

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

(22) Data de pedido: 2005.07.01	(73) Titular(es): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) 101, RUE DE TOLBIAC 75013 PARIS	FR
(30) Prioridade(s):	TXCELL S.A.	FR
(43) Data de publicação do pedido: 2007.01.03		
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.22 182/2011	(72) Inventor(es): HERVÉ GROUX FRANCOISE COTTREZ ARNAUD FOUSSAT VALÉRIE BRUN	FR FR FR FR
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **OBTENÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS PARA UM AUTO-ANTIGÉNIO OU ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS A PARTIR DE UMA POPULAÇÃO DE PBMC OU DE LEUCÓCITO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO IN VITRO PARA A OBTENÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS PARA UM AUTO-ANTIGÉNIO OU UM ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS A PARTIR DE UMA POPULAÇÃO PBMC OU DE LEUCÓCITOS, QUE COMPREENDE A ESTIMULAÇÃO DA POPULAÇÃO PBMC OU DE LEUCÓCITOS COM O AUTOANTIGÉNIO OU O ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS, E A RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS PARA UM AUTO-ANTIGÉNIO OU UM ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS A PARTIR DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS ESTIMULADAS. PREFERENTEMENTE A POPULAÇÃO DE PBMC OU DE LEUCÓCITOS É REESTIMULADA PELO MENOS UMA VEZ COM O MESMO ANTIGÉNIO APÓS O PASSO (1), NA PRESENÇA DE IL-2 E PELO MENOS UMA INTERLEUCINA ESCOLHIDA DO GRUPO QUE CONSISTE EM IL-4 E IL-13. O MÉTODO IN VITRO PODE AINDA COMPREENDER UM TERCEIRO PASSO DE EXPANSÃO DA POPULAÇÃO RECUPERADA DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS PARA O ANTIGÉNIO, COM VANTAGEM ATRAVÉS DO SEU CONTACTO COM CÉLULAS DE MATRIZ CELULAR CAPAZES DE EXPRESSAR FACTORES NECESSÁRIOS PARA A REFERIDA EXPANSÃO. PREFERENTEMENTE, AS CÉLULAS DE MATRIZ CELULAR SÃO CÉLULAS DE MATRIZ CELULAR DE INSECTO RECOMBINANTES.

RESUMO**"OBTENÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS PARA UM AUTO-ANTIGÉNIO
OU ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS A PARTIR DE UMA POPULAÇÃO DE PBMC
OU DE LEUCÓCITOS"**

A invenção refere-se a um método *in vitro* para a obtenção de uma população de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou um antigénio de alimentos a partir de uma população PBMC ou de leucócitos, que compreende a estimulação da população PBMC ou de leucócitos com o auto-antigénio ou o antigénio de alimentos, e a recuperação da população de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou um antigénio de alimentos a partir da população de células estimuladas. Preferentemente a população de PBMC ou de leucócitos é reestimulada pelo menos uma vez com o mesmo antigénio após o passo (1), na presença de IL-2 e pelo menos uma interleucina escolhida do grupo que consiste em IL-4 e IL-13. O método *in vitro* pode ainda compreender um terceiro passo de expansão da população recuperada de células Tr1 específicas para o antigénio, com vantagem através do seu contacto com células de matriz celular capazes de expressar factores necessários para a referida expansão. Preferentemente, as células de matriz celular são células de matriz celular de insecto recombinantes.

DESCRIÇÃO**"OBTENÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS PARA UM AUTO-ANTIGÉNIO
OU ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS A PARTIR DE UMA POPULAÇÃO DE PBMC
OU DE LEUCÓCITOS"**

A invenção refere-se a um método *in vitro* para a obtenção de uma população de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou um antigénio de alimentos a partir de uma população PBMC ou de leucócitos, que compreende a estimulação da população PBMC ou de leucócitos com o auto-antigénio ou o antigénio de alimentos, e a recuperação da população de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou um antigénio de alimentos a partir da população de células estimuladas. Preferentemente a população de PBMC ou de leucócitos é reestimulada pelo menos uma vez com o mesmo antigénio após o passo (1), na presença de IL-2 e pelo menos uma interleucina escolhida do grupo que consiste em IL-4 e IL-13. O método *in vitro* pode ainda compreender um terceiro passo de expansão da população recuperada de células Tr1 específicas para o antigénio, com vantagem através do seu contacto com células de matriz celular capazes de expressar factores necessários para a referida expansão. Preferentemente, as células de matriz celular são células de matriz celular de insecto recombinantes.

Entre as populações de células T, acumulam-se

agora evidências para uma nova subpopulação de células T com uma funcionalidade distinta, denominada células reguladoras Tr1 ou células Tr1. Os inventores mostraram que as células T reguladoras 1 (Tr1) poderiam ser utilizadas para tratar doenças inflamatórias (ou seja, doenças de Crohn (H. Groux et al. Nature 1997, 389, 737-742), inflamação da pele (Foussat et al. 2003 J. Immunol. 171, 5018-5026), aterosclerose (Mallat et al. Circulation 2003, 108, 1232-1237) ou esclerose múltipla (Barrat et al. 2002, 195, 603-616). Em todos estes modelos, mostrou-se que as células Tr1 anti-inflamatórias eram direccionadas de um antigénio específico e que a administração daquele anti-génio, preferencialmente no local da inflamação, foi necessária para estimular as células Tr1 para induzir as suas funções anti-inflamatórias. Deste modo, de modo a usar células Tr1 para tratar doenças humanas é necessário conseguir o isolamento de células Tr1 específicas para um anti-génio. No entanto, verifica-se que isto é muito difícil.

O pedido de patente internacional WO 02/090357 ensina a preparação de células Tr1 através da estimulação de células T CD4⁺ com células L de ratinho transfectadas com HLA-II DR1 e CD58 (LFA3), seleccionando células CD4⁺ CD25⁺ e expandindo os clones na presença de IL-2 e IL-4.

Os inventores também mostraram que as células Tr1 expressam marcadores de superfície específicos e poderiam ser caracterizadas pela co-expressão dos marcadores CD3 e CD4 assim como a expressão de CD49b e um elevado nível de

expressão de CD18, e, quando apropriado, pela demonstração de uma sobre-expressão de genes que codificam para as proteínas CD4, PSGL-1, PECCAM-1 e alfaV/beta3 (ver o pedido de patente internacional publicado com o número WO 2005/000344).

Surpreendentemente, os inventores observaram que as células Tr1 purificadas isoladas de sangue humano com base na expressão destes marcadores (e consequentemente células Tr1 presentes numa população de PBMC ou de leucócitos) proliferavam vigorosamente na resposta a antígenos de alimentos ou auto-antígenos e a resposta proliferativa destas células conseguia ser mantida através do estímulo utilizando tanto IL-2 e IL-4 (IL refere-se a interleucina). Este potencial oferece uma vantagem importante relativamente à técnica anterior, uma vez que de acordo com o conhecimento comum de um perito na técnica, foi anteriormente necessário primeiramente isolar células T nativas específicas para um antígeno de uma população de PBMC, secundamente induzir a diferenciação de células Tr1 específicas para um antígeno, enquanto que é agora possível obter células Tr1 específicas para um auto-antígeno ou para um antígeno de alimentos directamente de uma população de PBMC (ou leucócitos). Na presente invenção, o método *in vitro* para obter uma população de células Tr1 específicas para um auto-antígeno ou um antígeno de alimentos é simplificado, e a segurança para os pacientes aos quais estas células são administradas é acrescida, uma

vez que estas células não se alteraram em termos de qualidade.

Consequentemente, o objecto da presente invenção é um método *in vitro* para a obtenção de uma população de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou um antigénio de alimentos a partir de uma população de leucócitos ou uma população de células sanguíneas mononucleares (PBMC), compreendendo o referido método:

- 1) estimular a população PBMC ou de leucócitos com o auto-antigénio ou o antigénio de alimentos,
- 2) recuperar a população de células Tr1 específicas para o auto-antigénio ou o antigénio de alimentos da população de células estimuladas,
- 3) expandir a população de células Tr1 específicas para o antigénio recuperadas no passo (2) num meio de cultura Mp,

em que o referido passo de expansão compreende:

a) cultivar a uma temperatura T1 num meio de cultura Mf, células de matriz celular capazes de expressar os factores do grupo (A) compreendendo

- um anticorpo anti-CD3 modificado, em que a modificação do anticorpo anti-CD3 consiste na substituição do domínio intracitoplasmático anti-CD3 da cadeia pesada anti-CD3 com um domínio transmembranar, sendo o referido anticorpo anti-CD3 ancorado à membrana celular das células da matriz celular e sendo susceptíveis de interagir com o complexo proteico CD3/TCR das células T, ou uma variante daqueles,

- as proteínas CD80 ou CD86, preferentemente a proteína CD80, ancorada à membrana celular das células de matriz celular, que é susceptível de interagir com a proteína CD28 das células T, ou uma sua variante, e
 - a proteína CD58 ancorada à membrana celular das células da matriz celular, que é susceptível de interagir com a proteína CD2 das células Tr1, ou uma sua variante,
 - IL-2 secretado pelas células da matriz celular, que é susceptível de interagir com o receptor IL-2 das células Tr1, ou uma sua variante, e
 - uma interleucina seleccionada de IL-4 ou interleucina 13 (IL-13), preferentemente IL-4, sendo a referida interleucina secretada pelas células da matriz celular e sendo susceptível de interagir com o receptor IL-4 das células Tr1, ou uma sua variante,
- permitindo tal T1 a proliferação das referidas células de matriz celular,
- b) contactar as células da matriz celular obtidas no passo (a) separadas ou não do seu meio de cultura Mf, com a população de células Tr1 específicas para o antigénio contidas no meio de cultura Mp, em que o referido meio de cultura Mp não contém inicialmente o referido grupo de factores compreendendo de modo a obter uma mistura contendo a população de células Tr1 específicas para o antigénio, células da matriz celular e o meio de cultura Mp,
- c) cultivar a mistura obtida no passo (b) contendo os factores do grupo que são expressos pelas células de matriz celular no meio de cultura Mp, em que o referido passo (c)

de cultivo é levado a cabo a uma temperatura T2 que é pelo menos cerca de 35°C, tal que:

- a população de células Tr1 específicas para o antígeno prolifera, e
 - as células da matriz celular não proliferam,
- e em que a população de células Tr1 específicas para o antígeno é expandida,
- d) recuperação da população de células Tr1 específicas para o antígeno expandida daquele modo.

Leucócitos abrangem vários tipos de células que se caracterizam pela sua importância, a sua distribuição, o seu número, a sua duração de vida e a sua potencialidade. Estes tipos são os seguintes: os leucócitos polinucleares ou granulares, entre os quais se contam os leucócitos eosinofílicos, neutrofílicos e basofílicos, e as células mononucleares, ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), que são grandes glóbulos brancos e consistem nos tipos de células do sistema imunitário (linfócitos e monócitos). Os leucócitos ou as PBMCs podem ser separadas do sangue periférico por qualquer método conhecido pelos peritos na técnica. Com vantagem, para a separação das PBMCs, pode-se utilizar centrifugação, preferentemente centrifugação com gradiente de densidade, preferentemente centrifugação com gradiente de densidade descontínuo. Uma alternativa é a utilização de anticorpos monoclonais específicos. Em certas realizações, as PBMC são tipicamente isoladas a partir de produto sanguíneo completo por intermédio de Ficoll-Hypaque, utilizando procedimentos

convencionais. Noutras realizações, as PBMCs são recuperadas por intermédio de leucaferese.

O termo "antigénio" na expressão "população de células Tr1 específicas para o antigénio" refere-se a um péptido imunogénico. Os péptidos imunogénicos são péptidos que se podem ligar a moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de um indivíduo e que são reconhecidas pelos receptores das células T do referido indivíduo.

Os termos proteína, polipéptido, péptido utilizados no presente pedido referem-se indiferentemente a uma molécula formada pela união de uma longa cadeia de elementos mais pequenos, os aminoácidos.

O termo "antigénio de alimentos" refere-se a um péptido imunogénico que vêm de alimentos, tais como antigénios de alimentos da seguinte lista não limitativa: antigénios bovinos tais como lipocalina, S100 de ligação a Ca, alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina, albumina de soro bovina, imunoglobulina ou caseínas. Antigénios de alimentos podem ser também antigénios do salmão atlântico, tais como a parvalbumina, antigénios de galinha tais como ovomucóie, ovalbumina, Ag22, conalbumina, lisozima ou albumina de soro de galinha, antigénios de camarão, tais como tropomiosina, antigénios do trigo tais como aglutinina ou ómega-5 gliadina, antigénios do aipo, tais como profilina do aipo, antigénios da cenoura tais como a

profilina da cenoura, antigénios da maçã, tais como taumatina, proteína de transferência de lípidos da maçã, profilina da maçã, antigénios da pera tais como profilina de pera, isoflavona redutase, antigénios do abacate, tais como a endoquitinase, antigénios do alperce, tais como a proteína de transferência de lípidos do alperce, antigénios do pêssigo, tais como proteína de transferência de lípidos do pêssigo ou a profilina do pêssigo, antigénios da soja, tais como HPS, profilina da soja ou (SAM22) PR-10 prot.

O termo "auto-antigénio" refere-se a um péptido imunogénico derivado de uma proteína do referido indivíduo. Pode ser, por via de exemplo, um auto-antigénio da seguinte lista não limitativa: receptor acetilcolina, actina, translocador nucleotídico da adenina, β -adrenoreceptor, descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, receptor asialoglicoproteína, proteína de aumento do efeito bactericida/permeabilidade (BPI), receptor sensível ao cálcio, enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol, cadeia α_1 do colagénio de tipo IV, citocromo P450 2D6, desmina, desmogleína-1, desmogleína-3, F-actina, GM-gangliósidos, glutamato descarboxilase, receptor glutamato, ATPase H/K, 17- α -hidroxilase, 21-hidroxilase, IA-2 (ICAS12), insulina, receptor da insulina, factor intrínseco do tipo 1, antigénio 1 associado à função leucocitária, glicoproteína associada à mielina, proteína básica da mielina, proteína oligodendrocítica da mielina, miosina, P80-colina, complexo E2 da piruvato desidrogenase (PDC-E2), simporte do iodeto de sódio, SOX-10, proteína partilhada da

tiróide e do músculo ocular, tiroglobulina, peroxidase da tiróide, receptor da tirotropina, transglutaminase tecidual, co-ativador da transcrição p75, triptofano hidroxilase, tirosinase, tirosina hidroxilase, ACTH, aminoacil-tARN-histidil sintetase, cardiolipina, anidrase carbónica II, proteínas associadas ao centrómero, ATPase estimulada pelo nucleossoma dependente do ADN, fibrilarina, fibronectina, glucose 6 fosfato isomerase, beta 2-glico-proteína I, golgina (95, 97, 160, 180), proteínas de choque térmico, proteína hemidesmosomal 180, histona H2A, H2B, queratina, receptor IgE, proteína cinase Ku-ADN, nucleo-proteína-Ku, fosfoproteína La, mieloperoxidase, proteinase 3, ARN polimerase I-III, proteína de reconhecimento de sinal, topoisomerase I, tubulina, vimenscina, proteína básica oligodendrocítica associada à mielina (MOBP), proteína proteolipídica, proteína específica oligodendrocítica (OSP/Claudina 11) 3'-fosfodiesterase de nucleótido cíclico (CNPase), antígeno BP 1 (BPAG!-e), transaldolase (TAL), auto-antígenos da mitocôndria humana PDC-E2 (Novo 1 e 2), OGDC-E2 (Novo 3), e BCOADC-E2 (Novo 4), penfigóide bolhoso (BO) 180, laminina 5 (LN5), proteína "DEAD-box" 48 (DDX48) ou antígeno-2 associado a insulinoma.

Antígenos tais como antígenos bacterianos ou virais são excluídos da expressão "auto-antígeno ou antígeno de alimentos".

O auto-antígeno ou antígeno de alimentos, que é principalmente composto por uma sequência de aminoácidos,

pode ser sintetizado pelas técnicas convencionais, tais como o método Fmoc, se a sequência de aminoácidos for conhecida, ou por tecnologias de ADN recombinante conhecidas (ver Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Alguns auto-antígenos ou antígenos de alimentos são também comercialmente disponíveis (Sigma, L'Isle d'Abeau, França). O auto-antígeno ou antígeno de alimentos pode também ser extraído.

Preferentemente, a população de células Tr1 específicas para o auto-antígeno ou antígeno de alimentos é obtido de uma população PBMC.

Mais preferentemente, a população de PBMC ou de leucócitos é reestimulada pelo menos uma vez com o mesmo antígeno após o passo (1), na presença de interleucina-2 (IL-2) e pelo menos uma interleucina seleccionada do grupo que consiste em interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13).

A frequência da estimulação do auto-antígeno ou antígeno de alimentos pode ser pelo menos uma vez, preferentemente uma vez por semana, ao longo de algumas semanas (geralmente cerca de três), ou várias vezes em intervalos de cinco a doze dias. Podem ser realizadas estimulações múltiplas através da permuta de uma porção do sobrenadante da cultura com a mesma quantidade de meio de cultura de PBMC ou leucócitos fresco contendo o antígeno.

As IL-2 e IL-4 utilizadas para reestimar a população de PBMC ou de leucócitos podem ser sintetizadas ou ser interleucinas recombinantes e o perito na técnica tem larga experiência nos métodos para a obtenção de tais interleucinas (ver por exemplo Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). IL-2 e IL-4 podem ser adquiridas de diferentes fontes, tais como R&D Systems e Peprotech.

Preferentemente, o auto-antigénio ou antigénio de alimentos é um antigénio recombinante ou sintetizado.

Mais preferentemente, o antigénio de alimentos é seleccionado de ovalbumina, caseína, proteína de soja, fragmentos, variantes ou misturas daqueles.

O termo "variante" do auto-antigénio ou antigénio de alimentos refere-se aqui a um antigénio que é quase idêntico ao antigénio natural e que partilha a mesma actividade biológica. A diferença mínima entre o antigénio natural e a sua variante pode consistir por exemplo numa substituição, deleção e/ou adição de aminoácido. Tais variantes podem conter por exemplo substituições conservativas de aminoácidos nas quais os resíduos de aminoácidos são substituídos por resíduos de aminoácidos com uma cadeia lateral similar. Foram identificadas na técnica famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais similares, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (por

exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais com ramificação beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

Mais preferentemente, o antigénio de alimentos é seleccionado da ovalbumina do ovo de galinha de sequência SEQ ID NO°23, caseína alfa S1 bovina de sequência SEQ ID N°24, beta-caseína bovina de sequência SEQ ID N°25, ou sequências com pelo menos 70%, preferentemente 75, 77, 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99 % de identidade com uma das sequências SEQ ID N°23, SEQ ID NO°24 e SEQ ID N°25.

Noutra realização preferida, o auto-antigénio é seleccionado de insulina, proteína básica da mielina, seus fragmentos, variantes ou misturas.

A expressão "estimular a população de PBMC ou leucócitos com o auto-antigénio ou antigénio de alimento" tal como aqui utilizado significa adicionar o antigénio à população de PBMC ou de leucócitos e proceder à cultura para reagir com as células T da referida população de PBMC ou de leucócitos. Para produzir uma população de células Tr1 específicas para o auto-antigénio ou antigénio de

alimentos, a população de PBMC ou de leucócitos é contactada com um antigénio de acordo com a presente invenção numa forma adequada para desencadear um sinal de activação primária nas células T da referida população de PBMC ou de leucócitos, ou seja o antigénio é apresentado à população de PBMC ou de leucócitos de tal modo que é desencadeado um sinal das células T através do complexo CD3/TCR. Por exemplo, o antigénio pode ser apresentado às PBMCs ou aos leucócitos numa forma solúvel (seja directamente para formar complexos com as moléculas MHC expressas pelas PBMCs ou pelos leucócitos ou o antigénio pode ser acoplado seja a uma forma solúvel, uma forma polimérica ou uma forma ligada a uma superfície (plástico, ...) das moléculas MHC) ou por uma célula apresentadora de antigénio (APC) em conjunto com uma molécula MHC. Uma célula apresentadora de antígenos (APC), tal como uma célula B, um macrófago, um monócito, uma célula dendrítica, uma célula de Langerhans, ou outra célula que apresente o antigénio às células T da referida população de PBMC ou de leucócitos, pode ser incubada com as PBMCs ou com os leucócitos na presença do antigénio (por exemplo um antigénio solúvel) de tal modo como as células apresentadoras de antígenos apresentam o antigénio às PBMCs ou aos leucócitos. Alternativamente, uma APCs podem ser pré-incubadas com o antigénio antes de serem adicionadas aos PBMCs ou leucócitos. Alternativamente, uma célula que expressa o auto-antigénio ou o antigénio de alimentos pode ser incubado com a população de PBMC ou de leucócitos. Preferentemente, o estímulo da população de

PBMC ou de leucócitos é levado a cabo nos poços de uma microplaca, um frasco de cultura celular ou um saco de cultura celular. Os meios de cultura de PBMCs ou de leucócitos que podem ser utilizados são muito bem conhecidos por um perito na técnica: por exemplo, as PBMCs ou os leucócitos podem ser estimulados num meio RPMI suplementado com soro humano ou com X-vivo 15 (Cambrex).

Com vantagem, a população de PBMC estimulada no passo (1) contém de $0,01 \times 10^6$ a 100×10^6 células/mL, preferentemente de $0,2 \times 10^6$ a 5×10^6 células/mL, mais preferentemente de $0,1 \times 10^6$ a 3×10^6 células/mL, ainda mais preferentemente de $0,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6$ células/mL, e preferivelmente de 10^6 a 2×10^6 células/mL.

Mais vantajosamente, o auto-antigénio ou antigénio de alimento utilizado para estimular a população de PBMC no passo (1) está numa forma solúvel de $0,1 \mu\text{g/mL}$ a 5 mg/mL , preferentemente de 1 a $200 \mu\text{g/mL}$.

No entanto, o perito na técnica sabe que a quantidades específica do auto-antigénio ou antigénio de alimento utilizado para estimular uma população de PBMC ou de leucócitos depende do auto-antigénio ou antigénio de alimento que é utilizado.

Noutra realização particular, a população de PBMC ou de leucócitos é incubada, antes da estimulação no passo (1), com um marcador fluorescente da divisão celular de

modo a determinar, por citofluorimetria, que quando a intensidade de fluorescência da população celular estimulada é pelo menos duas vezes inferior à intensidade de fluorescência da população de PBMC ou de leucócitos, a divisão celular ocorreu na referida população celular, e que a referida população celular que é recuperada no passo (2) é a população celular Tr1 específica para o antígeno. Tal método, que permite monitorizar a divisão celular utilizando marcadores de fluorescência, é bem conhecido pelo perito na técnica e é muito bem apropriado para utilização no passo (2) de recuperação da população de células Tr1 específicas para o antígeno, uma vez que a população celular estimulada cuja intensidade de fluorescência é pelo menos duas vezes inferior à intensidade de fluorescência da população de PBMC ou de leucócitos, compreende a população de células Tr1 específicas para ao auto-antígeno ou para o antígeno de alimento. Com vantagem, a população celular estimulada cuja intensidade de fluorescência é pelo menos duas vezes inferior à intensidade de fluorescência da população de PBMC ou de leucócitos é a população de células Tr1 específicas para ao auto-antígeno ou para o antígeno de alimento.

Preferentemente, o marcador de fluorescência da divisão celular é o marcador éster carboxifluoresceína diacetato de succinimidilo (CFSE), o marcador diacetato do ácido carboxílico verde oregon 488 (Carboxi-DFFDA SE) ou o marcador PKH26 (derivado do descobridor, Paul Karl, Horan,

PKH), estando todos, entre outros, comercialmente disponíveis através da Invitrogen.

O passo (2) da recuperação da população celular Tr1 específica para o auto-antigénio ou o antigénio contra alimentos, pode ser conduzido por vários métodos bem conhecidos por um perito na técnica. Por exemplo, as células Tr1 podem ser identificadas e/ou purificadas por Elisa, citometria de fluxo, cromatografia de imunoafinidade com anticorpos marcados dirigidos contra os referidos marcadores de células Tr1, por exemplo com:

anti-CD4 conjugado com APC (RPA-T4) - Becton Dickinson (APC para alofococianina)

anti-CD3 conjugado com PC5 (UCHT-1) - Catalag (PC5 para ficoeritrina-cianina 5)

anti-CD18 conjugado com PE (6.7) - Becton Dickinson (PE para ficoeritrina)

anti-CD49b conjugado com FITC (AK-7) - Becton Dickinson ou anti-CD49b humano de rato marcado com PE (12F1-H6) (FITC para fluoresceína-isotiocianato).

São agora bem conhecidos marcadores específicos para células Tr1 pelo perito na técnica, e são suficientemente descritos no pedido de patente internacional WO 2005/000344.

Assim, numa realização preferida, a população de células Tr1 específicas para o antigénio é recuperada no passo (2) por citofluorometria utilizando anticorpos com

marcação de fluorescência dirigidos contra proteínas presentes na superfície das células da referida população de células Tr1 específicas para o antígeno.

Também podem ser utilizados testes ELISA e coloração intracelular para medir a expressão de IL-4, IL-10 e IFN- γ e para identificar as células Tr1 através do seu perfil de expressão de citocinas. Tais métodos são geralmente utilizados pelo perito na técnica. Por exemplo, o sobrenadante obtido após o passo (1) da estimulação pode ser contactado com os anticorpos marcados com NIP dirigidos contra a expressão de IL-4, IL-10 e IFN- γ (NIP para acetil de (4-hidroxí-5-iodo-3-nitrofenilo) (NIP)), seguido do anticorpo anti-NIP marcado com peroxidase e adição de ABTS (ABTS para 2,2'-azino-de(3-etil-benzotiazolína-6-sulfonato) (da R&D Systems, Minneapolis, MN, e Chiron Corp. Emmerlyville, CA).

Preferentemente, a população de células Tr1 específicas para o antígeno é recuperada no passo (2) através de uma técnica de clonagem, tal como com vantagem por diluição limite. Tais métodos são bem conhecidos pelo perito na técnica e não serão mais apresentados na presente descrição.

Deve-se considerar que estes métodos de recuperação da população de células Tr1 específicas para o antígeno podem ser utilizados isoladamente ou em combinação. Por exemplo, o "método CFSE" pode ser utilizado

em combinação com a citofluorometria ou com técnicas de clonagem por diluição limite. Também é possível utilizar a citofluorometria seguida de uma técnica de clonagem.

A população de PBMC ou leucócitos é preferentemente uma população de mamíferos. Pode ser um mamífero humano assim como não humano (cão, gato, ratinho, rato, animais de interesse agrícola tais como gado e aves, etc...). Mais preferentemente, a população de PBMC ou de leucócitos é uma população humana.

O meio de cultura Mp pode ser de qualquer tipo, desde que seja apropriado para a referida população de células Tr1 específicas para o antigénio, e será facilmente seleccionado por um perito na técnica (meio de Schneider, meio sem soro,...).

No presente pedido, os termos "expansão", "proliferação", "crescimento" podem ser utilizados intermutavelmente e referem-se ao número crescente de células numa população celular. Preferentemente, a população de células Tr1 específicas para o antigénio é expandida exponencialmente.

Com vantagem, o passo (3) de expansão da população de células Tr1 específicas para o antigénio consiste no contacto da referida população de células com esferas CD3+CD28 (por exemplo adquiridas da Dynal, Oslo, Noruega) na presença de IL-2 e IL-4.

A razão [células da matriz celular : população de células Tr1 específicas para o antigénio] é indiferente quando se adicionam as células da matriz celular à população de células Tr1 específicas para o antigénio (passo (b)). Com vantagem, esta razão pode ser [1:1].

As células de matriz celular podem ser de qualquer tipo, desde que não proliferem à temperatura de cultura da população de células Tr1 específicas para o antigénio T_2 , que é pelo menos cerca de 35°C.

A expressão "pelo menos cerca de 35°C" significa que a temperatura pode variar de 0,1°C abaixo de 35°C (de 34,9°C a 35°C). O perito na técnica está de qualquer modo ciente de tais variações mínimas de temperatura.

O perito na técnica que tem vasta experiência em cultura celular, conhece condições específicas a serem usadas, em particular as temperaturas de cultura óptimas T_1 e T_2 de cada população de matriz celular e população de células Tr1 específicas para o antigénio. O meio de cultura Mf pode ser de qualquer tipo, desde que seja apropriado para o referido tipo de célula de matriz celular, e será facilmente seleccionado pelo perito na técnica (meio de Schneider, ...).

Deve ser considerado que o passo (b) colocando as células de matriz celular em contacto com a população de

células Tr1 específicas para o antígeno, e o passo (c) de cultura da mistura a uma temperatura T_2 , são em geral passos simultâneos: antes do contacto, as células de matriz celular e a população de células Tr1 específicas para o antígeno são cultivadas separadamente, respectivamente uma à temperatura T_1 no meio de cultura Mf e a outra à temperatura T_2 no meio de cultura Mp. Depois, as células de matriz celular "isoladamente" ou o meio de cultura Mf contendo as células de matriz celular são/é colocado em contacto com a população de células Tr1 específicas para o antígeno que está presente no seu meio de cultura Mp e que está a ser cultivada à temperatura T_2 . Consequentemente, as células de matriz celular passam imediatamente da temperatura T_1 para a temperatura T_2 e cessam a proliferação, ao invés da população de células Tr1 específicas para o antígeno, que é expandida graças ao grupo de factores que são expressos pelas células de matriz celular.

É possível manter durante um período de tempo prolongado o crescimento exponencial *in vitro* da população de células Tr1 específicas para o antígeno, tal como pelo menos dois ou três meses, através de se voltar a contactar as células de matriz celular regularmente, por exemplo, todas as semanas, com a referida população de células Tr1 específicas para o antígeno.

Mais vantajosamente, as células de matriz celular morrem durante o passo (c) devido à temperatura T_2 que já não é apropriada para a cultura de células de matriz

celular. Mais vantajosamente, os fragmentos da membrana celular das células de matriz celular que resultam da morte destas células são eliminados no passo (d).

Após um período suficiente de cultura da população de células Tr1 específicas para o antigénio no passo (c) tal como preferentemente várias horas, o meio de cultura Mp obtido é composto por uma mistura da população de células Tr1 específicas para o antigénio, células de matriz celular viáveis e opcionalmente fragmentos da membrana celular das células de matriz celular, e a população de células Tr1 específicas para o antigénio expandida tem de ser recuperada no passo (d). Tal recuperação pode ser realizada através da separação da população de células Tr1 específicas para o antigénio das células de matriz celular viáveis e opcionalmente dos referidos fragmentos da membrana celular utilizando qualquer método de separação apropriado bem conhecido pelo perito na técnica, tal como por exemplo citometria de fluxo utilizando um ligando marcado específico capaz de se ligar à superfície das células de matriz celular ou uma proteína de superfície celular da população de células Tr1 específicas para o antigénio. Podem também ser utilizados outros métodos, tais como métodos de lavagem e/ou centrifugação tais como centrifugação com gradiente de densidade utilizando meio de separação como Ficoll®, sendo tal centrifugação um meio apropriado para eliminar fragmentos da membrana celular.

Deve notar-se que a eliminação dos fragmentos da membrana celular das células de matriz celular não é obrigatória mas recomendada, especialmente quando se pretende administrar a população de células Tr1 específicas para o antigénio expandida a mamíferos. De outro modo, existe um risco que a referida população de células Tr1 específicas para o antigénio expandida esteja contaminada.

Com vantagem, o grupo de factores compreende factores ancorados à membrana celular das células de matriz celular e factores secretados pelas referidas células de matriz celular. Mais vantajosamente, os factores do referido grupo interagem com proteínas de superfície celular da população de células Tr1 específicas para o antigénio a ser expandida.

Quando as células de matriz celular são cultivadas no passo (a), expressam alguns factores do grupo na superfície da sua membrana celular e alguns outros factores no meio de cultura Mf. No passo (b) de contacto, os "factores de membrana" já estão ancorados à membrana das células de matriz celular, mas os "factores secretados" podem ser eliminados se as células de matriz celular são previamente removidos do seu meio de cultura Mf. De qualquer modo, ambos os "factores de membrana" e os "factores secretados" são expressos pelas células de matriz celular no passo (c), mesmo se as células de matriz celular já não proliferam, e até à morte das referidas células de matriz celular. É mesmo possível que os "factores de

membrana" ancorados aos fragmentos de membrana celular das células de matriz celular mortas ainda desempenhem um papel na produção da população de células Tr1 específicas para o antígeno.

A população de células Tr1 específicas para o antígeno que é expandida tem proteínas de superfície celular que estão implicadas nos sinais celulares que permitem a sua expansão. Tais proteínas de superfície celular são activadas graças a ligandos específicos, ou factores, que são proporcionados na presente invenção pelas células de matriz celular: as células de matriz celular expressam o grupo de factores que permitem a expansão da população de células Tr1 específicas para o antígeno. O perito na técnica conhece quais os factores específicos que têm de ser expressos pelas células de matriz celular de tal modo que estes factores interagem com uma proteína de superfície celular da população de células Tr1 específicas para o antígeno.

Ainda mais preferentemente, as células de matriz celular são células recombinantes e contêm ácidos nucleicos heterólogos que codificam para os factores do referido grupo.

As expressões "célula recombinante" ou "célula de matriz celular recombinante" referem-se à introdução nas referidas células de ácidos nucleicos heterólogos que codificam para os factores do grupo. Tal introdução engloba

uma variedade de técnicas úteis para a introdução de ácidos nucleicos em células de matriz celular incluindo electroporação, precipitação por fosfato de cálcio, tratamento com DEAE-dextrano, lipofecção, microinjecção e infecção com vectores virais. Tais métodos adequados são muito bem conhecidos pelo perito, e podem ser encontrados por exemplo em Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Os ácidos nucleicos a serem introduzidos podem ser, por exemplo, ADN englobando os genes que codificam para os factores susceptíveis de interagir com as proteínas de superfície celular da população de células Tr1 específicas para o antigénio a ser expandida, fragmentos de ADN genómico, cadeia de ARN no sentido directo ou vectores de expressão recombinantes contendo ADNc contendo tais genes. Os ácidos nucleicos heterólogos podem codificar para o comprimento total dos factores ou alternativamente podem codificar para seus fragmentos peptídicos que são suficientes para permitir a produção da população de células Tr1 específicas para o antigénio de acordo com a presente invenção, quando introduzidos nas células de matriz celular. Os ácidos nucleicos podem codificar para os ligandos naturais (proteínas co-estimuladores) das proteínas de superfície celular da população de células Tr1 específicas para o antigénio, ou seus fragmentos, ou formas modificadas dos ligandos ou de seus fragmentos. A invenção pretende incluir a utilização de fragmentos, mutantes, ou variantes (por exemplo, formas modificadas) dos factores que retêm a capacidade de aumentar a expansão da população

de células Tr1 específicas para o antígeno. Uma "variante" de um factor significa uma proteína que partilha uma homologia significativa com o ligando natural e que está implicada na expansão da população de células Tr1 específicas para o antígeno. Os termos biologicamente activa ou forma biologicamente activa de uma proteína incluem formas de factores que são capazes de resultar na expansão da população de células Tr1 específicas para o antígeno. Um perito na técnica pode seleccionar tais variantes de factores com base na sua capacidade de aumentar a expansão celular através da introdução de ácidos nucleicos que codificam para os factores nas células de matriz celular. A capacidade de uma variante ou factor específico em aumentar a expansão de uma população de células Tr1 específicas para o antígeno pode ser facilmente determinada, por exemplo, através da comparação das células de matriz celular recombinantes com as células de matriz celular não recombinantes através de qualquer teste ou método conhecido. Além disso, será apreciado pelos peritos na técnica que alterações na sequência primária de aminoácidos dos factores irão provavelmente ser toleradas sem diminuir de forma significativa a capacidade das proteínas em permitir a expansão da população de células Tr1 específicas para o antígeno. Deste modo, variantes dos factores que têm substituições, deleções e/ou adições de aminoácidos em comparação com as sequências de aminoácidos que ocorrem naturalmente de factores nativos comparáveis, que ainda retenham a actividade funcional das formas naturais dos factores tais como aqui descritos são também

abrangidos pela invenção. Tais variantes podem conter por exemplo substituições de aminoácidos conservativas (ver acima).

Os ácidos nucleicos estão numa forma adequada para a expressão de factores contendo a referida forma a totalidade das sequências codificantes e de regulação necessárias para a transcrição e a tradução de um gene, que pode incluir um promotor, um "enhancer" e um sinal de poliadenilação, e opcionalmente uma sequência necessária para o transporte do factor para a superfície das células de matriz celular, incluindo uma sequência sinal na extremidade N. As sequências de regulação podem também ser seleccionadas para proporcionar transcrição constitutiva ou indutível. A expressão do factor à superfície da célula de matriz celular pode ser confirmada por coloração das células por imunofluorescência. Por exemplo, as células podem ser coradas com um anticorpo monoclonal com marcação fluorescente reactivo contra a molécula co-estimuladora ou com um receptor solúvel com marcação fluorescente que se liga ao factor. O perito na técnica, que conhece muito bem os factores a serem expressos pelas células de matriz celular, também conhece anticorpos monoclonais apropriados que reconhecem factores expressos pelas células de matriz celular. Alternativamente, proteínas ligando solúveis marcadas que se ligam aos factores podem ser utilizadas para detectar a sua expressão à superfície da célula de matriz celular. As técnicas e dispositivos utilizados para a detecção de células coradas por imunofluorescência são

bem conhecidas pelo perito na técnica; preferentemente utiliza-se para detecção um selector de células activado por fluorescência (FACS).

Quando o ácido nucleico que codifica para um factor está funcionalmente ligado a elementos de regulação, é tipicamente transportado num vector, incluindo por exemplo plasmídeos e vírus. Assim, um ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica para um factor da presente invenção ligado funcionalmente a elementos de controlo de regulação, é também aqui referido como um "vector de expressão". Serão escolhidos vectores de expressão em relação ao tipo de célula de matriz celular a ser transformada. Por exemplo, quando as células de matriz celular são células de matriz celular de insecto de drosófila, vectores constitutivos de drosófila disponíveis para a expressão de proteínas nas células de insecto cultivadas incluem a série pAc (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) a série pVL (Lucklow, V.A., e Summers, M.D., (1989) Virology 170:31-39).

Além disso, é preferido que as células de matriz celular que não tenham qualquer molécula do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe intrínseca I e/ou II à sua superfície. Significa que estas células não expressam naturalmente moléculas MHC, a não ser que tenham sido geneticamente transformadas. A ausência destas moléculas MHC de classe intrínseca I e/ou II à superfície das células de matriz celular é crucial para evitar uma

resposta alogénica entre as células de matriz celular e a população de células Tr1 específicas para o antigénio. Como resultado, as células de matriz celular da presente invenção podem ser utilizadas para expandir uma população de células Tr1 específicas para o antigénio de qualquer dador num curto período de tempo.

Numa realização mais particular, as células de matriz celular são limpas do seu meio de cultura Mf no passo (b).

Preferentemente, as células de matriz celular são células de matriz celular de insecto, com T_1 inferior a T_2 .

Pode-se utilizar qualquer célula de matriz celular de insecto apropriada na presente invenção, desde que cumpra com as condições acima mencionadas. Podem ser por exemplo células de matriz celular da linha Sf9 (entre outros, depositada na ATCC com o número CRL 1711 ou na DSMZ com o número ACC 125, e comercializada pela BD Biosciences Pharmingen, EUA), Sf21 (entre outros, depositada na DSMZ com o número ACC 119, e também comercializada pela BD Biosciences Pharmingen, EUA) ou S2. Preferentemente, as células de matriz celular de insecto são da linha celular S2 de drosófila. A linha celular S2 de drosófila é bem conhecida pelo perito na técnica, e foi revelada de forma abrangente na técnica anterior. A linha celular S2 de drosófila está disponível comercialmente (Invitrogen, França, etc...), e foi depositada em particular na colecção

Alemã de microrganismos e culturas celulares DSMZ ("Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen") com o número ACC 130, e revelada em Schneider, J Embryol Exp Morphol, 27:1972, 353; foi também depositada na colecção de culturas tipo Americana ATCC com o número CRL 1963. Preferentemente, as células de matriz celular são da linha S2 de células de drosófila depositadas a 25 de Março de 2005 na Colecção Nacional de Culturas de Microrganismos (CNCM, Instituto Pasteur, Paris) sob o número I-3407.

Uma grande vantagem proporcionada pela utilização de células de matriz celular de insecto quando se pretende expandir uma população de células de mamífero, e aqui uma população de células Tr1 específicas para um antigénio, é que (1) as células de matriz celular e as células de mamífero não proliferam à mesma temperatura (T_1 é inferior a T_2 e T_2 é pelo menos cerca de 35°C), e (2) os vírus de mamífero não proliferam em células de matriz celular de insecto, evitando deste modo possíveis contaminações da população de células Tr1 específicas para um antigénio a partir das células de matriz celular.

Mais preferentemente, o meio de cultura Mp é um meio de cultura sem soro. Preferem-se meios isentos de qualquer contaminante biológico, tais como meios de cultura sem soro comercialmente disponíveis (XVIVO-15 da BioWhittaker, Walkersville, MD; meio AIM V da Invitrogen, etc...).

Mais preferentemente, o meio de cultura Mf é um meio de cultura sem soro. Preferem-se meios isentos de qualquer contaminante biológico, tais como por exemplo meios de cultura sem soro comercialmente disponíveis (meio de Schneider sem soro comercializado por BioWhittaker, Walkersville, MD GIBCO® meio de cultura para células de insecto sem soro tal como SFM comercializado por Invitrogen, ou Insectagro® meio sem soro comercializado por Krackeler Scientific Inc., EUA, etc...) de modo a evitar a contaminação subsequente da população de células P.

Mais vantajosamente, as células de matriz celular são células de matriz celular recombinantes que expressam o grupo de factores recombinantes que interactivam com as seguintes proteínas de superfície celular da população de células Tr1 específica ao antígeno a ser expandida:

- o complexo proteico CD3/TCR,
- a proteína CD28,
- a proteína CD2,
- o receptor interleucina-2 (IL-2), e
- o receptor interleucina-4 (IL-4).

De facto, para a expansão da população de células Tr1 específica ao antígeno, é necessário o estímulo do complexo TCR/CD3 (TCR para receptor de célula T e CD para antígeno de diferenciação celular) para fornecer um sinal de activação primário numa célula T. Um anticorpo monoclonal anti-CD3 pode ser utilizado para activar uma população de células T através do complexo TCR/CD3, com

vantagem um anticorpo anti-CD3, em que a modificação do anticorpo anti-CD3 consiste na substituição do domínio intracitoplasmático com um domínio transmembranar, de tal modo que o referido anticorpo anti-CD3 modificado vai ancorar à membrana celular das células de matriz celular e interactua com o complexo proteico CD3/TCR das células T.

Além disso, algumas proteínas na superfície das células T, indiferentemente denominadas "moléculas de co-estimulação" ou "co-estimuladores", foram implicadas na regulação da transição de uma célula T quiescente para transformação blástica, e subsequente proliferação e diferenciação. Assim, além do sinal de activação primário proporcionado através do complexo TCR/CD3, a indução de respostas de células T requer um segundo sinal de co-estimulação. Crê-se que uma molécula de co-estimulação ou acessória, CD28, inicia ou regula uma via de transdução de sinal que é distinta daquelas estimuladas pelo complexo TCR. O factor que interactua com a proteína CD28 presente á superfície das células Tr1 específicas para o antigénio e que é expresso pelas células de matriz celular, pode ser um anticorpo monoclonal anti-CD28 ou um seu fragmento capaz de ligação cruzada com a molécula CD28; em tal caso, a modificação do anticorpo monoclonal anti-CD28 pode ser considerada através da adição de um domínio transmembranar de modo que vai ancorar à superfície celular das células de matriz celular. Preferentemente, o ligando natural para CD28 é utilizado em vez do anticorpo monoclonal anti-CD28, o que equivale a dizer por exemplo um membro da família B7

de proteínas, tais como proteínas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Outra molécula co-estimuladora, CD2, está implicada nos sinais que permitem a expansão da população de células Tr1 específica para um antígeno. Do mesmo modo, o factor expresso pelas células de matriz celular que interage com CD2 pode ser um anticorpo monoclonal anti-CD2 ou um seu fragmento capaz de ligação cruzada com a moléculas CD2; a modificação do anticorpo monoclonal anti-CD2 pode ser considerada através da adição de um domínio transmembranar para ancorar à superfície celular das células de matriz celular. Preferentemente, o ligando natural para CD2 é utilizado em vez do anticorpo monoclonal anti-CD2, ou seja a proteína CD58. Além dos factores que são ancorados à membrana celular das células de matriz celular, são também necessários factores que são secretados, tais como interleucinas, para a expansão da população de células Tr1 específica para um antígeno. Entre estas interleucinas estão IL-2, que interage com o receptor IL-2 presente à superfície das células Tr1 específicas para um antígeno, e quer IL-4 ou IL-13, que interagem com o receptor IL-4 das células Tr1 específicas para um antígeno.

Consequentemente, o grupo (A) dos factores recombinantes compreende:

- um anticorpo anti-CD3 modificado, em que a modificação do anticorpo anti-CD3 consiste na substituição do domínio intracitoplasmático anti-CD3 da cadeia pesada de anti-CD3 por um domínio transmembranar, sendo o referido anticorpo anti-CD3 ancorado à membrana celular das células de matriz

celular e sendo susceptível de interagir com o complexo proteico CD3/TCR das células T, ou uma sua variante.

- a proteína CD80 ou CD86, preferentemente a proteína CD80, ancorada à membrana celular das células de matriz celular, que é susceptível de interagir com a proteína CD28 das células T, ou uma sua variante, e
- a proteína CD58 ancorada à membrana celular das células de matriz celular, que é susceptível de interagir com a proteína CD2 das células Tr1, ou uma sua variante,
- IL-2 secretada pelas células de matriz celular, que é susceptível de interagir com o receptor IL-2 das células Tr1, ou uma sua variante, e
- uma interleucina seleccionada do grupo que compreende IL-4 e interleucina 13 (IL-13), preferentemente IL-4, sendo a referida interleucina secretada pelas células de matriz celular e sendo susceptível de interagir com o receptor IL-4 das células Tr1, ou uma sua variante.

Preferentemente, o domínio transmembranar que substitui o domínio intracitoplasmático da cadeia pesada do anticorpo anti-CD3 é o domínio transmembranar do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

Os factores que são expressos pelas células de matriz celular podem ser de qualquer origem. Preferentemente, são da mesma origem que aqueles da população de PBMC ou de leucócitos da qual se obtém a população de células Tr1 específica para um antígeno. Mais vantajosamente, a população de PBMC ou de leucócitos é uma

população humana. Mais preferentemente, os factores do referido grupo são de origem humana.

Preferentemente, a cadeia leve do anticorpo anti-CD3 modificado é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°1, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°1, e em que a cadeia pesada do anticorpo anti-CD3 modificado é codificada pelo ácido nucleico de sequência SEQ ID N°2, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°2.

Mais preferentemente, a proteína CD80 é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°3, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°3.

Vantajosamente, a proteína CD86 é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°4, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°4.

Ainda mais preferentemente, a proteína CD58 é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°6, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°6.

Numa realização preferida, a IL-2 é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°5, ou

qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°5.

Vantajosamente, a IL-4 é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°7, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°7.

Mais vantajosamente, a IL-13 é codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°8, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°8.

A expressão "molécula de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID No. X" refere-se a qualquer sequência que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99% de identidade com a referida sequência SEQ ID No. X.

Geralmente, após várias horas de cultura a população de células Tr1 específicas para o antígeno a ser expandida tal como 12 horas, preferentemente após 24 horas de cultura, mais preferentemente 48 horas, não existem quaisquer células de matriz celular viáveis no meio de cultura Mp. Com vantagem, a população de células Tr1 específicas para o antígeno é recuperada quando todas as células de matriz celular estão mortas, o que permite primeiramente obter uma população de células Tr1 específicas para o antígeno expandida maior, e secundamente recuperar rapidamente e facilmente a população de células

Tr1 específicas para o antígeno através da eliminação dos fragmentos de membrana celular das células de matriz celular, por exemplo, por métodos de lavagem e/ou por centrifugação por gradiente de densidade, tal como apresentado acima.

Assim, numa realização preferida, a população de células Tr1 específicas para o antígeno assim expandida é recuperada no passo (d) após se ter cultivado a população de células Tr1 específicas para o antígeno no passo (c) durante pelo menos 12 horas, preferentemente 24 horas.

Por percentagem de identidade entre dois ácidos nucleicos (ou sequências de ácido nucleico) ou duas sequências proteicas na presente invenção, significa uma percentagem de nucleótidos ou aminoácidos idênticos entre duas sequências a comparar, obtidas após o melhor alinhamento; esta percentagem é puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências são distribuídas aleatoriamente e ao longo da totalidade do seu comprimento. O melhor alinhamento ou alinhamento óptimo é o alinhamento correspondente à percentagem mais elevada de identidade entre duas sequências a comparar, a qual é calculada tal como aqui de seguida. As comparações de sequências entre dois ácidos nucleicos ou duas sequências proteicas são geralmente levadas a cabo através da comparação destas sequências após o seu alinhamento óptimo, sendo a referida comparação realizada para um segmento ou para uma "janela de comparação", para identificar e comparar regiões locais

de similaridade de sequência. O alinhamento óptimo de sequências para a comparação pode ser realizado manualmente ou por intermédio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) (Ad. App. Math. 2: 482), por intermédio do algoritmo de homologia local de Neddleman e Wunsch (1970) (J. Mol. Biol. 48: 443), por intermédio do método de investigação de similaridade de Pearson e Lipman (1988) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444), por intermédio de programas de computador utilizando estes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). A percentagem de identidade entre duas sequências de ácidos nucleicos ou duas sequências proteicas é determinada através da comparação destas duas sequências alinhadas de um modo óptimo com uma "janela de comparação" em cuja região da sequência de ácido nucleico ou sequência proteica para comparar pode compreender adições ou deleções relativamente à sequência de referência para um alinhamento óptimo entre estas duas sequências. A percentagem de identidade é calculada através da determinação do número de posições para as quais o nucleótido ou o aminoácido é idêntica entre as duas sequências, dividindo este número de posições idênticas pelo número total de posições na "janela de comparação" e multiplicando o resultado obtido por 100, para obter a percentagem de identidade entre estas duas sequências.

O passo (3) de expansão da população de células Tr1 específicas para o antigénio de acordo com a presente

invenção utilizando células de matriz celular, oferece as seguintes vantagens:

- O sistema de expansão de células de matriz celular é capaz de manter o crescimento exponencial da população de células Tr1 específicas para o antígeno durante pelo menos dois ou três meses *in vitro*,
- As células de matriz celular não têm moléculas MHC de classe I e II para evitar resposta alogénica,
- As células de matriz celular são isentas de micoplasma,
- As células de matriz celular são capazes de crescer bem utilizando meio de sem soro,
- As células de matriz celular não precisam de ser irradiadas,
- As células de matriz celular não permitem a expansão de vírus animais, e
- A população de células Tr1 específicas para o antígeno expandida é muito bem caracterizada para efeitos de injeção.

A presente invenção é ainda descrita nas figuras e exemplos seguintes.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Células Tr1 CD4⁺CD18^{brilhante}CD49b⁺ proliferam em resposta aos antígenos de alimentos e não têm memória para os antígenos.

A) Células T purificadas CD4⁺ (barras cinzentas), células Tr1 CD4⁺CD18^{bright}CD49b⁺ (barras brancas) e células

T de memória $CD4^+CD45RO^+CD49b^-$ foram estimuladas com o toxóide tetânico (10 $\mu\text{g/mL}$), PPD (20 $\mu\text{g/mL}$) ou anti- $CD3$ +anti $CD28$ mAb (10 $\mu\text{g/mL}$) na presença de monócitos purificados autólogos. A proliferação foi analisada por incorporação de timidina ao dia 5. B) A mesma população que em A foi estimulada com ovalbumina (OVA, 20 $\mu\text{g/mL}$), Caseína (20 $\mu\text{g/mL}$) ou uma mistura de proteínas de soja (Soja) a 50 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados representam a resposta proliferativa média de 10 pacientes diferentes.

Figura 2: Células T $CD4^+CD18^{\text{brilhante}}CD49b^+$ proliferam com antígenos de alimentos e não com antígenos de vacina.

Células T $CD4^+$ ou $CD4^+CD45RO^+CD49b^-$ purificadas ou $CD4^+CD18^+CD49b^+$ foram marcadas com CFSE e estimuladas com o antígeno diferente tal como indicado, seja um antígeno de vacina (PPD, derivado proteico purificado: tuberculina, TT: toxóide tetânico) ou antígeno de alimento (OVA: ovalbumina, Caseína ou proteína de Soja). Após 8 dias, as células foram analisadas por citofluorometria, e a percentagem de células divididas foi analisada pela expressão decrescente de CFSE. A percentagem de células $CFSE^{\text{baixo}}$ é indicada em cada quadrante.

Figura 3: Células T proliferativas $CD4^+$ específicas para um antígeno de alimento têm um fenótipo de perfil de citocina Tr1

Marcaram-se células T $CD4^+$ com CFSE e estimu-

laram-se com a vacina indicada (PPD, TT) ou antígeno de alimento (OVA, Soja, Caseína). Purificaram-se células T $CD4^+$ CFSE^{baixo} e foram reestimuladas com um mAb anti-CD3 e anti-CD28, e após 48 horas os sobrenadantes foram analisados por ELISA para medir as quantidades das citocinas indicadas. As células T $CD4^+$ proliferativas específicas para o antígeno de alimento apresentaram um fenótipo Tr1 com um nível de secreção IL-10^{alto} IL-4⁻ IFN- γ ^{+/-}, IL-5^{+/-}, IL-2⁻, enquanto que células T específicas para o antígeno com memória apresentaram um fenótipo Th1 com elevada secreção de IFN- γ .

Figura 4: Células T $CD4^+CD18^{\text{brilhante}}CD49b^+$ proliferam para auto-antígeno e as células específicas para o auto-antígeno apresentaram um fenótipo de citocina Tr1

Células T $CD4^+$ ou $CD4^+CD45RO^+CD49b^-$ purificadas ou $CD4^+CD18^+CD49b^+$ foram marcadas com CFSE e estimuladas com um auto-antígeno (MBP: proteína básica da mielina) ou insulina conforme indicado. Após 8 dias, as células foram analisadas por citofluorometria, e a percentagem de células divididas foi analisada pela expressão decrescente de CFSE. A percentagem de células CFSE^{baixo} é indicada em cada quadrante. As células T CFSE^{baixo} foram purificadas e reestimuladas com mAb anti-CD3 e anti-CD28, e após 48 horas os sobrenadantes foram analisados por ELISA para medir as quantidades das citocinas indicadas. células T $CD4^+$ proliferativas específicas para o auto-antígeno

apresentaram um fenótipo Tr1 com níveis de secreção IL10^{alto} IL-4⁻ IFN- γ ^{+/-}, IL-5^{+/-}, IL-2⁻.

Figura 5: Células Tr1 podem ser observadas em pacientes que sofrem de doenças autoimunes ou alérgicas para o antígeno testado

Células T CD4⁺ ou CD4⁺CD45RO⁺CD49b⁻ purificadas ou CD4⁺CD18⁺CD49b⁺ foram isoladas de um paciente que sofre de esclerose múltipla (MS) ou alergia à caseína, conforme indicado, marcadas com CFSE e estimuladas com um auto-antígeno (MBP: proteína básica da mielina) ou caseína ou derivado proteico purificado de Mycobacterium tuberculosis (PPD) como controlo positivo conforme indicado. Após 8 dias, as células foram analisadas por citofluorometria, e a percentagem de células divididas foi analisada pela expressão decrescente de CFSE. A percentagem de células CFSE^{baixo} é indicada em cada quadrante. As células T CFSE^{baixo} foram purificadas e reestimuladas com mAb anti-CD3 e anti-CD28, e após 48 horas os sobrenadantes foram analisados por ELISA para medir as quantidades das citocinas indicadas.

Figura 6: Células Tr1 específicas para um antígeno de alimentos não proliferaram em resposta exclusiva a IL-2 mas proliferaram vigorosamente em resposta a IL-2 e IL-4.

As células CD4⁺ foram marcadas com CFSE, estimuladas com os antígenos indicados e purificadas tal como na Figura 3. As células purificadas foram então

expandidas na presença de apenas IL-2 (1 µg/mL) ou IL-2 e IL-4 (1 µg/mL e 500 ng/mL, respectivamente). O número de células sob as diferentes condições foi então medido e representado em relação ao número de dias após iniciação. Células T com memória para o antígeno proliferaram em resposta a IL-2 e à combinação de IL-2 e IL-4, enquanto que as células Tr1 específicas para o antígeno de alimento proliferaram apenas contra a combinação das citocinas IL-2 e IL-4.

Figura 7: Células Tr1 específicas para o antígeno expandidas com IL-2 e IL-4 mantêm o seu perfil de citocinas após a expansão

As diferentes populações de células T específicas para o antígeno tais como obtidas na Figura 5 foram estimuladas com mAb CD3 e CD28 e o seu perfil de citocinas foi determinado por ELISA nos sobrenadantes recolhidos 48 horas após estimulação. As células T específicas para PPD e TT mantiveram o seu perfil de citocinas Th1 após expansão apenas com IL-2, enquanto que a adição de IL-4 induziu a secreção de IL-4 nestas células tal como esperado. Pelo contrário, células Tr1 específicas para antígenos de alimentos mantiveram o seu perfil de citocinas mesmo após expansão na presença de IL-2 e IL-4.

Figura 8: Análise da expressão de proteína humana na linha celular S2.

Análise de citometria de fluxo a duas cores das

cadeias pesada e leve de OKT3 e expressão CD80 e CD58 em células parental (S2) ou de fábrica celular (CF).

Figura 9: Esquema de CF modificada em interacção com uma célula Tr1 CD4⁺

As células S2 foram transfectadas com um mAb anti-CD3 ligado à membrana para envolver o complexo TCR/CD3, CD80 e CD58 na adição de alguns sinais co-estimuladores através da interacção com as moléculas CD28 e CD2, respectivamente, e IL-2 e IL-4 para induzir o crescimento celular.

Figura 10: Proliferação de células T induzidas pela linha celular CF.

A proliferação de PBLs policlonais, células T CD4⁺, linhas celulares Tr1 (L1 e L2) ou clones Tr1 (C1 e C2) estimulados com a fábrica celular foi medida por incorporação de [3H]timidina entre os dias 3 e 4 de cultura. As células T foram estimuladas com células CF tal como indicado, na ausência de citocinas exógenas. Às t2 h, as células foram pulsadas com [3H]timidina e incubadas durante mais 18 h antes da recolha. Os valores de contagens por minuto são apresentadas como média e erro padrão da média de culturas em triplicado.

Figura 11: Crescimento prolongado de células Tr1 humanas policlonais primárias estimuladas com fábrica celular.

As células Tr1 foram estimuladas com esferas CD3/28 mais IL-2 e IL-4 exógenas, células CF' que expressam OKT3, CD80 e CD58 mas não IL-2 e IL-4 na presença de IL-2 e IL-4, ou com o sistema de fábrica celular completo sem qualquer adição exógena. As células T foram estimuladas com células CF nos dias 0, 10, e 20 de cultura.

Figura 12: Pureza das células T após co-cultura com a linha celular CF.

Avaliou-se a pureza das células T e após estimulação com a linha celular CF através da coloração para a expressão de CD3, CD4 durante os primeiros sete dias de cultura. A selecção da análise com base no tamanho das células/detritos não foi utilizada nesta experiência de modo a representar todas as células na cultura. As células viáveis são indicadas através da restrição da análise com base em iodeto de propídio de modo a excluir células mortas. Os resultados são representativos de >10 experiências diferentes, cada uma com um dador diferente.

Figura 13: Destino da linha celular CF após co-cultura com células T

O destino das células estimuladoras CF foi avaliado através da coloração para a expressão de CD4 e

OKT3H durante os primeiros sete dias de cultura. A selecção da análise com base no tamanho das células/detritos não foi utilizada nesta experiência de modo a representar todas as células na cultura. As células viáveis são indicadas através da restrição da análise com base em iodeto de propídio de modo a excluir células mortas. Os resultados são representativos de >10 experiências diferentes, cada uma com um dador diferente.

Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental utilizado.

Figura 15: Isolamento da clones Tr1 específicos para OVA.

Estimulou-se PBL corado com CFSE com OVA, e corados com CD4 CD49b e CD18. Seleccionaram-se para análise células CD4⁺CD49b⁺CD18^{brilho} e foram seleccionadas células CFSE. As células seleccionadas foram clonadas para gerar o clone 1 e o clone 2, a população em bruto foi estimulada com OVA e corada com IL-1 e IFN- γ revelando um fenótipo Tr1.

Figura 16: Análise de proliferação prolongada de clones Tr1

Foram então estimulados dois clones com a fábrica celular irradiada. Os números de células totais são apresentados numa representação semi-logarítmica do número de células vs. dias em cultura.

Figura 17: Perfil de citocinas de clones T 1 e 2 específicos para OVA após expansão da fábrica celular durante 70 dias.

Mediram-se citocinas nos sobrenadantes dos clones estimulados com OVA e monócitos irradiados autólogos. A supressão específica para antígeno foi também examinada através de um teste de migração nos poços. Estimularam-se PBLs autólogos com mAb anti-CD3 no fundo do poço, e adicionaram-se no topo do cesto nenhuma células, células T CD4 controlo e os dois clones e estimulou-se com anti-CD3 e monócitos irradiados autólogos para células CD4 ou OVA e monócitos autólogos irradiados para os dois clones Tr1. A totalidade do protocolo é representativo de dez experiências, cada uma de diferentes dadores.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: OBTENÇÃO *IN VITRO* DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICA PARA O AUTO-ANTIGÉNIO OU ANTIGÉNIO DE ALIMENTOS A PARTIR DE UMA POPULAÇÃO PBMC POR ESTIMULAÇÃO COM O AUTO-ANTIGÉNIO OU O ANTIGÉNIO DE ALIMENTO

1.1 Materiais e métodos

Purificação celular e citometria de fluxo

Recuperaram-se células mononucleares de sangue periférico (PBMC) a partir da camada leuco-plaquetária de

dadores saudáveis após centrifugação num gradiente de Ficoll. Purificaram-se linfócitos T $CD4^+$ a partir de PBMC após remoção de células $CD11b^+$ (OKM1-95), $CD20^+$ (1F5C9), e $CD8^+$ (G42-8) por selecção negativa utilizando esferas Dynabeads revestidas com anticorpos de cabra anti-ratinho (Dynal, Oslo, Noruega). Os monócitos foram purificados por aderência após cultura de PBMC durante 1 hora a 37°C em meio RPMI suplementado com 20% de FCS. Mais de 90% das células aderentes recuperadas eram monócitos $CD14^+$. Os linfócitos T $CD4^+$ foram separados em células T $CD49b^+CD18^{\text{brilho}}$ ou $CD49b^+CD45RO^+$ após coloração das células com anticorpos fluorescentes e separadas num equipamento FACS vantage SE, Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, França). Utilizaram-se os seguintes anticorpos para citometria de fluxo: FITC, CD4 de ratinho anti-humano marcado com APC ou PC5 (RPA-T4), CD3 de ratinho anti-humano marcado com PC5 (UCHT1), CD49b de ratinho anti-humano marcado com PE (12F1-H6), CD14 de ratinho anti-humano marcado com FITC (M5-E2), CD18 de ratinho anti-humano marcado com PE ou PC5 (6.7), CD25 de ratinho anti-humano marcado com PE (M-A251), HLA-DR de ratinho anti-humano marcado com PE (G46-6), CD69 de ratinho anti-humano marcado com PE (FN50), CD45RO anti-humano FITC (UCHL-1). Todos os anticorpos foram adquiridos junto da BD-Pharmingen (Le Pont de Claix, França).

Cultura celular

Para a detecção de linfócitos T específicos para

o antígeno $CD4^+$, coraram-se PBMCs (10 milhões de células/mL) ou com 0,2 μM de CFSE ou com 2,5 μM de PKH26 (Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante 5 minutos a 37°C em PBS 1x. Após duas lavagens em PBS 1x, as populações celulares foram incubadas a 2 milhões/mL em meio RPMI suplementado com 5% de soro humano AB na presença ou ausência de 200 $\mu g/mL$ de Ovalbumina de galinha, 200 $\mu g/mL$ de Caseína bovina, 200 $\mu g/mL$ de Insulina humana (Sigma, L'Isle d'Abeau, França), 50 $\mu g/mL$ de toxóide Tetânico (Lederie, Pearl River, Nova Iorque) e 2 $\mu g/mL$ de Derivado Proteico Purificado (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis* (Staten serum Institute, Dinamarca) ou 50 $\mu g/mL$ de MBP (Sigma, L'Isle d'Abeau, França). Após 9 dias de cultura, as células foram coradas com CD4 de ratinho anti-humano marcado com PC5 e analisadas por citometria de fluxo. Foram também seleccionadas células T $CD49b^+CD18^{brilho}$ ou $CD49b^+CD45RO^+$, coradas com 0,2 μM de CFSE ou 2,5 μM de PKH26 e cultivada a 2 milhões/mL na presença de 4×10^5 monócitos autólogos e na presença de antígenos.

Seleção e expansão de células específicas para antígeno

Após 10 dias de cultura, seleccionaram-se células T específicas para o antígeno $CD4^+CFSE^{baixo}$ ou $CD4^+PKH26^{baixo}$ num equipamento FACS vantage SE (Beckton Dickinson) e foram expandidas com PBMCs autólogas irradiadas na presença de antígenos, em meio X-vivo 15 (Biowittaker, Emerainville, França) suplementado com 10 ng/mL de IL4 e 5 ng/mL de IL2.

Detecção de citocinas

A produção de citocinas foi detectada por ELISA que foram realizados em sobrenadantes de populações de células humanas (2 milhões/mL) cultivadas durante 48 horas em meio RPMI suplementado com 10% de FCS (Life Technologies, Cergy Pontoise, França) e estimuladas com 10 µg/mL de anti-CD3 revestido (UCHT1) e 1 µg/mL de anti-CD28 solúvel (CD28.2). Os anticorpos utilizados foram anticorpos de captura anti-IL10 (JES3-9D7), anti-IL4 (8D4), anti-IL2 (17H12), anti-IL5 (39D10) e anti-IFN γ (A35) e anticorpos de detecção marcados com NIP anti-IL10 (JES3-12D8), anti-IL4 (MP4-25D2), anti-IL2 (B33-2), anti-IL5 (5A10) e anti-IFN γ (B27) seguidos pela adição de anticorpo anti-NIP marcado com peroxidase e de ABTS. IL10, IL4 e IFN γ foram da R&D systems (Minneapolis, MN), IL2 foi da Chiron corp (Emmeryville, CA). Todos os anticorpos foram da BD pharmingen.

Medição da proliferação

Para avaliar a proliferação, as populações de células T (1 milhão de células/mL) foram estimuladas *in vitro* com PBMCs autólogas irradiadas e antigénios específicos em RPMI suplementado com 10% de FCS a 37°C na presença das citocinas indicadas. A proliferação de células T foi avaliada pela enumeração das células vivas.

Métodos para isolar células Tr1 específicas para um antigénio

Os inventores desenharam métodos para isolar populações e clones de células Tr1 específicas para um antigénio.

O primeiro método assenta na incorporação de CFSE ou qualquer corante similar (PHK). As células são marcadas com CFSE e estimuladas com um antigénio de alimento (na gama de 0,1 µg/mL a 5 mg/mL), após 9 a 10 dias, as células são seleccionadas por citofluorometria e mantidas com esferas CD3+CD28 e IL-2+IL-4. De modo a remover quaisquer outras células que poderiam não ter proliferado significativamente sob estas condições de cultura, as células poderiam também ser clonadas a uma célula por poço e os diferentes clones analisados para especificidade e secreção de citocina.

O segundo método assenta na expressão à superfície celular de marcadores de activação ou proliferação. As PBMCs são estimuladas com auto-antigénios ou antigénios de alimento e as células estimuladas com o antigénio são purificadas por anticorpos dirigidos contra anti-CD69, anti-CD25 ou quaisquer marcadores de activação ou de proliferação. As células purificadas são então mantidas com estímulos CD3+CD28 e IL-2+ IL-4. Alternativamente as células podem ser mantidas com células de matriz celular e estímulo CD3/CD28, na presença de IL-2 e IL-4. As células

purificadas poderiam também ser clonadas a uma célula por poço por selecção por FACS ou diluição limite.

O terceiro método baseia-se no enriquecimento da população proliferativa após estimulação com auto-antigénios ou antigénios de alimento. As PBMCs são estimuladas com ovalbumina (ou qualquer outro antigénio de alimento) e após uma semana as células são de novo estimuladas com o mesmo antigénio na presença de IL-2 e IL-4. A combinação foi óptima, mas pode ser utilizada qualquer combinação ou período de tempo. A população enriquecida foi então clonada por diluição limite (mas poderia ser utilizada qualquer outra técnica de clonagem). Os clones foram então multiplicados por estimulação com células de matriz celular anti-CD3, CD28 e IL-2 e IL-4. Os clones em proliferação foram então analisados para especificidade e secreção de citocinas utilizando ovalbumina apresentadas por PBMCs irradiadas autólogas.

1.2 Resultados

As células Tr1 CD4⁺CD3⁺CD49b⁺CD18^{brilho} proliferam em resposta a antigénios de alimentos e não a antigénios de vacina

Quando os inventores purificaram células Tr1 CD4⁺CD3⁺CD49b⁺CD18^{brilho}, observaram que estas células não proliferam em resposta a antigénios de memória tal como o toxóide tetânico de PPD, ao contrário da população recíproca (Fig 1A). Também testaram a capacidade das

células Tr1 $CD4^+CD3^+CD49b^+CD18^{brilho}$ proliferarem com antígenos de alimentos. Tal como apresentado anteriormente, foi apenas observada uma resposta proliferativa muito mínima relativamente à linha de base quando a população total de células T $CD3^+CD4^+$ foi estimulada com antígenos de alimentos (Ovalbumina, caseína, proteína de soja ou imunoglobulinas bovinas). No entanto, observaram uma resposta proliferativa vigorosa nas populações de células Tr1 $CD4^+CD3^+CD49b^+CD18^{brilho}$ purificadas, enquanto que não se observou qualquer proliferação na população de memória recíproca (Fig 1B).

Deste modo, utilizaram uma técnica mais sensível com incorporação de CFSE, e observaram que as células Tr1 não proliferavam com antígenos de memória, mas apresentavam uma resposta proliferativa significativa a antígenos de alimentos, tais como ovalbumina, caseína ou proteínas de soja. Pelo contrário, a população recíproca de células T $CD4^+$ não apresentou qualquer resposta proliferativa aos antígenos de alimentos mas proliferou vigorosamente com os antígenos de memória (TT e PPD) (Fig 2).

As células T $CD4^+CD3^+CD49b^+CD18^{brilho}$ específicas para um antígeno de alimento têm um perfil de citocina Tr1.

Utilizando a técnica de incorporação CFSE (Figura 3), os inventores isolaram por FACS as células proliferativas CFSE^{baixo} e analisaram o seu perfil de citocina através de um estímulo policlonal (mAbs antiCD3+CD28).

Estas experiências mostraram que células específicas para OVA, Caseína, e soja têm um perfil de citocinas Tr1 secretando em níveis elevados IL-10, algum IFN- γ , alguma IL-5 e nenhuma IL-2 e IL-4 como previamente descrito (Groux et al. Nature 1997). Pelo contrário, as células específicas para TT ou PPD apresentavam um fenótipo Th1 que secretava principalmente IFN- γ , como esperado.

As células Tr1 são também específicas para auto-antígenos

Utilizando a técnica de CFSE, os inventores também analisaram a resposta proliferativa das diferentes populações de células T CD4⁺ aos auto-antígenos tais como MBP (proteína básica da mielina) ou insulina. De modo similar aos antígenos de alimentos, não se observou qualquer ou nenhuma resposta proliferativa na globalidade da população CD4⁺ (como referido) ou na população de memória CD49b⁺ (CD45RO⁺). Surpreendentemente, observou-se uma resposta de proliferação vigorosa quando se estimularam células Tr1 CD4⁺CD3⁺CD49b⁺CD18^{brilho} purificadas com insulina ou MBP. Além disso, estas células específicas para MBP ou insulina apresentavam um perfil de citocinas tr1 com elevada secreção de IL-10 (Fig 4).

Podem ser isoladas células tr1 em pacientes que sofram de auto-imunidade ou alergia ao antígeno testado

Uma vez que auto-antigenes e antigenes de alimentos foram associados a doenças, respectivamente, autoimunes

ou alérgicas, os inventores analisaram a presença de células T proliferativas na população de células T $CD4^+CD3^+CD49b^+CD18^{brilho}$ purificada de pacientes que sofrem de MS (com uma doença autoimune direccionada contra um componente da mielina tal como MBP) ou pacientes com alergia à caseína. Tal como ilustrado na Figura 5, observaram que, como esperado, a estimulação com MBP ou com Caseína induz a proliferação em $CD4^+CD3^+CD45R0^+CD49b^-$ num paciente que sofra, respectivamente, de esclerose múltipla ou alergia à caseína. A reestimulação das células proliferativas mostrou que como esperado estas células apresentavam um perfil de citocinas Th1 no caso de células de um paciente que sofre de MS estimulado com MBO, e um perfil de citocinas Th2 em resposta à Caseína no caso do paciente alérgico. No entanto, inesperadamente, também observaram uma proliferação na população de células Tr1 $CD4^+CD3^+CD49b^+CD18^{brilho}$ tal como num controlo normal mostrando que células Tr1 específicas para um auto-antígeno ou antígeno de alimentos também poderia ser observadas em pacientes que sofrem de auto-imunidade ou alergia ao antígeno testado (Fig 5).

A combinação de IL-2 e IL-4 é necessária para manter a proliferação de células Tr1 específica para o Ag.

Apesar das células Tr1 (células $CD4^+CD3^+CD49b^+CD18^{brilho}$) proliferarem em resposta a auto-antígenos ou antígenos de alimentos, aquela proliferação não conseguiu ser mantida através da adição de apenas IL-2

(Fig 6) em contraste com a proliferação de células T específicas para TT e PPD (Fig 6). Surpreendentemente, os inventores descobriram que a adição combinada de IL-2 e IL-4 permitiu a manutenção da resposta proliferativa dos células Tr1 específicas para o auto-antigénio ou para antigénios de alimentos (Fig 7).

EXEMPLO 2: EXPANSÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICA PARA ANTIGÉNIOS OBTIDA UTILIZANDO CÉLULAS DE MATRIZ CELULAR

2.1 Protocolo experimental

Anticorpos marcados

Para selecção de esferas:

Esferas utilizadas:

- «MagCelect Ferrofluid, Streptavidin» (R&D)
- «Sheep anti-Rat beads» (Dako)

Para CD80: CD80 de ratinho-anti-humano biotinilado (B7-1), clone L307.4 (BD Biosciences Pharmingen)

Para OKT3: Cadeia leve de IgK de rato anti-ratinho purificado, clone 187.1 (BD Biosciences Pharmingen)

Para selecção por FACS e marcadores de selecção usuais

Para CD80 : CD80-PE (ficoeritrina) ou FITC (fluoresceína isotiocianato) de ratinho-anti-humano, clone L307.4 (BD Biosciences Pharmingen)

Para CD58: CD58-PE ou PECy5 (ficoeritrina-cianina 5) de

ratinho-anti-humano (LFA-3) Clone 1C3 (BD Biosciences Pharmingen)

Para OKT3 :

- *Cadeia pesada*: IgG2a anti-ratinho biotinilado, clone R19-15 + Estreptavidina-FITC ou Estreptavidina-PE ou Estreptavidina-PECy5 (BD Biosciences Pharmingen)
- *Cadeia leve*: cadeia leve de IgK de rato-anti-ratinho purificada, clone 187.1 (BD Biosciences Pharmingen) + Coelho-anti-Rato-FITC (Dako)

Iniciadores de amplificações

OKT3-L FWD:

5'-ATGCGGATCCATGGATTTTCAAGTGCAG-3' (SEQ ID N° 9)

OKT3-L REV:

5'-ATGCGAATTCCTAACACTCATTCCTGTTG-3' (SEQ ID N° 10)

iniciador OKT3H1 cadeia pesada variável (571 pb):

HSPAT1 FWD:

5'- ATG CCC GCG GGG TAC CCA CTG AAA ACT CTG ACT CAA C
- 3' (SEQ ID N° 11)

OKT3 H2/3 REV:

5'- ACT GGA CAG GGA TCC AGA GTT C - 3' (SEQ ID N° 12)

iniciador OKT3H2 cadeia pesada CH1-CH3 (850 pb).

OKT3 H3/5 FWD:

5'- GAA CTC TGG ATC CCT GTC CAG TG -3' (SEQ ID N° 13)

OKT3 H3/3 REV:

5'- ATG CGA ATT CTT TAC CCG GAG TCC GGG AGA AGC TC -3'
(SEQ ID N° 14)

iniciador pdgfr receptor do factor de crescimento derivado
de plaquetas, beta (151pb)

PDGFR 5 FWD:

5'- ATG CGA ATT CGC TGT GGG CCA GGA CAC GCA G - 3'
(SEQ ID N° 15)

PDGFR 3 REV:

5'- ATG CGG GCC CAA GCT TCT AAC GTG GCT TCT TCT GCC
AAA G-3' (SEQ ID N° 16)

IL-2 FWD:

5'- ATGCGGATCCATGTACAGGATGCAACTCCT - 3' (SEQ ID N° 17)

IL-2 REV:

5 '- ATGCGAATTCTCAAGTCAGTGTTGAGATGA - 3' (SEQ ID N°
18)

LFA3 FWD:

5'- ATGCTGGATCCATGGTTGCTGGGAGCGACGC - 3' (SEQ ID N°
19)

LFA3 REV:

5'- ATGCTAAGCTTTCAATTGGAGTTGGTTCTGT - 3' (SEQ ID N°
20)

IL-4 FWD:

5'- ATGCGGATCCATGGGTCTCACCTCCCAACT - 3' (SEQ ID N° 21)

IL-4 REV:

5'- ATGCAAGCTTTCAGCTCGAACACTTTGAAT - 3' (SEQ ID N° 22)

Clonagem e construção da fábrica celular

Clonaram-se CD80, IL-2, IL-4 e CD58 humanos de linfócitos T de sangue periférico (PBLs) obtidos de um dador saudável no vector pAC (Invitrogen) utilizando o promotor da actina de insecto (Chung e Keller, Mol Cell Biol. 1990 Dez; 10(12): 6172-80; Chung e Keller, Mol Cell Biol. 1990 Jan; 10(1): 206-16) e transfectou-se por electroporação (electroporador Biorad, EUA) em células S2 da linha celular S2 depositada a 25 de Março de 2005 na CNCM sob o número I-3407. De modo similar, as cadeias pesada e leve de OKT3 (Kung et al, Science. 1979 Out 19; 206(4416): 347) foram clonadas a partir das células de hibridoma OKT3 (ATCC CRL 8001; Manassas, Virgínia, EUA) no vector pAC e transfectadas para as células S2 antes de FACS. De modo a obter mAb anti-CD3 ligado à membrana, removeu-se a extremidade 3' da cadeia pesada e substituiu-se pela parte transmembranar do gene do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) de células CF', ou seja, células que expressam hCD80, hCD58 e o anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD3 e CF, ou seja células que expressam hCD80, hCD58, hIL-2 hIL-4 e o anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD3, foram isoladas por selecção celular activada por fluorescência FACS utilizando anticorpos tal como descrito acima. Não se utilizou qualquer marcador de selecção e seleccionaram-se células que foram transfectadas de forma estável por cloração FACS. As células seleccionadas foram clonadas e para cada ciclo de

transfecção e selecção, foi seleccionado o clone mais eficiente para a estimulação das células Tr1.

Preparação de linfócitos T CD4⁺ e cultura de células S2

Obtiveram-se linfócitos de sangue periférico fresco por centrifugação em Ficoll hypaque e as células T CD4⁺ foram purificadas por selecção negativa utilizando o anticorpo anti-CD8 (Beckton Dickinson). Todas as culturas foram mantidas em X-vivo sem adição de soro (BioWhittaker, Wlerville, MD). Adicionou-se IL-2 humana (Chiron Therapeutics, Emeryville, CA) a 20 UI/mL onde indicado, utilizou-se hIL-4 a 1 µg/mL (para comparação da vantagem biológica obtida quando as células de matriz celular expressam as interleucinas com os resultados obtidos quando se adicionam interleucinas recombinantes no meio de cultura). As células S2 foram mantidas em meio SFM sem soro (Gibco).

Citometria de fluxo e selecção por FACS

As células foram coradas com anticorpos a 4°C, e analisadas num equipamento FACSCalibur (BD BioSciences, Mountain View, CA) e seleccionadas com o sistema FACStar.

2.2 Resultados

Construção de aAPCs

Para testar a hipótese de que as células Tr1 têm

requisitos de co-estimulação distintos para o crescimento de longo prazo, os inventores desenharam um sistema baseado em células que poderia ser manipulado geneticamente para expressar diferentes moléculas e citocinas co-estimuladoras além dos estímulos clássicos CD3/CD28. Escolheram células S2 dado que não expressam proteínas HLA humanas que iriam promover respostas alogénicas, e não poderiam ser contaminadas por vírus humanos (Fig. 8). Além disso, a eventual introdução de células de matriz celular irradiadas na prática clínica pode ser evitada uma vez que estas células que crescem a 27°C são facilmente mortas a 37°C e são propagadas num meio sem soro. Os inventores transfectaram e depois clonaram as células S2 que expressam o CD80 humano, o CD58 humano e as duas cadeias de um mAb anti-hCD3 para permitir o estímulo de células Tr1 humanas (CF') (Fig. 8). De modo similar, geraram a linha CF (Figs. 8, 9) através da transfecção das células CF' com cADN de IL-4 humano e IL2. As culturas foram iniciadas através da adição de células CF a células T CD4⁺ frescas preparadas através de selecção negativa (ver Protocolo Experimental).

A linha celular CF activa eficientemente as células T CD4⁺ policlonais e as células Tr1

A fábrica celular foi testada relativamente à sua capacidade de estimular a activação inicial e proliferação de células T CD4⁺ primárias assim como linhas de células Tr1 ou clones de células tr1. As diferentes células T purificadas foram estimuladas com a fábrica celular numa

razão 1/1. Os inventores descobriram que a velocidade inicial de crescimento das células T estimuladas com a fábrica celular era equivalente, tal como avaliado pela incorporação de [3H]timidina (Fig. 10) com um ligeiro aumento de resposta proliferativa das células Tr1 em relação a outras células T CD4⁺. Os inventores confirmaram esta observação através da marcação de células T frescas com éster carboxifluoresceína diacetato de succinimidilo (CFSE) e monitorizando a divisão celular durante os primeiros cinco dias de cultura (dados não apresentados). Também descobriram que o sistema baseado em células era mais eficiente do que as esferas CD3/28 para a indução da proliferação e da divisão celular das células T CD4⁺ (dados não apresentados). Não se observou proliferação quando a fábrica celular, ou as células T CD4⁺ eram incubadas separadamente (Fig. 10 e dados não apresentados). Assim, os requisitos para os ciclos iniciais de proliferação de células T CD4⁺ foram ainda mais satisfatórios com a fábrica celular em comparação com a estimulação CD3/CD28 proporcionada no contexto de esferas de poliestireno.

A linha celular CF permite a expansão prolongada de células Tr1 humanas

De seguida, os inventores determinaram se a fábrica celular era suficiente para manter a propagação prolongada de células Tr1 (Fig. 11). As células Tr1 foram estimuladas com CF que secreta hIL-2 e IL-4, com CF' que não secreta citocinas mas com a adição de citocinas

exógenas e esferas CD3/28 com citocinas exógenas. As células estimuladas com esferas CD3/28 não proliferaram após a segunda estimulação, em concordância com estudos anteriores. Similarmente, as células Tr1 estimuladas com CF' no contexto de IL-2 e IL-4 adicionadas exogenamente entraram numa fase de patamar da curva de crescimento ao fim de duas ou três semanas de cultura, e não ocorreu qualquer crescimento líquido de células após a reestimulação. Pelo contrário, quando as culturas de células Tr1 foram estimuladas com a fábrica celular, permaneceram em crescimento exponencial mesmo após uma terceira estimulação. Este aumento da proliferação de longo prazo foi reprodutível, uma vez que o aumento médio no número total de células T foi 810 vezes superior em culturas estimuladas com a fábrica celular do que em culturas estimuladas com esferas CD3/28 em seis experiências independentes.

A análise fenotípica das culturas mostrou um enriquecimento progressivo para células T CD3+CD4+ após estimulação com a fábrica celular (Fig. 12). As células S2 desapareceram rapidamente da cultura celular, tal como evidenciado por uma incapacidade em detectar as células que expressam o mAb anti-CD3 por citometria de fluxo após sete dias (Fig. 13); esta descoberta foi confirmada em experiências em larga escala e também por RT-PCR para genes de drosófila (dados não apresentados). Assim, a cultura mista de células T e fábrica de células origina uma população pura de células T no período de uma semana.

Propagação eficiente de células Tr1 específicas para um antigénio pela fábrica de células

A imunoterapia com células Tr1 irá provavelmente necessitar de células com funções reguladoras específicas para o antigénio. Para determinar se a fábrica celular poderia ser usada para expandir Tr1 específicas para o antigénio, os inventores usaram-nas para cultivar clones Tr1 específicos para OVA durante 10 semanas (Fig. 14). Um exemplo de dois clones diferentes é ilustrado pela experiência que foi realizada com centenas de diferentes clones de células específicas para auto-antigénios ou antigénios de alimentos. PBLs de um indivíduo normal foram marcados com CFSE para seguir a divisão celular e as células foram estimuladas com ovalbumina (20 µg/mL) durante 7 dias. As células foram então coradas com CD4, CD18 e CD49b para seleccionar células Tr1 que sobre-expressam estes marcadores e seleccionaram-se células específicas para OVA de acordo com a diminuição na marcação CFSE devido à divisão da célula específica para o antigénio (Fig. 15). Para controlar o seu fenótipo, a globalidade de uma população seleccionada foi estimulada com OVA e a produção de citocinas foi analisada por intermédio de coloração intracitoplasmática que revelou uma população Tr1 típica (Fig. 15). Após a clonagem, as células foram estimuladas com a fábrica celular (Fig. 16). Todas as células foram reestimuladas com a fábrica celular a intervalos de 10 dias. Não se proporcionou estimulação OVA específica

durante a cultura. Obtiveram-se curvas de crescimento exponenciais para ambos os clones durante vários meses. A célula Tr1 específica para um antígeno resultou em $1,5 \times 10^9$ células após um mês e meio de cultura, um número de células suficiente para imunoterapia. A capacidade proliferativa substancial das células Tr1 que subsiste após 30 dias de cultura sugere que estas Tr1 poderia ter um potencial de enxerto de longo prazo após transferência adoptiva.

Para determinar se a especificidade ao antígeno das populações expandidas foi mantida durante a cultura, as células foram estimuladas com OVA (Fig. 17). Após um mês e meio de cultura, as células foram estimuladas com OVA e APCs autólogos e analisou-se a secreção de citocina. Observou-se um perfil típico tr1 para os dois diferentes clones analisados.

Para determinar a função efectora das células Tr1 cultivadas, a função supressora específica para o antígeno foi testada num teste típico de migração em poços (Fig. 17 e dados não apresentados). Ambos os clones apresentavam um efeito supressor Tr1 típico nas outras células presentes. A supressão foi devida à secreção de IL-10 e TGF- β tal como ilustrado pela utilização de anticorpos de bloqueio (não apresentado). Não se obteve supressão na ausência da estimulação com OVA (dados não apresentados). Obtiveram-se resultados semelhantes com diferentes dadores e diferentes clones Tr1 (dados não apresentados).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

<120> Obtenção de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou antigénio de alimentos a partir de uma população de PBMC ou de leucócitos

<130> D23177

<160> 25

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 708

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para OKT3-L

<400> 1

atggattttc	aagtgcagat	tttcagcttc	ctgctaata	gtgcctcagt	cataatatcc	60
agaggacaaa	ttgttctcac	ccagtctcca	gcaatcatgt	ctgcatctcc	aggggagaag	120
gtcaccatga	cctgcagtgc	cagctcaagt	gtaagttaca	tgaactggta	ccagcagaag	180
tcaggcacct	ccccaaaag	atggatttat	gacacatcca	aactggcttc	tggagtccct	240
gctcacttca	ggggcagtgg	gtctgggacc	tcttactctc	tcacaatcag	cggcatggag	300
gctgaagatg	ctgccactta	ttactgccag	cagtggagta	gtaaccatt	cacgttcggc	360
tcggggacaa	agttggaaat	aaaccgggct	gatactgcac	caactgtatc	catcttccca	420
ccatccagtg	agcagttaac	atctggaggt	gcctcagtcg	tgtgcttctt	gaacaacttc	480
taccccaaag	acatcaatgt	caagtgggag	attgatggca	gtgaacgaca	aaatggcgtc	540
ctgaacagtt	ggactgatca	ggacagcaaa	gacagcacct	acagcatgag	cagcaccctc	600
acgttgacca	aggacgagta	tgaacgacat	aacagctata	cctgtgaggc	cactcacaag	660
acatcaactt	caccatttgt	caagagcttc	aacaggaatg	agtgttag		708

<210> 2

<211> 1560

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para OKT3-H

<400> 2

atggaaaggc	actggatctt	tctactcctg	ttgtcagtaa	ctgcagggtg	ccactcccag	60
gtccagctgc	agcagttctg	ggctgaactg	gcaagacctg	gggcctcagt	gaagatgtcc	120
tgcaaggctt	ctggctacac	ctttactagg	tacacgatgc	actgggtaaa	acagaggcct	180
ggacagggtc	tggatggat	tggatacatt	aatcctagcc	gtggttatac	taattacaat	240
cagaagttca	aggacaaggc	cacattgact	acagacaaat	cctccagcac	agcctacatg	300
caactgagca	gcctgacatc	tgaggactct	gcagtctatt	actgtgcaag	atattatgat	360
gatcattact	gccttgacta	ctggggccaa	ggcaccactc	tcacagtctc	ctcagccaaa	420
acaacagccc	catcggtcta	lccactggcc	cctgtgtgtg	gagatacaac	tggctcctcg	480
gtgactctag	gatgcctggg	caagggttat	ttccctgagc	cagtgcacct	gacctggaac	540
tctggatccc	tgtccagtgg	tgtgcacacc	ttcccagctg	tcctgcagtc	tgacctctac	600
accctcagca	gctcagtgac	tgtaacctcg	agcaccctgg	ccagccagtc	catcacctgc	660
aatgtggccc	accgggcaag	cagcaccaag	gtggacaaga	aaattgagcc	cagagggcc	720
acaatcaagc	cctgtcctcc	atgcaaatgc	ccagcaccta	acctcttggg	tggaccatcc	780
gtcttcatct	tccctccaaa	gatcaaggat	gtactcatga	tctccctgag	ccccatagtc	840
acatgtgtgg	tgtgtgatgt	gagcgaggat	gacccagatg	tccagatcag	ctggtttgtg	900
aacaacgtgg	aagtacacac	agctcagaca	caaaccata	gagaggatta	caacagtact	960

```

ctccgggtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact ggatgagtgg caaggagtgc 1020
aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca gcgcccacgc agagaacccat ctcaaaaccc 1080
aaaggggtcag taagagctcc acagggtatat gtcttgccct caccagaaga agagatgact 1140
aagaaacagg tcaactctgac ctgcatgggc acagacttca tgccctgaaga catttacgtg 1200
gagtggacca acaacgggaa aacagagcta aactacaaga aactgaacc agtcctggac 1260
tctgatgggt cttacttcat gtacagcaag ctgagagtgg aaaagaaga ctgggtggaa 1320
agaaatagct actcctgttc agtgggtccac gagggtctgc acaatcacca cagactaag 1380
agcttctccc ggactccggg taaagaattc gctgtgggcc aggacacgca ggaggtcatc 1440
gtggtgccac actccttgcc ctttaagggt gtggtgatct cagccatcct ggccctggtg 1500
gtgctcacca tcatctccct tatcatccct atcatgcttt ggcagaaga gccacgttag 1560

```

<210> 3

<211> 867

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para CD80

<400> 3

```

atggggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacatg tttctgttga agagctggca 180
caactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cactagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctgggttga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggattccaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
agaagggaag gtgtacgccc tgtataa 867

```

<210> 4

<211> 990

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para CD86

<400> 4

```

atggatcccc agtgcaactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggtt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt cctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca ctttctctc tagagcttga ggaccctcag 720
cctcccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
atgggtttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840

```

aaatgtggaa	ccaacacaat	ggagagggaa	gagagtgaac	agaccaagaa	aagagaaaaa	900
atccatatac	ctgaaagatc	tgatgaagcc	cagcgtgttt	ttaaaagtcc	gaagacatct	960
tcatgcgaca	aaagtgatac	atgtttttta				990

<210> 5

<211> 462

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para IL2

<400> 5

atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcat	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
gcacctactt	caagttctac	aaagaaaaca	cagctacaac	tgagcattt	actgctggat	120
ttacagatga	ttttgaatgg	aattaataat	tacaagaatc	ccaaactcac	caggatgctc	180
acatttaagt	tttcatgcc	caagaaggcc	acagaactga	aacatcttca	gtgtctagaa	240
gaagaactca	aacctctgga	ggaagtgcta	aatttagctc	aaagcaaaaa	ctttcactta	300
agaccaggga	acttaatcag	caatatcaac	gtaatagtcc	tggaactaaa	gggatctgaa	360
acaacattca	tgtgtgaata	tgtgtgatgag	acagcaacca	ttgtagaatt	tctgaacaga	420
tgattacct	tttgtcaaa	catcatctca	acactgactt	ga		462

<210> 6

<211> 753

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para CD58 (LFA3)

<400> 6

atggttgctg	ggagcgacgc	ggggcgggcc	ctgggggtcc	tcagcgtggg	ctgcctgctg	60
cactgctttg	gtttcatcag	ctgtttttcc	caacaaatat	atggtgttgt	gtatgggaat	120
gtaactttcc	atgtaccaag	caatgtgcct	ttaaaagagg	tcctatggaa	aaaacaaaag	180
gataaagttg	cagaactgga	aaattctgaa	ttcagagctt	tctcatcttt	taaaaatagg	240
gtttattttg	acactgtgtc	aggtagcctc	actatctaca	acttaacatc	atcagatgaa	300
gatgagtatg	aaatggaatc	gccaaatat	actgatacca	tgaagttctt	tctttatgtg	360
cttgagtctc	ttccatctcc	cacactaact	tgtgcattga	ctaataggaag	cattgaagtc	420
caatgcgatga	taccagagca	ttacaacagc	catcgaggac	ttataatgta	ctcatgggat	480
tgtcctatgg	agcaatgtaa	acgtaactca	accagtatat	attttaagat	ggaaaatgat	540
cttcacaaaa	aaatacagtg	tactcttagc	aatccattat	ttaatacaac	atcatcaatc	600
attttgacaa	cctgtatccc	aagcagcggg	cattcaagac	acagatatgc	acttataccc	660
ataccattag	cagtaattac	aacatgtatt	gtgctgtata	tgaatgggat	tctgaaatgt	720
gacagaaaac	cagacagaac	caactccaat	tga			753

<210> 7

<211> 462

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para IL4

<400> 7

atgggtctca	cctcccaact	gcttccccct	ctgttcttcc	tgctagcatg	tgccggcaac	60
tttgtccacg	gacacaagtg	cgatatcacc	ttacaggaga	tcatacaaac	tttgaacagc	120
ctcacagagc	agaagactct	gtgcaccgag	ttgaccgtaa	cagacatctt	tgctgcctcc	180
aagaacacaa	ctgagaagga	aaccttctgc	agggctgcga	ctgtgctccg	gcagttctac	240

```

agccaccatg agaaggacac tcgctgcctg ggtgcgactg cacagcagtt ccacaggcac 300
aagcagctga tccgattcct gaaacggctc gacaggaacc tctggggcct ggcgggcttg 360
aattcctgtc ctgtgaagga agccaaccag agtacgttgg aaaacttctt ggaaaggcta 420
aagacgatca tgagagagaa atattcaaa gtttcgagct ga 462

```

<210> 8

<211> 441

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Sequência de ácido nucleico que codifica para IL13

<400> 8

```

atgcatccgc tcttcaatcc tctcctgttg gcactgggccc tcatggcgct tttgttgacc 60
acggtcattg ctctcacttg ccttggcggc tttgcctccc caggccctgt gcctccctct 120
acagccctca gggagctcat tgaggagctg gtcaacatca ccagaacca gaaggctccg 180
ctctgcaatg gcagcatggg atggagcatc aacctgacag ctggcatgta ctgtgcagcc 240
ctggaatccc tgatcaacgt gtcaggctgc agtgccatcg agaagacca gaggatgctg 300
agcggattct gccgcacaa ggtctcagct gggcagtttt ccagcttgca tgtccgagac 360
accaaaatcg aggtggccca gtttgtaaag gacctgctct tacatttaaa gaaacttttt 420
cgcgagggac agttcaactg a 441

```

<210> 9

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 9

```

atgcggatcc atggattttc aagtgcag 28

```

<210> 10

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 10

```

atgcgaattc ctaacactca ttctgttg 29

```

<210> 11

<211> 37

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 11

```

atgcccgcgg ggtacccact gaaaactctg actcaac 37

```

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 12
actggacagg gatccagagt tc 22

<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 13
gaactctgga tccctgtcca gtg 23

<210> 14
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 14
atgcgaattc tttacccgga gtccgggaga agctc 35

<210> 15
<211> 31
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 15
atgcgaattc gctgtgggcc aggacacgca g 31

<210> 16
<211> 40
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 16
atgcgggccc aagcttctaa cgtggcttct tctgccaaag 40

<210> 17

<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 17
atgcg gatcc atgtacagga tgcaactcct 30

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 18
atgcgaattc tcaagtcagt gttgagatga 30

<210> 19
<211> 31
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 19
atgctggatc catggttgct gggagcgcgc c 31

<210> 20
<211> 31
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 20
atgctaagct ttcaattgga gttggttctg t 31

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético

<400> 21
atgcg gatcc atgggtctca cctcccaact 30

<210> 22
<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético

<400> 22

atgcaagctt tcagctcgaa cactttgaat 30

<210> 23

<211> 386

<212> PRT

<213> Gallus sp.

<220>

<223> Ovalbumina de ovo de Galinha

<400> 23

Met	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ala	Ser	Met	Glu	Phe	Cys	Phe	Asp	Val	Phe	1	5	10	15
Lys	Glu	Leu	Lys	Val	His	His	Ala	Asn	Glu	Asn	Ile	Phe	Tyr	Cys	Pro	20	25	30	
Ile	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Leu	Ala	Met	Val	Tyr	Leu	Gly	Ala	Lys	Asp	35	40	45	
Ser	Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Asn	Lys	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Lys	Leu	Pro	50	55	60	
Gly	Phe	Gly	Asp	Ser	Ile	Glu	Ala	Gln	Cys	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Val	65	70	75	80
His	Ser	Ser	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Asn	Gln	Ile	Thr	Lys	Pro	Asn	Asp	85	90	95	
Val	Tyr	Ser	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr	Ala	Glu	Glu	Arg	Tyr	100	105	110	
Pro	Ile	Leu	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gln	Cys	Val	Lys	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gly	115	120	125	
Gly	Leu	Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Gln	Thr	Ala	Ala	Asp	Gln	Ala	Arg	Glu	130	135	140	
Leu	Ile	Asn	Ser	Trp	Val	Glu	Ser	Gln	Thr	Asn	Gly	Ile	Ile	Arg	Asn	145	150	155	160
Val	Leu	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Met	Val	Leu	Val	165	170	175	
Asn	Ala	Ile	Val	Phe	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Glu	180	185	190	
Asp	Thr	Gln	Ala	Met	Pro	Phe	Arg	Val	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Lys	Pro	195	200	205	
Val	Gln	Met	Met	Tyr	Gln	Ile	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Ser	Met	Ala	210	215	220	

Ser Glu Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met
 225 230 235 240
 Ser Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu
 245 250 255
 Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn
 260 265 270
 Val Met Glu Glu Arg Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met
 275 280 285
 Glu Glu Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr
 290 295 300
 Asp Val Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu
 305 310 315 320
 Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn
 325 330 335
 Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala
 340 345 350
 Ala Ser Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys
 355 360 365
 Ile Lys His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val
 370 375 380
 Ser Pro
 385

<210> 24
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<220>
 <223> alfa Si-Caseína Bovina

<400> 24
 Met Lys Leu Leu Ile Leu Thr Cys Leu Val Ala Val Ala Leu Ala Arg
 1 5 10 15
 Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn
 20 25 30
 Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly
 35 40 45
 Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu Ser Thr
 50 55 60
 Glu Asp Gln Ala Met Glu Asp Ile Lys Gln Met Glu Ala Glu Ser Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His Ile

- 73 -

```
<210> 25
<211> 224
<212> PRT
<213> Bos taurus
```

<220>
<223> Beta-caseína bovina

<400> 25

Met	Lys	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Arg
1				5					10					15	
Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Val	Glu	Ser	Leu	Ser
			20					25					30		
Ser	Ser	Glu	Glu	Ser	Ile	Thr	Arg	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Phe
		35					40					45			
Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln	Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile
	50					55					60				
His	Pro	Phe	Ala	Gln	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro
65					70					75					80
Ile	His	Asn	Ser	Leu	Pro	Gln	Asn	Ile	Pro	Pro	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro
				85					90					95	
Val	Val	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro	Glu	Val	Met	Gly	Val	Ser	Lys
			100					105					110		
Val	Lys	Glu	Ala	Met	Ala	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Pro	Phe	Pro	Lys
		115					120					125			

Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu Ser Gln Ser Leu Thr Leu Thr Asp
130 135 140

Val Glu Asn Leu His Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ser Trp Met His
145 150 155 160

Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro Pro Gln Ser
165 170 175

Val Leu Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val Pro Gln Lys Ala
180 185 190

Val Pro Tyr Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr
195 200 205

Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg Gly Pro Phe Pro Ile Ile Val
210 215 220

Lisboa, 14 de Setembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Um método *in vitro* para a obtenção de uma população de células Tr1 específicas para um auto-antigénio ou antigénio de alimentos a partir de uma população de leucócitos ou uma população de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), compreendendo o referido método:

1) estimular a população de PBMCs ou de leucócitos com o auto-antigénio ou antigénio de alimentos,

2) recuperar a população Tr1 específica para o auto-antigénio ou antigénio de alimentos da população de células estimuladas,

3) expandir a população Tr1 específica para o antigénio recuperada no passo (2) num meio de cultura Mp,

em que o referido passo de expansão compreende:

a) cultivar a uma temperatura T1 num meio de cultura Mf, células de matriz celular capazes de expressar os factores do grupo (A) compreendendo:

- um anticorpo anti-CD3 modificado, em que a modificação do anticorpo anti-CD3 consiste na substituição do domínio intracitoplasmático anti-CD3 da cadeia pesada anti-CD3 com um domínio transmembranar, sendo o referido anticorpo anti-CD3 ancorado à membrana celular das células da matriz celular e sendo susceptíveis de interagir com o complexo proteico CD3/TCR das células T, ou uma variante daqueles,

- as proteínas CD80 ou CD86, preferentemente a proteína CD80, ancorada à membrana celular das células de matriz

celular, que é susceptível de interagir com a proteína CD28 das células T, ou uma sua variante, e

- a proteína CD58 ancorada à membrana celular das células da matriz celular, que é susceptível de interagir com a proteína CD2 das células Tr1, ou uma sua variante,

- IL-2 secretado pelas células da matriz celular, que é susceptível de interagir com o receptor IL-2 das células Tr1, ou uma sua variante, e

- uma interleucina seleccionada de IL-4 ou interleucina 13 (IL-13), preferentemente IL-4, sendo a referida interleucina secretada pelas células da matriz celular e sendo susceptível de interagir com o receptor IL-4 das células Tr1,

permitindo tal T1 a proliferação das referidas células de matriz celular,

b) contactar as células da matriz celular obtidas no passo (a) separadas ou não do seu meio de cultura Mf, com a população de células Tr1 específicas para o antigénio contidas no meio de cultura Mp, em que o referido meio de cultura Mp não contém inicialmente o referido grupo (A) de factores de modo a obter uma mistura contendo a população de células Tr1 específicas para o antigénio, células da matriz celular e o meio de cultura Mp,

c) cultivar a mistura obtida no passo (b), contendo os factores do grupo (A) que são expressos pelas células de matriz celular no meio de cultura Mp, em que o referido passo (c) de cultivo é levado a cabo a uma temperatura T2 que é pelo menos cerca de 35°C, tal que:

- a população de células Tr1 específicas para o antígeno prolifera, e
 - as células da matriz celular não proliferam,
- e em que a população de células Tr1 específicas para o antígeno é expandida,
- d) recuperação da população de células Tr1 específicas para o antígeno assim expandida.

2. O método da reivindicação 1, caracterizado pela população de células Tr1 específicas para o auto-antígeno e o antígeno de alimentos ser obtida de uma população PBMC.

3. O método da reivindicação 1 ou 2, caracterizado pela população de PBMC ou leucócitos ser reestimulada pelo menos uma vez com o mesmo antígeno após o passo (1), na presença de interleucina-2 (IL-2) e pelo menos uma interleucina seleccionada de interleucina-4 (IL-4) ou interleucina-13 (IL-13).

4. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo auto-antígeno ou antígeno de alimento ser um antígeno recombinante ou sintetizado.

5. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo antígeno de alimentos ser seleccionado de ovalbumina, caseína, proteína de soja, seus fragmentos, variantes ou misturas.

6. O método da reivindicação 5, caracterizado pelo antigénio de alimentos ser seleccionado de ovalbumina do ovo da galinha de sequência SEQ ID N°23,, alfa S1-caseína bovina de sequência SEQ ID N°24, beta-caseína bovina de sequência SEQ ID N°25, ou sequências com pelo menos 70% de identidade com uma das sequências SEQ ID N°23, SEQ ID N°24 e SEQ ID N°25.

7. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo auto-antigénio ser seleccionado da insulina, proteína básica da mielina, seus fragmentos, variantes ou misturas.

8. O método de qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizado pela população PBMC estimulada no passo (1) conter de $0,01 \times 10^6$ a 100×10^6 células/mL, preferentemente de 10^6 a 2×10^6 células/mL.

9. O método da reivindicação 8, caracterizado pelo auto-antigénio ou antigénio de alimento utilizado para estimulação da população de PBMC no passo (1) estar numa forma solúvel de 0,1 µg/mL a 5 mg/mL, preferentemente de 1 a 2000 µg/mL.

10. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pela população de PBMC ou de leucócitos ser incubada, antes da estimulação no passo (1), com um marcador fluorescente da divisão celular que permite determinar, por citofluorometria, que quando a intensidade

de fluorescência da população de células estimulada é pelo menos duas vezes inferior à intensidade de fluorescência da população PBMC ou de leucócitos, que ocorreu divisão celular na referida população de células estimuladas, e que a referida população de células estimuladas que é recuperada no passo (2) compreende a população de células Tr1 específica para o antígeno.

11. O método da reivindicação 10, caracterizado pelo marcador fluorescente da divisão celular ser o marcador éster carboxifluoresceína diacetato de succinimídilo (CFSE), o marcador diacetato do ácido carboxílico verde oregon 488 (Carboxi-DFFDA SE) ou o marcador PKH26.

12. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pela população de células Tr1 específicas para o antígeno ser recuperada no passo (2) por citofluorometria utilizando anticorpos marcados com fluorescência direccionados contra proteínas presentes à superfície das células da referida população de células Tr1 específicas para o antígeno.

13. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pela população de células Tr1 específicas para o antígeno ser recuperada no passo (2) por uma técnica de clonagem, tal como vantajosamente pela diluição limite.

14. O método de qualquer uma das reivindicações

1 a 13, caracterizado pela população de PBMC ou de leucócitos ser uma população humana.

15. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelas células de matriz celular morrerem durante o passo (c).

16. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado por no passo (d) os fragmentos da membrana celular das células de matriz celular que resultam da morte das referidas células são eliminados.

17. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelas células de matriz celular serem células recombinantes e contêm ácidos nucleicos heterólogos que codificam para os factores do grupo (A).

18. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelas células de matriz celular não terem qualquer molécula intrínseca do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe I e/ou II à sua superfície.

19. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado por no passo (b) as células de matriz celular serem limpas do seu meio de cultura Mf.

20. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelas células de matriz celular serem

células de matriz celular de insecto, sendo T1 inferior a T2.

21. O método da reivindicação 20, caracterizado pelas células de matriz celular de insecto serem da linha celular S2 de drosófila depositada em 25 de Março de 2005 na National Collection of Micro-organisms Cultures (CNCM) sob a designação 1-3407.

22. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo meio de cultura Mp é um meio de cultura sem soro.

23. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo meio de cultura Mf é um meio de cultura sem soro.

24. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo domínio transmembranar que substitui o domínio intracitoplasmático da cadeia pesada do anticorpo anti-CD3 ser o domínio transmembranar do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF).

25. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelos factores do grupo (A) serem de origem humana.

26. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pela cadeia leve do anticorpo

modificado anti-CD3 ser codificado por um ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°1, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID N°1, e em que a cadeia pesada do anticorpo anti-CD3 modificado ser codificada pela sequência de ácido nucleico heterólogo de SEQ ID N°2, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°2.

27. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pela proteína CD80 ser codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°3, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°3.

28. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pela proteína CD86 ser codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°4, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°4.

29. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pela proteína CD58 ser codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°6, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°6.

30. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado por IL-2 ser codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°5, ou qualquer

ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°5.

31. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado por IL-4 ser codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°7, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°7.

32. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 31, caracterizado por IL-13 ser codificada pelo ácido nucleico heterólogo de sequência SEQ ID N°8, ou qualquer ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade com SEQ ID N°8.

33. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pela população de células Tr1 assim expandida ser recuperada no passo (d) após se cultivar a população de células Tr1 específicas para um antígeno no passo (c) durante pelo menos 12 horas, com vantagem 24 horas.

Lisboa, 14 de Setembro de 2011

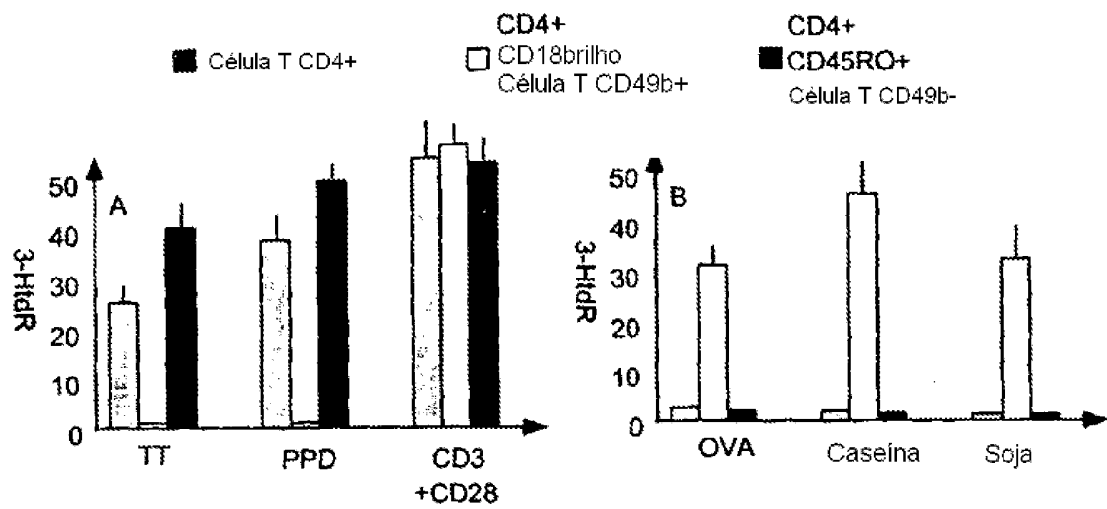


Figura 1

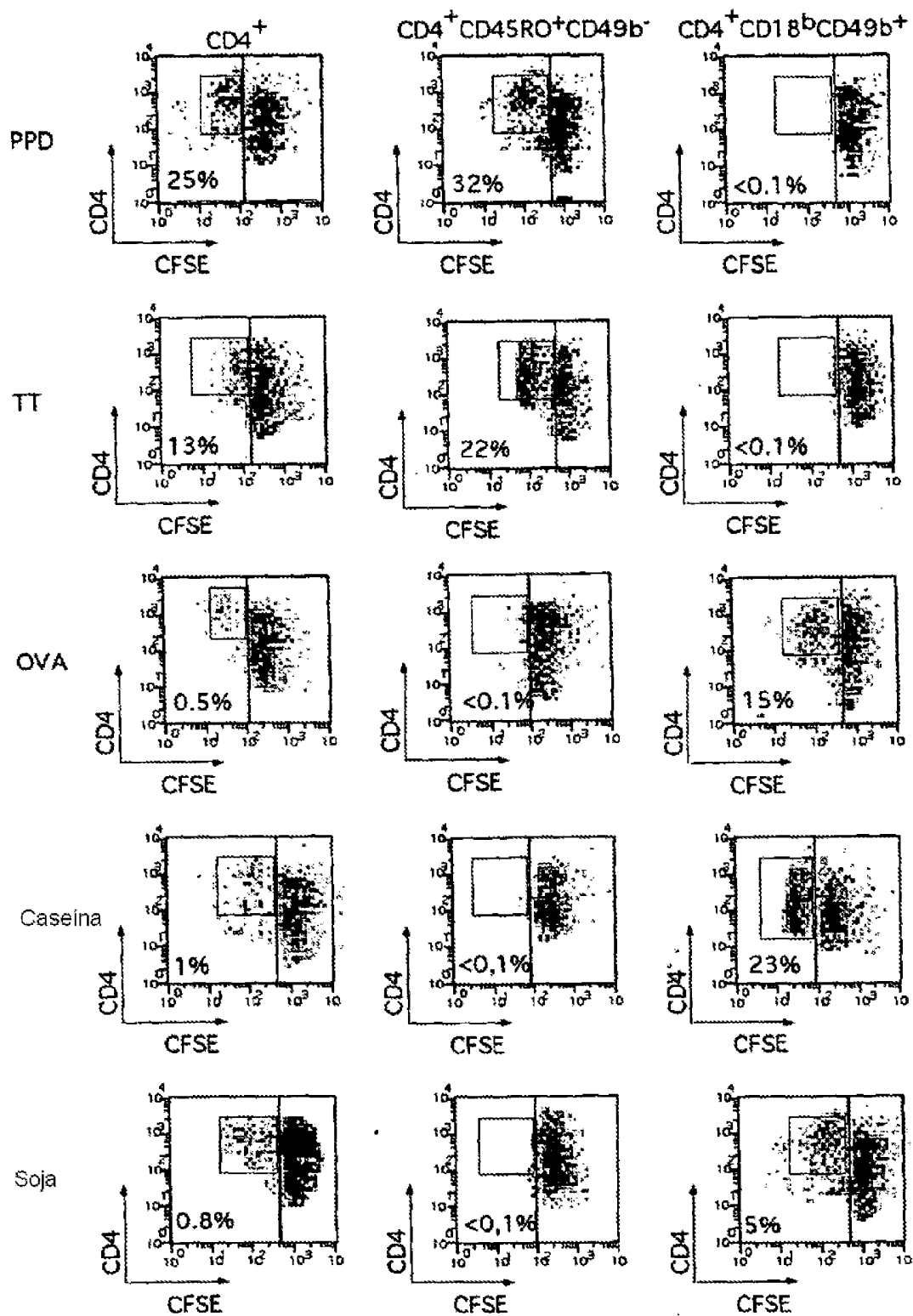


Figura 2

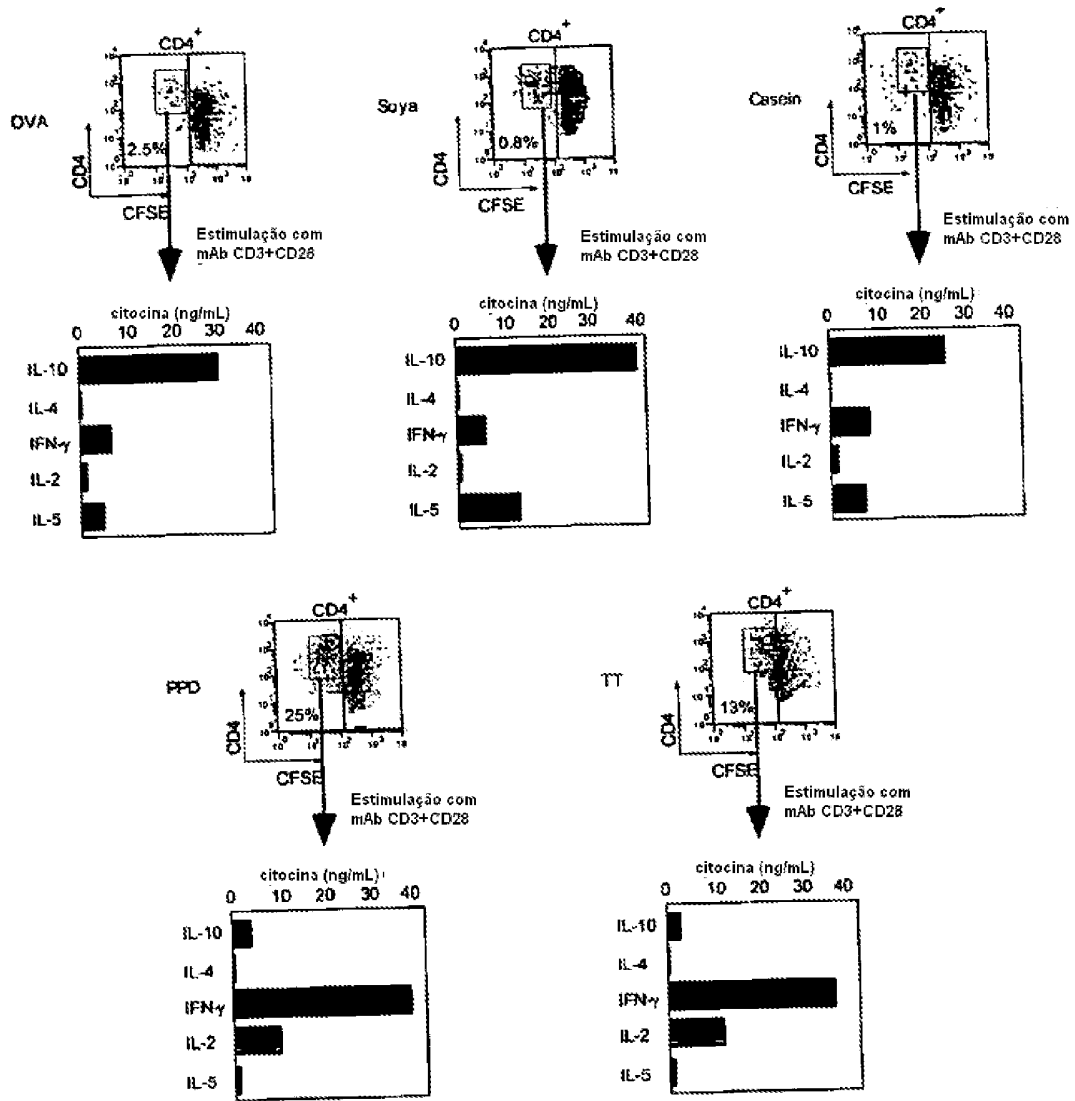


Figura 3

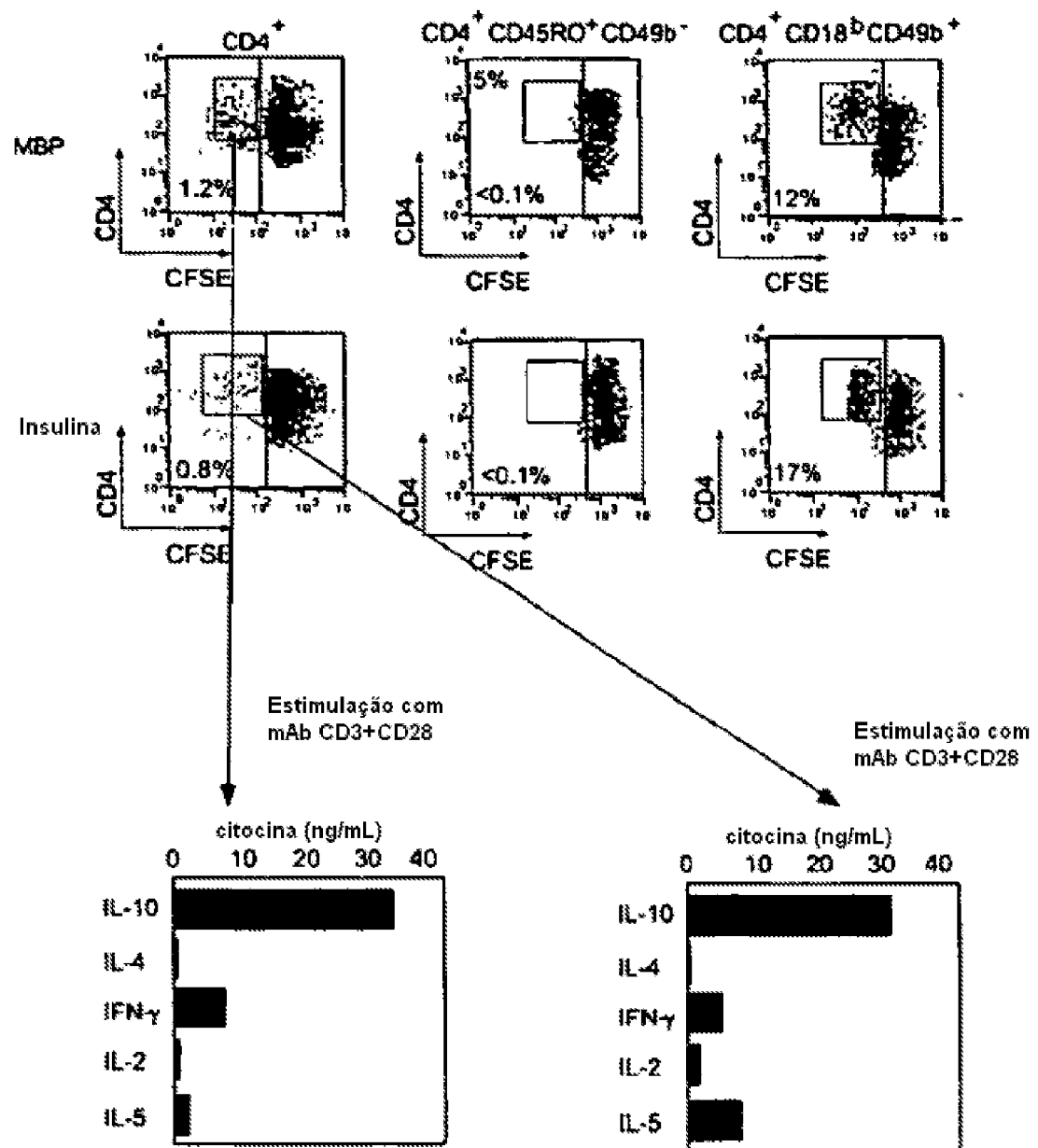


Figura 4

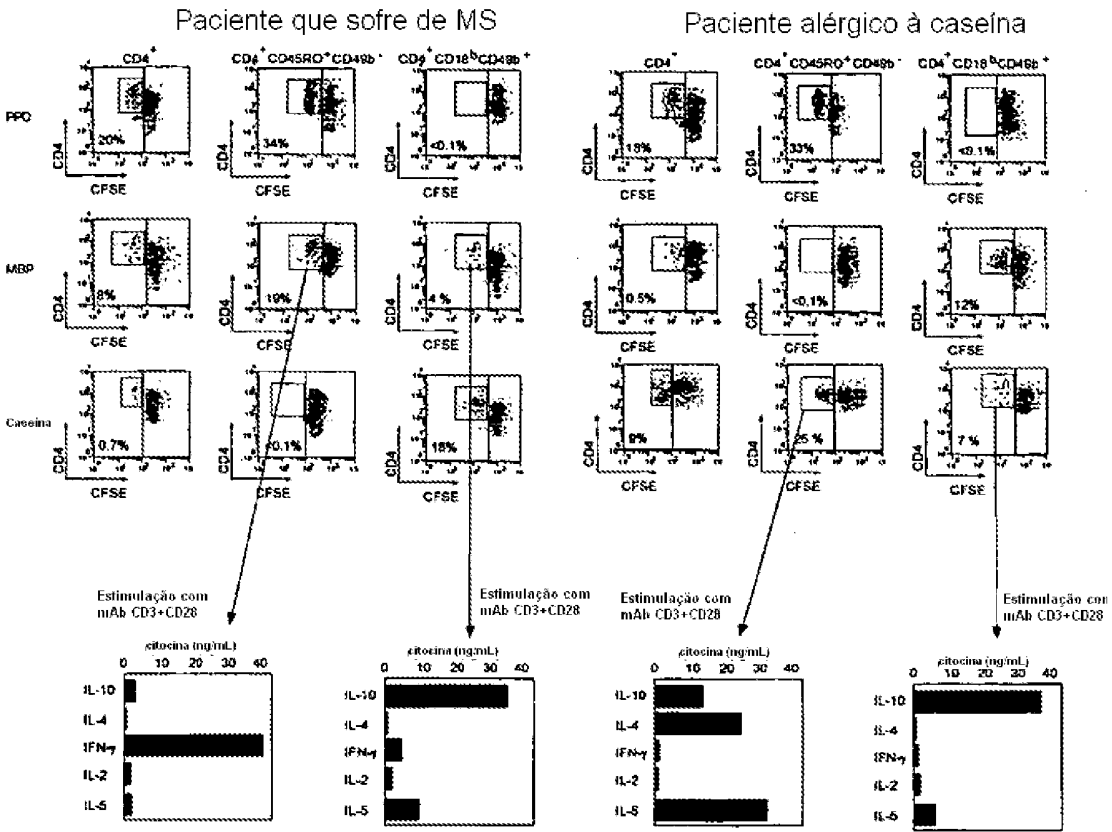


Figura 5

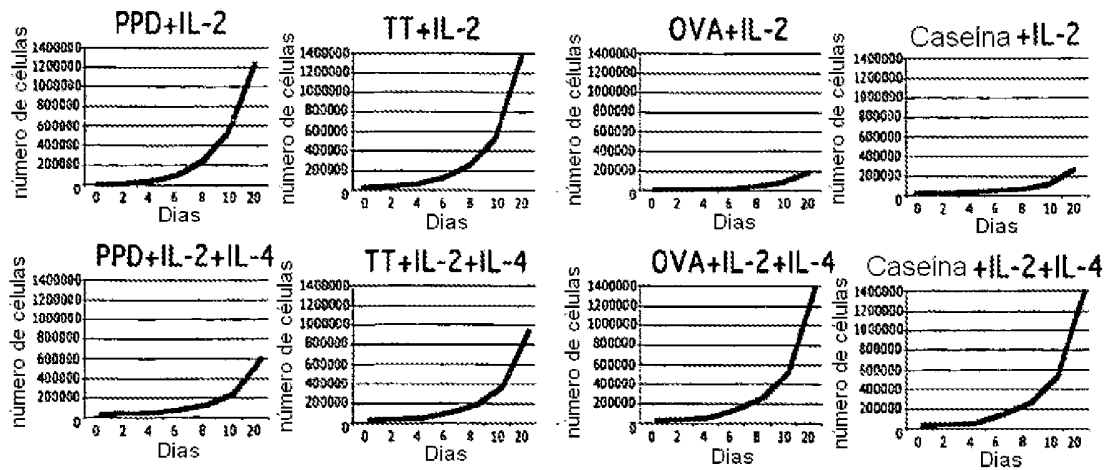


Figura 6

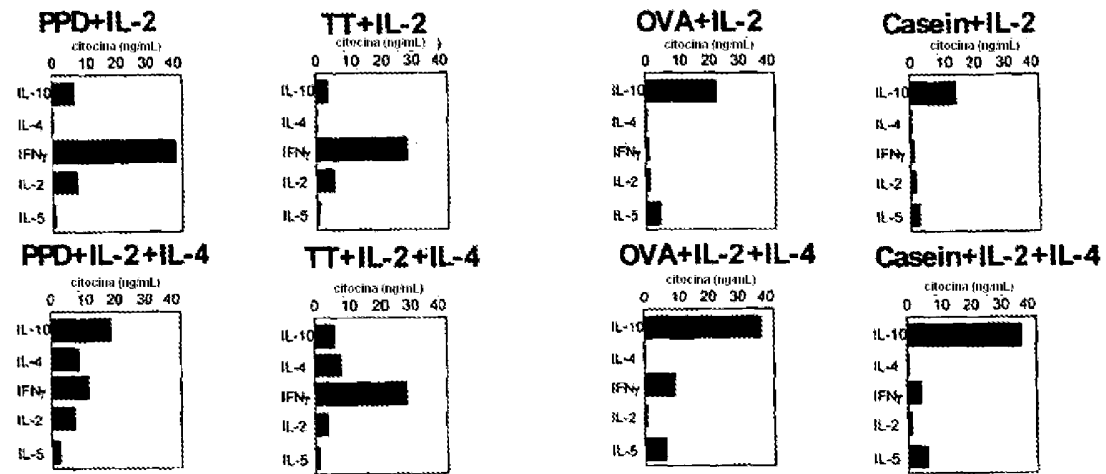


Figura 7

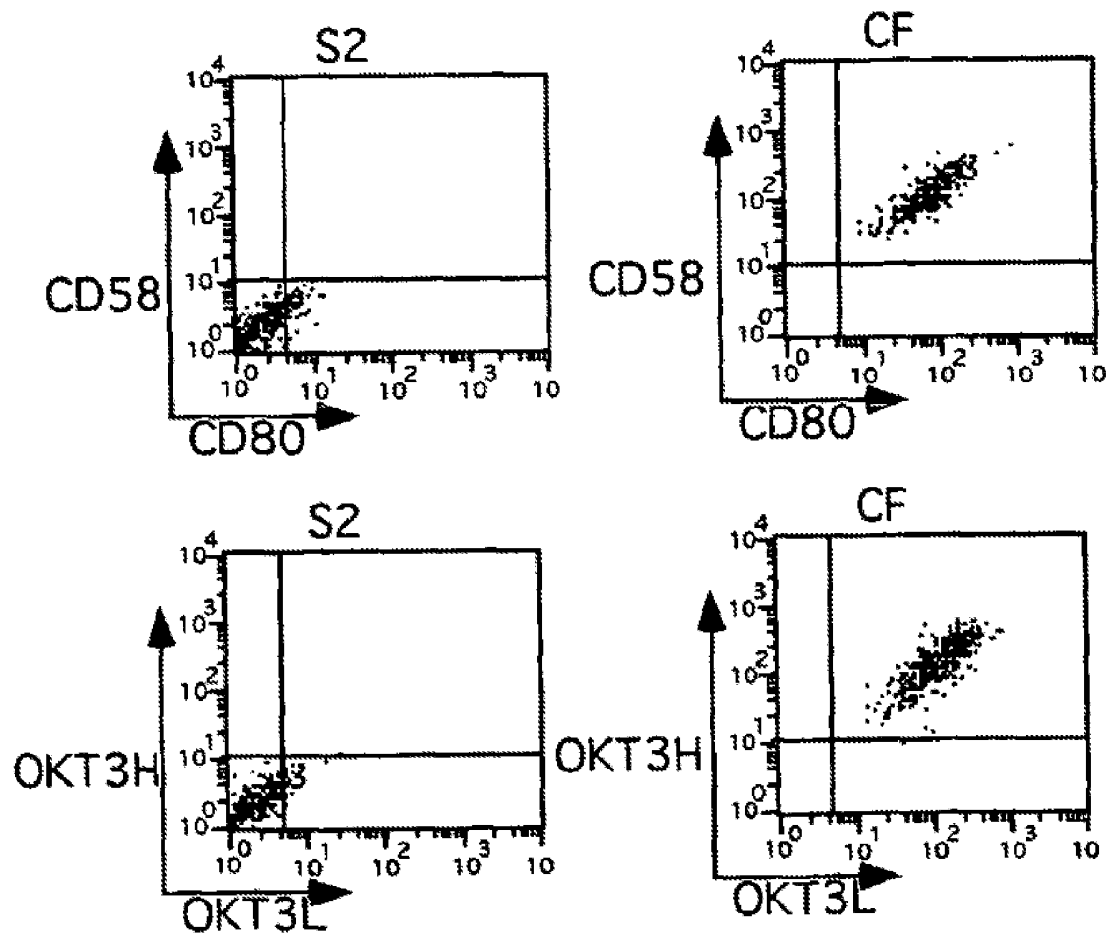


Figura 8

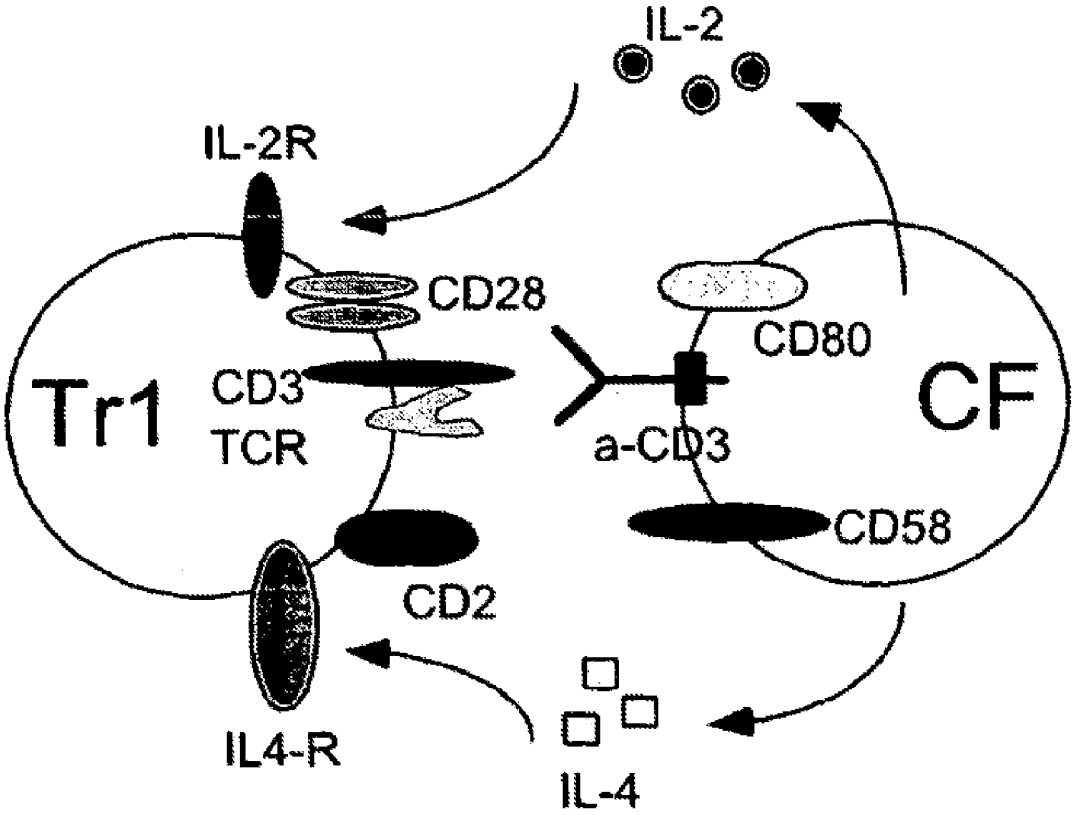


Figura 9

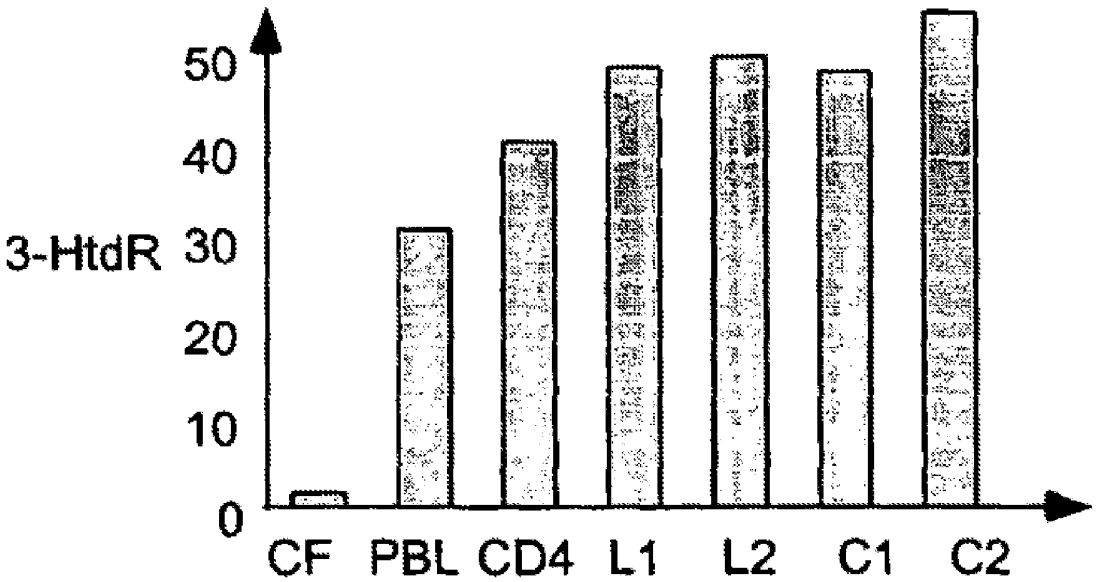


Figura 10

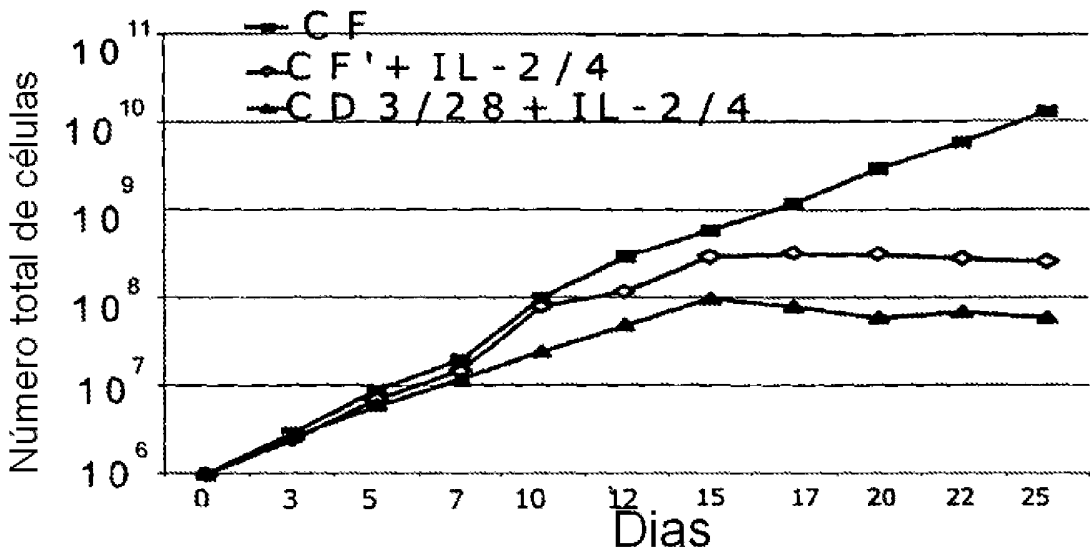


Figura 11

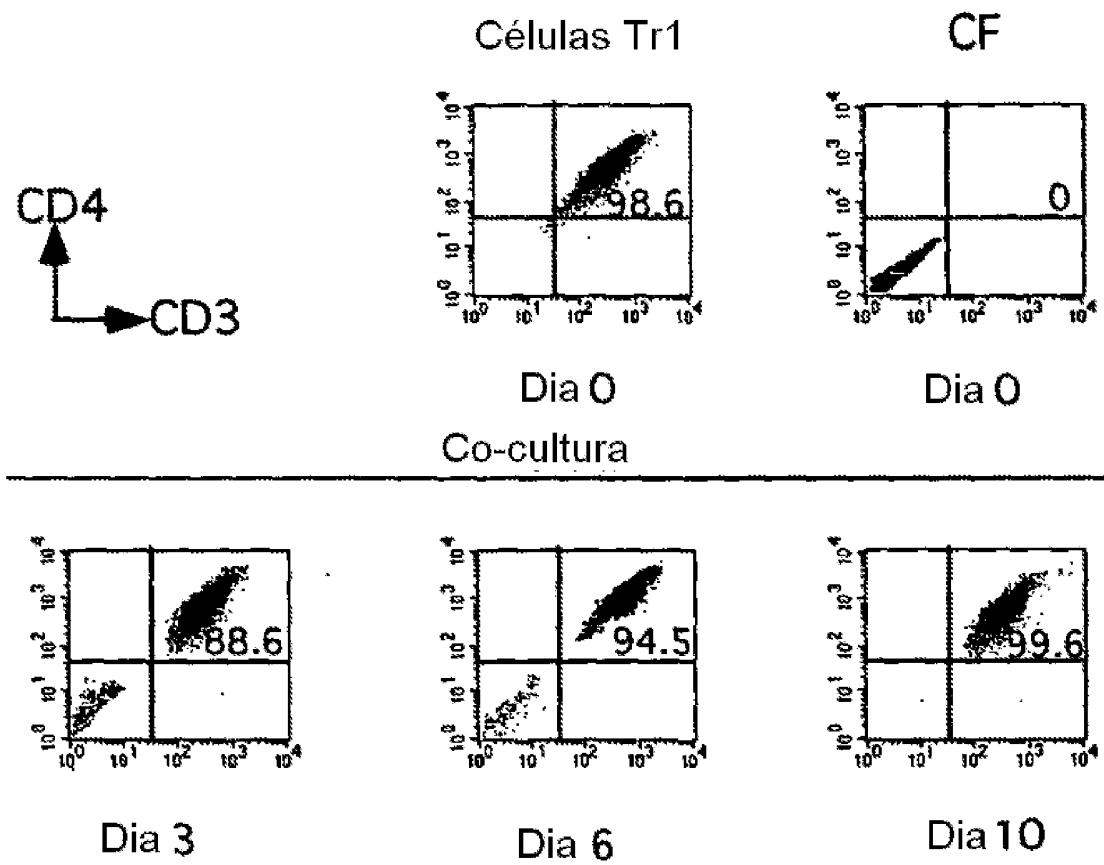


Figura 12

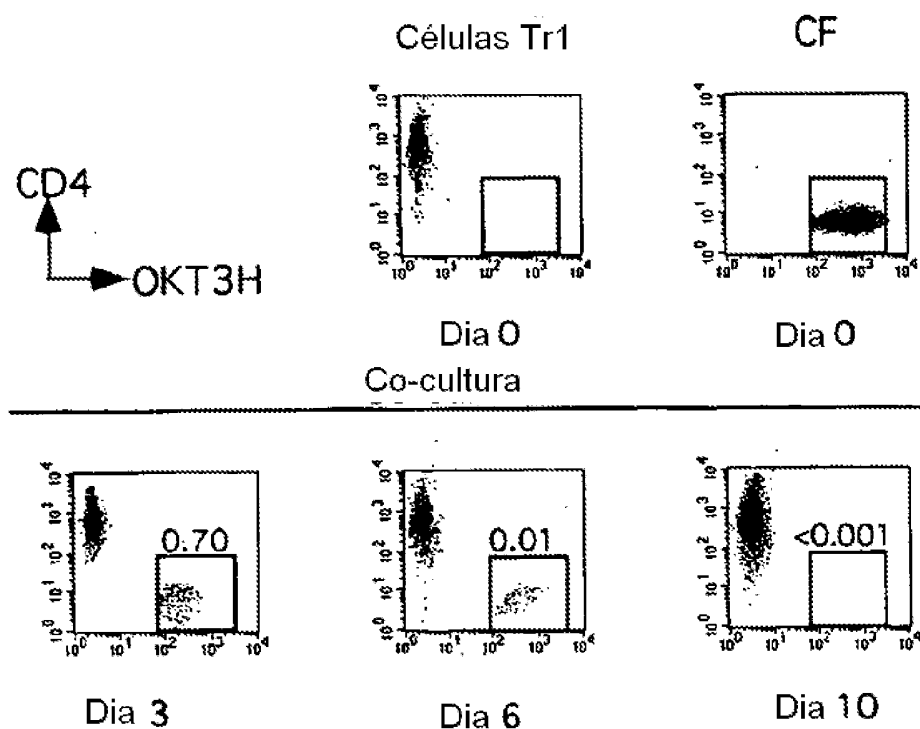


Figura 13

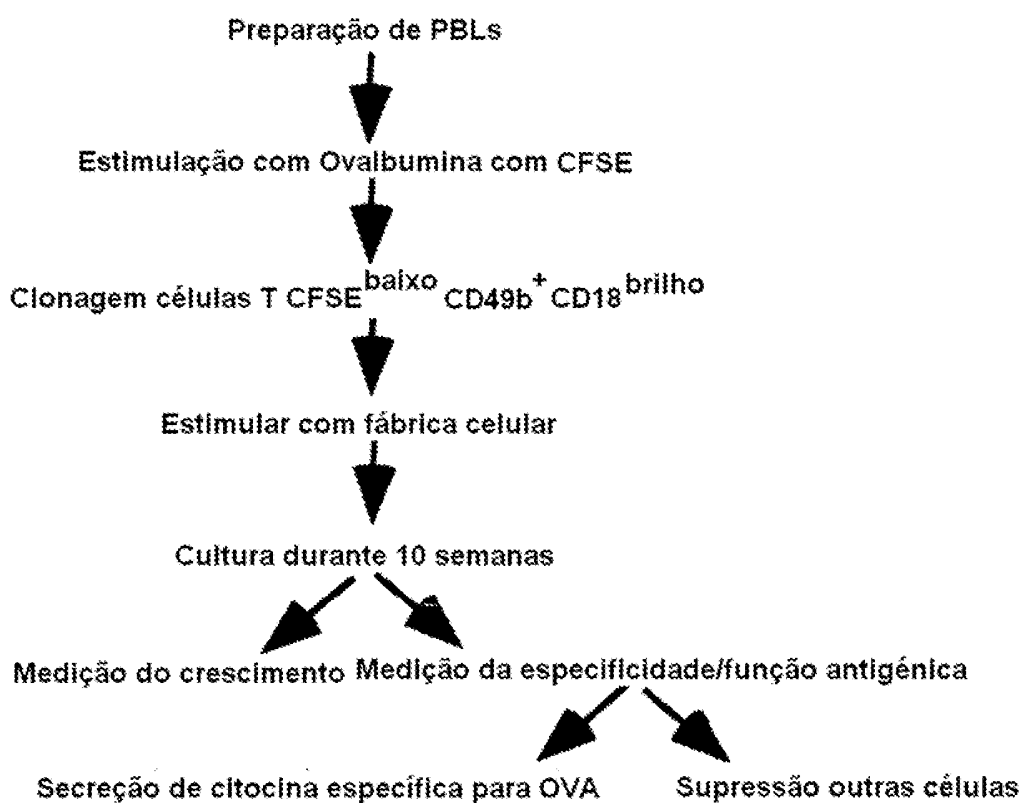


Figura 14

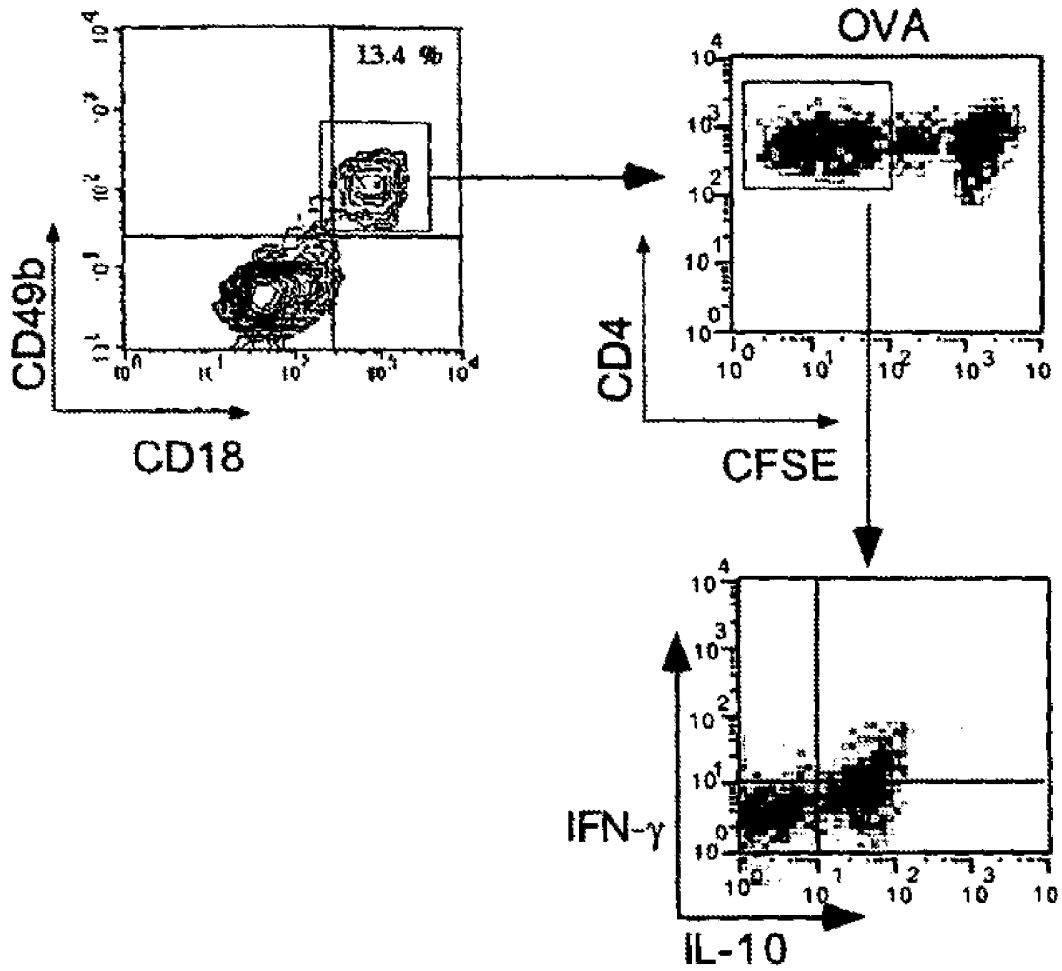


Figura 15

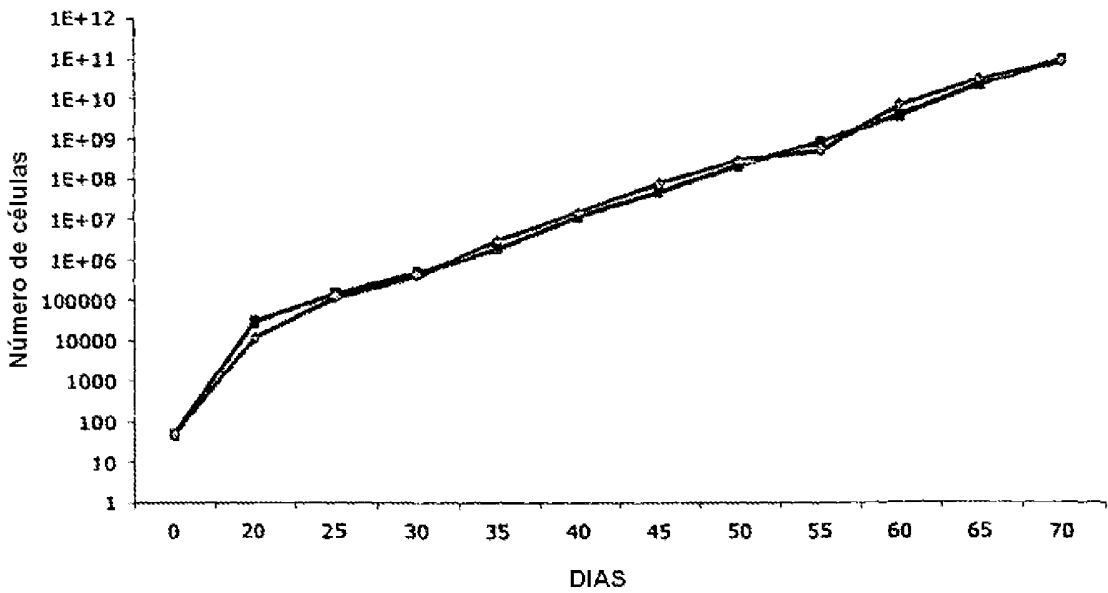


Figura 16

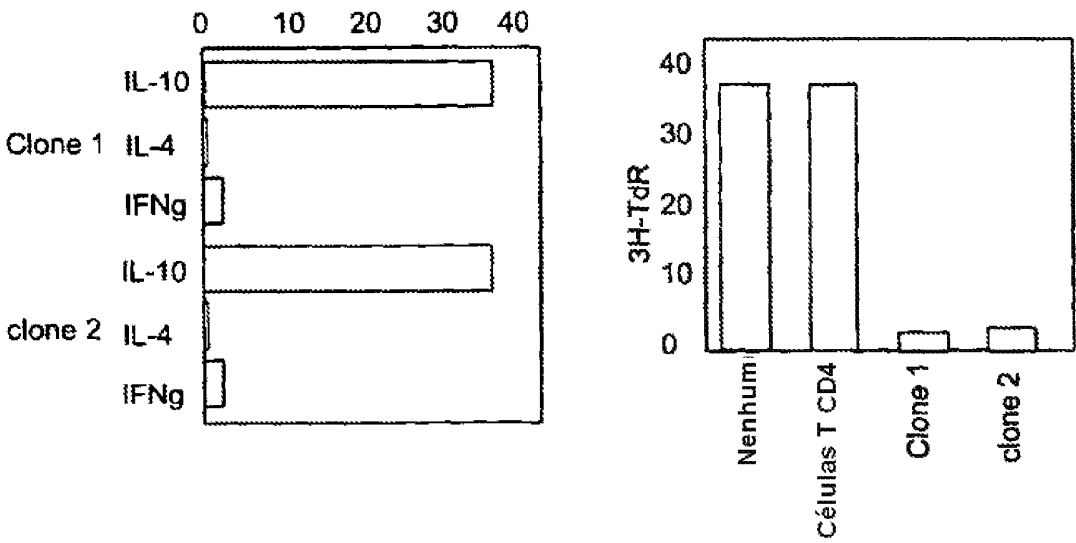


Figura 17

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 02090357 A
- WO 2005000344 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- H. Groux et al. *Nature*, 1997, vol. 389, 737-742
- Foussat et al. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, 5018-5026
- Mallat et al. *Circulation*, 2003, vol. 108, 1232-1237
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989
- Smith et al. *Mol. Cell Biol.*, 1983, vol. 3, 2156-2165
- Lucklow, V. A.; Summers, M. D. *Virology*, 1989, vol. 170, 31-38
- Schneider. *J Embryol Exp Morphol*, 1972, vol. 27, 353
- Smith ; Waterman. *Ad. App. Math.*, 1981, vol. 2, 482
- Neddleman ; Wunsch. *J. Mol. Biol.*, 1979, vol. 48, 443
- Pearson ; Lipman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, vol. 85, 2444
- Groux et al. *Nature*, 1997
- Chung ; Keller. *Mol Cell Biol.*, December 1990, vol. 10 (12), 6172-80
- Chung ; Keller. *Mol Cell Biol.*, January 1990, vol. 10 (1), 206-16
- Kung et al. *Science*, 19 October 1979, vol. 206 (4416), 347