacêutica, que é administrada por quaisquer meios que atingem o seu fim pretendido. Por exemplo, a administração pode ser pelas vias parentérica, subcutânea, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, transmucosal, intracerebral, intratecal ou intraventricular. Em alternativa, ou concorrentemente, a administração pode ser pela via oral. As composições farmacêuticas podem ser administradas por via parentérica por injeção bólus ou por perfusão gradual ao longo do tempo.

A dosagem administrada pode ser dependente da idade, sexo, estado de saúde e peso do recetor, tipo de tratamento concorrente, se algum, frequência do tratamento e da natureza do efeito desejado. Os intervalos da dose para a administração das composições farmacêuticas podem ser grandes o suficiente para produzir o efeito desejado, pelo que, por exemplo, células T auto-reativas são depletadas, conforme medido pelo sétimo aspeto, é atingido e a doença autoimune é significativamente prevenido, suprimido ou tratado. As doses podem não ser tão grandes para causar efeitos secundários adversos, tais como reações cruzadas indesejadas, imunossupressão generalizada, reações anafiláticas e afins.

As composições farmacêuticas podem compreender adicionalmente veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados compreendendo excipientes e auxiliares que podem facilitar o processamento das composições ativas em preparações que podem ser utilizadas farmacêuticamente. Aditivos para as composições farmacêuticas podem incluir a inclusão de um adjuvante, tal como alume, quitosano ou outros adjuvantes conhecidos na arte. (Ver, por exemplo, Warren et al., Ann. Rev. Immunol. 4:369-388 (1986); Chedid, L., Feder. Proc. 45:2531-2560 (1986). As composições

farmacêuticas também podem ainda compreender lipossomas para potencializar a entrega ou bioatividade utilizando métodos e compostos conhecidos na arte.

Formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções aquosas das células T auto-reativas desativadas, por exemplo, sais solúveis em água em solução aquosa. Além disso, podem ser administradas suspensões oleosas compreendendo células T auto-reativas desativadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos, por exemplo, óleo de sésamo ou ésteres de ácidos gordos sintéticos, por exemplo, oleato de etilo ou triglicerídeos. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluem, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão também pode conter estabilizadores.

As células T auto-reativas desativadas podem ser formuladas utilizando veículos parentéricos farmacêuticamente aceitáveis convencionais para administração por injeção. Estes veículos podem ser não tóxicos e terapêuticos e um número de formulações são apresentadas em Pharmaceutical Sciences de Remington, (supra). Exemplos não limitantes de excipientes são água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e solução de sal equilibrada de Hank. Composições farmacêuticas também podem conter pequenas quantidades de aditivos, tais como substâncias que mantêm a isotonicidade, pH fisiológico e estabilidade.

As células T auto-reativas desativadas podem ser formuladas a concentrações de células totais incluindo de cerca de 5×10^2 células/ml a cerca de 1×10^9 células/ml. Doses preferidas das células T auto-reativas desativadas para utilização na prevenção, supressão ou tratamento de uma doença autoimune pode estar no intervalo de cerca de 2×10^6 células a cerca de 9×10^7 células.

8. Determinação do repertório de TCR

Num décimo primeiro aspeto, um método de determinar o repertório de ácidos nucleicos que codificam um ou mais recetores de células T, ou uma porção dos mesmos, num paciente autoimune amplificando ácidos nucleicos que codificam um ou mais recetores de células T de células T isoladas pelos primeiro ou terceiro aspetos., em que dita amplificação é realizada utilizando um par de iniciadores. O primeiro iniciador do par de iniciadores pode ser um oligonucleotídeo de cerca de 15 a 30 nucleotídeos de comprimento que hibridiza com um ácido nucleico que compreende a região variável do gene TCR. O segundo iniciador do par de iniciadores pode ser um oligonucleotídeo de cerca de 15 a 30 nucleotídeos de comprimento que hibridiza com um ácido nucleico que compreende a região constante do gene TCR. O par de iniciadores pode ser utilizado para amplificar um ácido nucleico que hibridiza com a região V β -D β -J β do gene TCR.

Ácidos nucleicos que codificam um ou mais recetores de células T de células T (a "Sequência Alvo") ou um fragmento dos mesmos podem ser amplificados a partir de uma amostra pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando qualquer técnicas de PCR particular ou equipamento conhecido na arte. Por exemplo, a amplificação por PCR pode seguir um procedimento em que a mistura de reação é preparada que contém os seguintes ingredientes: 5 μ L 10xPCR tampão II (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 3 μ L 25 mM MgCl₂, 1 μ L 10 mM dNTP mix, 0,3 μ L Taq polimerase (5 U/ μ L) (AmpliTaq Gold, Perkin Elmer, Norwalk, Conn.), 30 pmol de um primeiro iniciador, 30 pmol de um segundo iniciador e 1 μ L de amostra de ADN. A polimerase pode ser estável a temperaturas de pelo menos 95°C, tem uma processividade de 50-60 e tem uma taxa de extensão superior a 50 nucleotídeos por minuto.

A reação PCR pode ser realizada com um perfil de

amplificação de 1 min a 95°C (desnaturação), 20 seg a 56°C (emparelhamento) e 40 seg a 72°C (extensão) durante um total de 40 ciclos. Antes do primeiro ciclo começar, a mistura da reação pode sofrer uma desnaturação inicial durante um período de cerca de 5 min a 15 min. Da mesma forma, depois da conclusão do ciclo final, a mistura da reação pode sofrer uma extensão final durante um período de cerca de 5 min a 10 min. Certas reações de PCR podem funcionar com tão poucos ciclos quantos 15 a 20 ciclos ou tantos quantos 50 ciclos. Dependendo da reação de PCR específica, podem ser utilizados tempos de incubação mais longos ou mais curtos e temperaturas mais altas ou mais baixas para cada etapa do perfil de amplificação.

A amostra que compreende a Sequência Alvo pode ser um ácido nucleico, tal como ADN genómico, ADNc, ADN previamente amplificado por PCR ou qualquer outra forma de ADN. A amostra pode ser isolada, diretamente ou indiretamente, a partir de qualquer tecido animal ou humano que compreende células T, tal como células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O ADN genómico pode ser isolado diretamente a partir de um tecido que compreende células T. O ADNc pode ser isolado indiretamente por transcrição reversa de ARNm diretamente isolado de um tecido que compreende células T.

A capacidade para detetar a Sequência Alvo pode ser potenciada isolando a amostra de ADN indiretamente por amplificação de ADN genómico, ADNc ou qualquer outra forma de ADN, por uma reação de PCR em duas etapas. Por exemplo, pode ser realizada uma primeira reação de amplificação por PCR para amplificar um fragmento preliminar que é maior do que, e compreende, um fragmento ao qual os primeiro e segundo iniciadores são capazes de se ligarem seletivamente em cadeias opostas. Uma segunda reação de amplificação por PCR pode depois ser realizada utilizando o fragmento preliminar como um molde com os primeiro e segundo

iniciadores, para amplificar um fragmento que compreende a Sequência Alvo. Se algum dos primeiro e segundo iniciadores é utilizado na primeira reação de PCR para amplificar o fragmento preliminar, a segunda reação de PCR é "semi-anichada." Se nenhum dos primeiro e segundo iniciadores é utilizado na primeira reação de PCR para amplificar o fragmento preliminar, a segunda reação de PCR é "anichada."

Numa reação de PCR em duas etapas exemplar, um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou mais recetores de células T de células T podem ser amplificados realizando uma primeira reação de PCR utilizando um primeiro iniciador preliminar que emparelha com a região V β do gene TCR e um segundo iniciador preliminar que emparelha com a região gene C β do gene TCR que amplifica um fragmento preliminar que estende de V β pela junção V β -D β -J β até C β , seguida por uma segunda reação de PCR que pode ser anichada ou semi-anichada. À luz da presente revelação, o artesão habilitado será capaz de selecionar iniciadores e condições de reação apropriados para amplificação por PCR da Sequência Alvo.

Após amplificação da Sequência Alvo, o produto amplificado pode ser detetado por um número de procedimentos. Por exemplo, uma aliquota do produto de amplificação pode ser carregada para um gel de eletroforese ao qual um campo elétrico é aplicado para separar as moléculas de ADN por tamanho. Noutro método, uma aliquota do produto de amplificação pode ser carregada para um gel corado com SYBR verde, brometo de etídio ou outra molécula que se ligará ao ADN e emitirá um sinal detetável. Um gel seco pode conter um oligonucleotídeo rotulado que hibridiza com a Sequência Alvo, a partir da qual pode ser tirada uma autoradiografia expondo o gel a filme.

Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar as formas de realização preferidas. Deve ser apreciado pelos peritos na especialidade que as técnicas divulgadas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas

pelo inventor como funcionando bem na prática da invenção, e podem, portanto, ser consideradas como constituindo modos preferidos para a sua prática.

EXEMPLO 1

Isolamento de células T reativas a mielina para vacinação com células T

1. Preparação de PBMC e a estimulação primária

Espécimes de sangue frescos de pacientes com MS e pacientes controlo foram processados dentro do intervalo de 2 horas após a colheita. Em alternativa, podem ser obtidas células mononucleares a partir do fluído cerebrospinal (CSFMCs) de pacientes com MS. Foram isoladas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) a partir do sangue inteiro pelo método de separação por gradiente de Ficoll convencional. Especificamente, o sangue heparinizado foi diluído com solução de sal equilibrada de Flanks (FIBSS) (1:1 sangue/FIBSS) e depois lentamente deitado sobre a solução Ficoll-hypaque num tubo de centrífuga e centrifugado durante 20 minutos a 1800 rpm, 18°C a 25°C, sem pausa. PBMCs foram depois lavados adicionando excesso de FIBSS e centrifugados a 1700 rpm durante 10 minutos a 18°C a 25°C. PBMCs purificados foram lavados três vezes em meio RPM11640 por centrifugação e ressuspensos subsequentemente em meio AIM V (Gibco, Grand Island, N.Y.). O número de células foi contado e as células foram colocadas em placas de cultura com fundo em U com 96 poços a uma densidade de 200,000 células/poço. Todas as placas foram rotuladas com número do paciente e iniciais do paciente. As células foram incubadas a 37°C na presença de péptidos sintéticos listados no Quadro 1 correspondendo às regiões imunodominantes conhecidas das três proteínas de mielina, proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) e glicoproteína oligodendrócito-mielina (MOG) a uma concentração de 20 µg/ml. As placas foram colocadas numa incubadora de CO₂ a 37°C e

inspeccionadas visualmente todos os dias. As células foram cultivadas durante 7-10 dias sem alteração do meio de cultura para crescerem seletivamente células T específicas de antígeno.

Quadro 1 - Péptidos ativadores		
Péptidos antígeno mielina	Sequências de aminoácidos	
proteína básica de mielina, péptido-1 (MBP-1)	ENPWHFFKNIVTPRTP	SEQ. ID N.º 1
proteína básica de mielina, péptido-2 (MBP-2)	SKIFKLGGDRSRSGSPMARR	SEQ. ID N.º 2
proteína proteolipídica, péptido-3 (PLP-3)	LFGGCGHEALTGTEKLIETY	SEQ. ID N.º 3
proteína proteolipídica, péptido-4 (PLP-4)	WTTCQSIAPFSKTSASIGSL	SEQ. ID N.º 4
glicoproteína oligodendrócito-mielina, péptido-6 (MOG-6)	GQFRVIGPRHPRALVG	SEQ. ID N.º 5
glicoproteína oligodendrócito-mielina, péptido-7 (MOG-7)	EVELPCRISPGKNATGMEVGW	SEQ. ID N.º 6

2. Identificação e seleção de células T específicas de antígeno

As células descritas anteriormente são depois selecionadas para a expressão de produtos génicos indicativos de células T ativadas. Ver Secção 2(a) anterior. Um Reagente Catch Citocina (Miltenyi Biotec) (conforme descrito anteriormente) é utilizado para detetar a citocina intracelular γ IFN ou TNF α quando basicamente excretado da célula. Em suma, o Reagente Catch Citocina (tipicamente um anticorpo bi-específico que se liga a ambos marcador de célula T ativada e citocina segregada) é incubado primeiro com as células a 4-8° C para se ligar à molécula CD45 nas superfícies celulares ou noutro marcador de superfície de célula T ativada, tal como CD69. As células com o Reagente Catch Citocina ligado são depois incubadas a 37° C durante 45 minutos para permitir o γ IFN ou TNF α dentro da célula de também se ligarem ao Reagente

Catch Citocina, à medida que a citocina é segregada de dentro da célula durante este período de incubação. γ IFN ou TNF α , agora ligados à superfície celular pelo Reagente Catch Citocina que é depois detetado utilizando um anticorpo específico para citocina de interesse conjugado com fluoróforo PE.

As moléculas de superfície celular CD4 e CD69, são detetadas utilizando anticorpos conjugados a diferentes fluoróforos. A população de células CD4⁺ é selecionada primeiro por portamento e depois, dentro desta população, as células coradas "duplo-positivas" (CD69 e γ IFN ou CD69 e TNF α) são separadas por FACS e recolhidas aseticamente.

As células T reativas a mielina isoladas são depois expandidas diretamente estimulando com rIL-2, PFIA, anti-CD3 ou outros mitogénios das células T gerais na presença de PBMCs autólogos irradiados durante 7-10 dias. Linhas de células T reativas a mielina são propagadas em cultura até o número de células total atingir aproximadamente 20 milhões.

EXEMPLO 2

Diagnóstico de MS

Dois a 100 ml de sangue foram recolhidos do paciente e um ou mais péptidos sintéticos são adicionados diretamente ao sangue inteiro para preparar, ou estimular, os linfócitos T. Os péptidos correspondem às regiões imunodominantes conhecidas das três proteínas de mielina, proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) e glicoproteína oligodendrócito-mielina (MOG). O sangue é incubado com os péptidos durante 1 a 7 dias para ativar as células T específicas de mielina. No final deste período de preparação de antigénio, as células são re-desafiadas com antigénios num curto ensaio de reestimulação.

Células T ativadas por péptido de mielina são detetadas permeabilizando a membrana celular com uma

solução detergente, lavando as células, depois incubando com um ou mais anticorpos corantes para detectar moléculas CD4 ou CD69 na superfície celular ou γ IFN ou TNF α intracelularmente. Os anticorpos corantes são conjugados a diferentes fluoróforos para que fluoresçam a diferentes comprimentos de onda quando excitados por um laser nanómetro 488 por análise FASC. A população de células CD4⁺ T é selecionada primeiro utilizando as células CD4⁺ para portamento e depois dentro desta população, as células que são imunorreativas com ambos anticorpos (CD69 e γ IFN ou CD69 e TNF α) são identificadas. Tem-se demonstrado que esta população de células T reativas a mielina "duplo-positivas" aumenta significativamente em pacientes com esclerose múltipla (MS) quando comparado com controlos saudáveis num estudo semelhante (Figura 1, paciente com MS, Figura 2, controlo saudável). Utilizando este método, o número de células T reativas a mielina que circulam no sangue de um paciente pode ser determinando antes, durante e depois do tratamento para determinar o efeito de uma terapêutica MS na população de células T auto-reativas. O ponto final pode ser determinado ou como a percentagem de células coradas duplo-positivas ou como o número absoluto de células coradas duplo-positivas.

EXEMPLO 3

Diagnóstico de MS utilizando lipossomas conjugados com anticorpo

É obtido sangue inteiro de um paciente e estimulado com um ou mais péptidos sintéticos, conforme descrito no Exemplo 2. O sangue é incubado com os péptidos durante 3 a 16 horas para ativar células T específicas de mielina. No final deste período de preparação do antigénio, as células podem ser re-desafiadas com antigénios num curto ensaio de reestimulação antes de corar com lipossomas magnetofluorescentes conjugados com anticorpos contra IFN γ , TNF α ou uma combinação dos mesmos. As células também são

coradas com um anticorpo para CD4 e/ou CD69. As células T reativas a mielina coradas são detetadas conforme descrito no Exemplo 2.

EXEMPLO 4

Determinação do repertório clonal de TCR

O repertório clonal do recetor de células T (TCR) representado numa população de células pode ser analisado isolando a população de células coradas duplo-positivas por classificação celular, conforme descrito nos Exemplo 2 e Exemplo 3. O ADN é extraído das células isoladas e utilizado para realizar ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativos (PCR) utilizando iniciadores oligonucleotídeos específicos para 25 famílias de gene da cadeia beta ($V\beta$) variável de TCR conhecidas. Este procedimento produz informação sobre a distribuição da utilização de gene TCR $V\beta$ e indica a clonalidade das populações de células T patogénicas. Este método também pode ser utilizado para determinar se está a ocorrer mudança clonal ou epitópica da população de células T reativas a mielina num paciente com MS.

EXEMPLO 5

A depleção de células T reativas a mielina por vacinação com células T

Pacientes com (RR)-MS reincidente-remitente e (SP)-MS progressiva secundária receberam três injeções subcutâneas de clones de células T reativas a mielina autólogas irradiadas isolados por expansão direta, com três injeções adicionais 4, 12 e 20 semanas depois. Os pacientes foram monitorizados em relação a alterações na frequência precursora de células T reativas a mielina, taxa de reincidência, classificação do estado de incapacidade expandida (EDSS) e atividades de lesão MRI durante um período de 24 meses. Os resultados foram comparados com valores pré-vacinação de uma maneira auto-emparelhada. Além disso, os dados clínicos dos braços com placebo de RR-MS no

ensaio clínico beta-interferão-1a (Jacobs et al., 1996) e SP-MS num estudo beta-IFN-1b recente (Grupo de Estudo Europeu, Lancet, 352:1491-1497 (1998)) foram incluídos para providenciar dados de história natural de MS para comparação. A frequência das células T ou não foi detetada ou declinou substancialmente após vacinação à semana 20. Os resultados confirmaram depleção de células T reativas a mielina por vacinação com células T em pacientes com MS.

EXEMPLO 6

Vacinação de paciente com MS utilizando células T reativas a mielina autólogas

O protocolo de vacinação é semelhante ao utilizado em estudos clínicos prévios (Zhang et al., 1993, Medaer et al., 1995). Em suma, clones de células T reativas a mielina preparados de acordo com o Exemplo 1 são ativadas com fitohemaglutinina (PHA) (4 µg/ml) na presença de PBMCs irradiados como uma fonte de células acessórias. As células são depois cultivadas durante 10 dias em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro AB humana desativado por calor e 100 unidades por mL de rIL-2. Células T reativas a mielina ativadas são subsequentemente lavadas três vezes com solução salina estéril para remover PHA residual, rIL-2 e resíduos das células e finalmente ressuspensas em 2 ml de solução salina. Após irradiação (10,000 rads, ¹³⁷Ce fonte), as células são injetadas subcutaneamente em dois braços (1 ml/braço). O número de células T utilizadas para vacinação oscila entre 40 x 10⁶ a 80 x 10⁶ células por injeção e são escolhidas por uma extrapolação de doses de células T eficazes em animais experimentais com base nas áreas de superfície de pele relativas (Ben-Nun et al., 1981). Cada paciente recebe duas injeções subcutâneas seguidas de injeções repetidas às semanas 4, 12 e 20.

Os pacientes são depois observadas em relação ao início do despoletar da progressão confirmada da incapacidade, EDSS, taxa de reincidência e atividades de

lesão MRI. Os resultados são comparados com o curso pré-tratamento do próprio paciente, bem como com os braços com placebo de dois ensaios clínicos recentes em pacientes RR-MS e SP-MS que servem como uma estimativa da história natural de MS (Jacobs et al., 1996), Grupo de Estudo Europeu, 1998). O tempo para progressão é determinado por um aumento de pelo menos 1,0 no EDSS (Poser et al., 1983) persistindo por pelo menos 2 meses. Exageros no estudo são definidos pelo aparecimento de novos sintomas neurológicos ou pioria de sintomas neurológicos pré-existentes que duram por pelo menos 48 horas, acompanhados pela mudança objetiva no exame neurológico (pioria de pelo menos 0,5 pontos no EDSS). Os pacientes são instruídos para reportarem eventos entre as visitas regulares agendadas e são examinados por um neurologista se os sintomas sugerem uma exacerbação. Avaliações de segurança incluíram eventos adversos, sinais vitais e exams físicos durante as visitas periódicas. As diferenças nas variáveis clínicas nos pacientes do estudo antes e depois da vacinação com células T são analisadas utilizando o teste de soma de rangos de Wilcoxon.

EXEMPLO 7

Alteração do curso clínico de MS após vacinação

Os pacientes receberam vacinações com células T preparadas de acordo com o Exemplo 1 sem efeitos adversos. Os declínios médios de EDSS em pacientes com RR-MS por um período de 24 meses após vacinação. Por comparação, existe um aumento do EDSS médio em 0,61 na história natural de RR-MS (n=56) ao longo do mesmo período de observação, como foi reportado num ensaio conduzido utilizando ensaio beta-IFN-1a (Jacobs et al., 1996). Além disso, a proporção dos pacientes que permaneceram com EDSS inalterado ou melhorado é superior do que a dos da história natural de MS. Poucos, se alguns, pacientes no grupo RR-MS tratado progride para além um EDSS de 2,0 em 24 meses quando comparado com 18% de pacientes na história natural de MS.

Na coorte SP-MS, EDSS médio prograda mais lentamente ao longo de um período de 24 meses quando comparado com +0,6 registado na história natural de SP-MS (Grupo de Estudo Europeu, Lancet 1998; 352:1491-1497). Além disso, a estimativa do tempo até à progressão confirmada utilizando o método de Kaplan-Meier mostra atraso considerável quando comparado com a história natural de pacientes com MS (20% progressão em 12 meses para RR-MS e 9 meses para SP-MS) (Jacobs et al., Ann. Neurol, 1996; 39:285-294, Grupo de Estudo Europeu, 1998).

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Baylor College of Medicine

<110> Opexa Pharmaceuticals Inc.

<120> Isolamento e Identificação de células T

<130> SMW/FP6723688

<140> EP

<141> 06-08-2003

<150> EP 03784936.1

<151> 06-08-2003

<150> PCT/US2003/024548

<151> 06-08-2003

<150> US 60/402.521

<151> 08-08-2002

<160> 6

<170> PatentIn versão 3.1

EP2363710B1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(17)

<223> aminoácidos 110 a 126 de proteína básica de mielina humana

<400> 1

Glu	Asn	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro	Arg	Thr
1				5					10					15	

Pro

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

<223> aminoácidos 167 a 186 de proteína básica de mielina humana

<400> 2

Ser	Lys	Ile	Phe	Lys	Leu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Pro
1				5					10					15	

Met	Ala	Arg	Arg
			20

EP2363710B1

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

<223> aminoácidos 31 a 50 de proteína proteolipídica de
mielina humana

<400> 3

Leu	Phe	Cys	Gly	Cys	Gly	His	Glu	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Glu	Lys	Leu
1				5					10					15	

Ile	Glu	Thr	Tyr
			20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

<223> aminoácidos 181 a 200 de proteína proteolipídica de
mielina humana

<400> 4

Trp	Thr	Thr	Cys	Gln	Ser	Ile	Ala	Phe	Pro	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Ser
1				5					10					15	

Ile	Gly	Ser	Leu
			20

EP2363710B1

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(17)

<223> aminoácidos 1 a 17 de glicoproteína oligodendrócito-mielina humana

<400> 5

Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Ile	Gly	Pro	Arg	His	Pro	Ile	Arg	Ala	Leu	Val
1				5					10					15	

Gly

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

<223> aminoácidos 18 a 38 de glicoproteína oligodendrócito-mielina humana

<400> 6

Glu	Val	Glu	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	

Met	Glu	Val	Gly	Trp
			20	

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4683202 A, Mullis [0036]
- EP 03784936 A [0099]
- US 2003024548 W [0099]
- US 60402521 B [0099]

Documentos de não patente citados na descrição

- BEN-NUN et al. *Nature*, 1981, vol. 292, 60-61 [0014]
- LIDER et al. *Science*, 1988, vol. 239, 820-822 [0014]
- LOHSE et al. *Science*, 1989, vol. 244, 820-822 [0014]
- ZHANG et al. *Science*, 1993, vol. 261, 1451-1454 [0016]
- MEDAER et al. *Lancet*, 1995, vol. 346, 807-808 [0016]
- ZHANG et al. *J Neurol.*, 2002, vol. 249, 212-8 [0017]
- VANDEVYVER et al. *Eur. J. Immunol*, 1995, vol. 25, 958-968 [0018]
- WUCHERPFENNIG et al. *J. Immunol*, 1994, vol. 152, 5581-5592 [0018]
- HONG et al. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, 3530-3538 [0018]
- *J. NEUROIMMUNOLOGY*, 01 July 1998, vol. 87 (1-2), 94-104 [0021]
- *J. NEUROSCIENCE RESEARCH*, 15 August 1996, vol. 45 (4), 500-511 [0021]
- *J. MOLECULAR MEDICINE*, 1996, vol. 74 (11), 653-662 [0021]
- *SCIENCE*, 10 September 1993, vol. 261 (5127), 1451-1454 [0021]
- SCHEFFOLD et al. *Nature Med*, 2000, vol. 6, 107-110 [0056]
- MANZ et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92,

1921-1925 [0057]

- **ASSEMNER et al.** *Eur J. Immunol*, 1996, vol. 26, 263-267 [0058]
- Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc-Graw-Hill, 1987 [0068]
- **WARREN et al.** *Ann. Rev. Immunol.*, 1986, vol. 4, 369-388 [0074]
- **CHEDID, L.** *Feder. Proc.*, 1986, vol. 45, 2531-2560 [0074]
- European Study Group. *Lancet*, 1998, vol. 352, 1491-1497 [0094] [0098]
- **JACOBS et al.** *Ann. Neurol*, 1996, vol. 39, 285-294 [0098]
- *European Study Group*, 1998 [0098]

Lisboa, 19 de Agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Uma vacina de células T autóloga compreendendo células T inativadas que são específicas para as SEQ ID NOS: 1-6.
2. A vacina da reivindicação 1, em que a vacina consiste em células T que são específicas para as SEQ ID NOS: 1-6.
3. Um método de fabrico da vacina da reivindicação 1 para o tratamento de esclerose múltipla, que compreende:
 - (a) incubar uma amostra que compreende células T isoladas a partir de um paciente a ser tratado com a vacina na presença de antígenos associados a esclerose múltipla ou derivados da mesma; em que os derivados retêm a capacidade para induzir uma resposta imunitária aos antígenos associados à esclerose múltipla; e
 - (b) inactivar as células de (a),em que os vários antígenos associados esclerose compreendem SEQ ID NOS: 1-6.
4. O método da reivindicação 3, em que uma ou mais células T de (b) são selecionadas a partir das células de (a) e em que as células T de (b) expressam um ou mais primeiros marcadores selecionados a partir do grupo que consiste em CD69, CD4, CD8, CD25 e HLADR e um ou mais segundos marcadores selecionados a partir do grupo que consiste em IL-2, γ IFN, TNF α , IL-5, IL-10 e IL-13.
5. O método da reivindicação 3, em que os vários antígenos associados à esclerose múltipla consistem nas SEQ ID NOS: 1-6.
6. O método da reivindicação 3, em que a amostra compreende células T do sangue periférico.

7. O método da reivindicação 3, em que a amostra compreende células T do fluido cerebrospinal.

8. O método da reivindicação 3, em que a inativação das células em (b) é por irradiação ou tratamento químico.

9. A vacina de qualquer uma das reivindicações 1 a 2, para utilização num método de tratamento de um paciente com esclerose múltipla.

10. Utilização da vacina de qualquer uma das reivindicações 1 a 2, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de esclerose múltipla.

Lisboa, 19 de Agosto de 2015

FIGURA 1

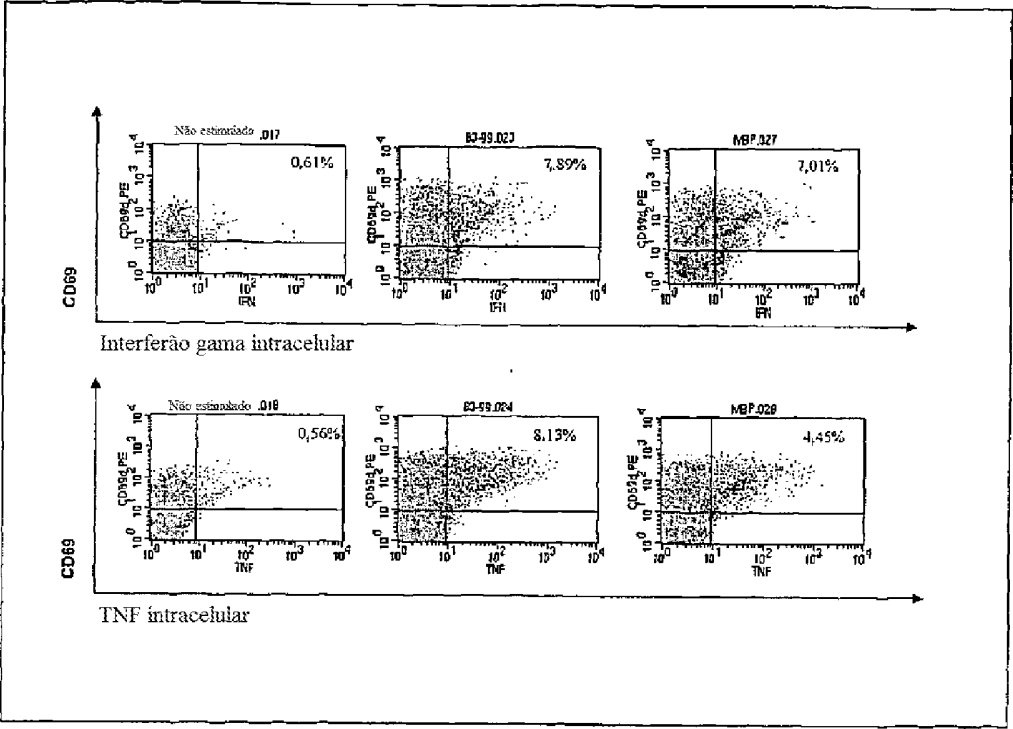


FIGURA 2

