

(11) Número de Publicação: **PT 1956080 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 5/07** (2011.01) **G01N 33/569** (2011.01)  
**A61K 48/00** (2011.01)

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

(22) Data de pedido: <b>2006.08.03</b>	(73) Titular(es): <b>FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR</b> <b>VIA OLGETTINA, 60 20132 MILANO</b>	IT
(30) Prioridade(s): <b>2005.08.08 US 706503 P</b>		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.08.13</b>	(72) Inventor(es): <b>MARIA CHIARA BONINI</b> <b>ATTILIO BONDANZA</b>	IT IT
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.09.28</b> <b>249/2011</b>	(74) Mandatário: <b>LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO</b> <b>PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598</b> <b>CHARNECA DA CAPARICA</b>	PT

(54) Epígrafe: **USO DE IL-7 E IL-15 PARA A MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE LINFÓCITOS T DA MEMÓRIA**

(57) Resumo:

É DESCRITO UM MÉTODO IN VITRO PARA A OBTENÇÃO DE UMA VARIEDADE GENETICAMENTE MODIFICADA DE POPULAÇÃO DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA. TAMBÉM SÃO DIVULGADOS OS USOS DAS CÉLULAS ASSIM OBTIDAS.

## RESUMO

### USO DE IL-7 E IL-15 PARA A MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE LINFÓCITOS T DA MEMÓRIA

É descrito um método *in vitro* para a obtenção de uma variedade geneticamente modificada de população de células T de memória.

Também são divulgados os usos das células assim obtidas.

## DESCRIÇÃO

### USO DE IL-7 E IL-15 PARA A MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE LINFÓCITOS T DA MEMÓRIA

#### INTRODUÇÃO

O repertório de antígeno (Ag) específico de células T é fortemente regulado por mecanismos homeostáticos que asseguram a sua persistência e funcionalidade, mesmo na ausência do antígeno. Após o encontro Ag, as células T ingênuas sofrem uma expansão clonal rápida e diferenciada em células T efectoras (1, 2). A vida útil das células T efectoras é limitada pela morte celular, que pode ocorrer após mais encontros Ag (morte celular induzida por activação) ou devido à falta de factores de sobrevivência. Durante uma resposta imune, as células T da memória também são geradas. As células T da memória podem sobreviver ao longo da vida, proporcionando assim uma protecção duradoura contra o chamamento de patógenos (3). As frequências dos antígenos específicos das células T da memória na maioria das amostras biológicas permanecem, porém, abaixo do limite de detecção de coloração de tetrâmero Ag/MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e os ensaios funcionais, tais como coloração de citocinas intracelulares ELISpot (4, 5). Células T CD4<sup>+</sup> Ag específicas em particular, são na sua maioria indetectáveis *ex vivo* e, portanto, analisadas após várias rondas de expansão de células T guiadas por Ag *in vitro*. A re-estimulação *in vitro*, no entanto, é susceptível de favorecer a diferenciação terminal das células, prejudicando a sua sobrevivência a longo prazo. Como consequência, as células T re-estimuladas *in vitro* Ag também podem exibir um fenótipo não representativo na totalidade do que o encontrado *in vivo*. Por estas razões

estratégias alternativas para melhorar a detecção ex vivo de células T Ag específicas são necessárias para melhor caracterizar as respostas imunes em curso, e avaliar a imunocompetência de pacientes com distúrbios relacionados com o sistema imunológico.

Vários estudos têm mostrado que o estabelecimento e a manutenção da memória das células T são controlados por células associadas (complexo Ag/MHC) e sinais de accionamento solúveis (citocinas) (3, 6, 7). O desencadeamento da TCR por auto e não auto complexos Ag/MHC regula a transição do ingénuo para as células de memória, a sobrevivência e a proliferação das células de memória. O tanque de linfócitos de memória é, possivelmente, altamente heterogéneo. Recentemente, dois tipos de células T da memória foram identificados: células T efectoras da memória (CD45RA-CCR7, CD62L) e células T da memória central, que são células negativas CD45RA caracterizadas pela expressão de CCR7 e CD62L, duas moléculas necessárias para a localização em áreas de células T de órgãos linfóides secundários. Com a estimulação antigénica, as células T da memória central produzem baixos níveis de citocinas efectoras, tais como IL-4 e IFN- $\gamma$ , mas altos níveis de IL-2, que é capaz de sustentar a sua rápida e consistente proliferação. Após o encontro antígeno as células T da memória central T sofrem: 1) Proliferação, resultando num processo auto-regenerativo, visando aumentar o seu tanque, e 2) diferenciação, resultando na geração de células T efectoras da memória, que são caracterizadas por um baixo potencial proliferativo, mas são capazes de migrar para os tecidos não-linfóides inflamados e mediar a fase efectora da resposta imune (8). A retirada de Ag é fundamental para evitar a estimulação excessiva TCR e a morte celular

induzida por activação, e para a geração de células T de memória central. A homeostase de células T apropriada é assegurada por citocinas firmemente regulando a proliferação, sobrevivência e apoptose de linfócitos T humanos e murinos. Entre os factores solúveis da cadeia  $\gamma$  comum de ligação de citocinas tais como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 promovem a sobrevivência celular e proliferação homeostática (2). Em particular, IL-2 sustenta tanto a proliferação de células T e apoptose no encontro antígeno. A TCR bem como sinais de controlo de proliferação e sobrevivência das células ingénuas e de memória (7, 9-14) gerados por IL-7. Na ausência de compromisso TCR, a IL-7 torna as células ingénuas maduras humanas e células T CD4<sup>+</sup> da memória menos susceptíveis à morte celular induzida por Fas (15). Além disso, por induzir a sobre-regulação de Bcl-2 favorece a transição de células T GD4<sup>+</sup> Ag experientes para as células de memória em repouso (9, 11). Finalmente, IL-15, combina uma actividade anti-apoptótica com um efeito consistente na promoção da proliferação de células T ingénuas e de memória (16). Por estas razões, a cadeia  $\gamma$  comum de ligação de citocinas tem sido previamente usada em combinação com expansão de células guiadas por Ag para a manutenção *in vitro* e expansão de linhas de células T Ag específicas. Em alguma instância cadeia de  $\gamma$  comum de ligação de citocinas também foram utilizadas para melhorar a detecção de células T Ag específicas.

Vários documentos (44-49) divulgam a activação de linfócitos com baCD3/CD28 e a sua exposição a IL-2 e/ou IL-7 dentro do contexto de transdução de células T.

## DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Modelo 3. Esta invenção baseia-se no conceito de que as células da memória central, sobre o desencadeamento de TCR na presença de co-estimulação e cultura com gama-citocinas, podem-se expandir *in vitro* e ser geneticamente modificadas por um vector viral, mantendo seu fenótipo funcional.

Acredita-se que a terapia celular com linfócitos T tem um enorme potencial para curar o cancro, infecções, imunodeficiências e auto-imunidade. Além disso, pode ser usado para modular as respostas imunológicas que ocorrem no contexto do transplante. A modificação genética é destinada a ampliar o intervalo terapêutico de linfócitos T, aumentando a sua eficácia e/ou limitando a sua toxicidade. Isto é conseguido através da transferência de genes que codificam para os novos receptores, os produtos biologicamente activos, resistência e factores de controlo. Os factores de controlo devem fornecer eliminação/inativação selectiva *in vivo* em células de genes modificados se se segue um efeito tóxico/indesejado. A terapia do gene suicida no contexto do transplante de células hematopoiéticas alogénicas (allo-HCT) é o exemplo mais claro de como a modificação genética de células-T com um factor de controlo atinge um benefício terapêutico. Em allo-HCT, o reconhecimento imunológico dos antígenos do hospedeiro por doador das células-T é uma "faca de dois gumes", levando a efeitos benéficos específicos: células T 1) mediar um efeito antitumoral directo (enxerto-versus-leucemia GVL); 2) promover o enxerto de precursores hematopoiéticos; 3) fornecer um sistema imune intacto a pacientes transplantados, permitindo assim a diminuir a incidência e a gravidade das infecções pós-transplante.

Infelizmente as células T do doador podem também reagir contra tecidos do hospedeiro saudável, levando assim ao risco da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GvHD) (20). A modificação genética de células-T com um vector retroviral expressando o Herpes Simplex Virus timidinaquinase do gene suicida (TK) confere sensibilidade selectiva para o pró-fármaco ganciclovir (GCV). Em pacientes, a infusão de linfócitos TK<sup>+</sup> e a administração subsequente de GCV resultou numa modulação de tempo da reactividade anti-hospedeiro para a preservação dos benefícios das células T, e um controlo selectivo de GvHD (21-23).

O sucesso da terapia de células T e da terapia genética de células T depende da capacidade das células T para proliferar e sobreviver a longo prazo *in vivo*. Para atingir esse objectivo, as células T precisam de abrigar correctamente órgãos linfóides secundários, onde o encontro apropriado com o antígeno ocorre e induz as células T a adquirir funções efectoras. É cada vez mais reconhecido que estes atributos tendem a segregar em estágios iniciais de diferenciação de células T maduras e, em particular no compartimento da memória central. Modificação genética com vectores virais pode afectar a fisiologia das células T. Em particular, na modificação genética através dos vectores retrovirais (RV) exige a proliferação celular. Esta é actualmente conseguida pela activação com estímulos policlonais e cultura na presença de doses elevadas de IL-2 humana recombinante. Os autores descobriram que o gene modificado dos linfócitos T humanos gerado com os protocolos actuais, ou seja, a activação com anticorpos anti-CD3 solúveis e cultura na presença de IL-2, são principalmente as células efectoras da memória, que

prontamente exibem funções efectoras *in vitro*, mas que enxertam mal em hospedeiros imunodeficientes condicionados. Uma vez que a expansão e persistência de células T humanas é um pré-requisito fundamental para uma terapia genética eficaz baseada em células T, a presente invenção fornece um método de cultura de células T e transdução capaz de gerar células T da memória central geneticamente modificadas. Para este efeito, os autores combinaram:

- a activação de células T com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28
- cultura com IL-7 e IL-15 em doses baixas
- transdução com um vector retroviral.

Os resultados indicam que a produção de linfócitos geneticamente modificados com grânulos na presença de IL-7 e IL-15 é viável e que estas células têm uma relação fisiológica CD4/CD8 e um fenótipo funcional de memória central, conforme definido pela i) ausência de expressão CD45RA e presença de expressão CD62L, ii) uma co-expressão de moléculas CD27 e CD28 e iii) a produção de IL-2 na ausência de IFN- $\gamma$  e/ou IL-4.

Além disso, os autores observaram que células T da memória central geneticamente modificadas infundidas em hospedeiros imunodeficientes condicionados i) enxertam e expandem em níveis significativamente mais elevados do que em células T efectoras de memória geneticamente modificadas e ii) são mais potentes do que os linfócitos efectores da memória

geneticamente modificados a induzir uma resposta imune aos antígenos do hospedeiro.

Estes resultados demonstram que linfócitos da memória central recombinantes totalmente funcionais podem ser obtidos e explorados para a cura de doenças humanas.

Na presente invenção, linfócitos da memória central recombinantes totalmente funcionais significa células T da memória central com potencial de sobrevivência a longo prazo, capazes de abrigar os órgãos linfóides periféricos, e de se diferenciar em células efectoras do reencontro do antígeno *in vivo*.

O objeto da invenção é um método *in vitro* para a obtenção de uma população de células T de memória geneticamente modificada, compreendendo as etapas de:

a) activar linfócitos com pelo menos dois anticorpos de activação específicos agonistas do receptor em que um dos linfócitos de activação dos anticorpos agonistas do receptor é específico para o polipeptídeo CD3 e o outro linfócito de activação dos anticorpos agonistas do receptor é específico para CD28

b) expor linfócitos activados para uma quantidade efectiva de pelo menos IL-7 e IL-15, capaz de expandir selectivamente populações de células T de memória;

c) inserir e expressar um gene exógeno por meio de um vector apropriado para as células obtidas em b).

De preferência, as populações de células T de memória compreendem CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> e/ou  $\gamma\delta$  e/ou populações de células T NKT.

Linfócitos preferíveis são derivados de uma amostra biológica pertencentes ao grupo de: sangue e outras amostras líquidas de origem biológica, amostras de tecido sólido, culturas de tecidos de células derivadas, e os descendentes dos mesmos, células isoladas de amostras biológicas como por exemplo PBMCs. De preferência, os linfócitos específicos de activação do agonista do receptor são conjugados com suportes de imitação de célula, mais de preferência os suportes de imitação de célula são esferas paramagnéticas.

Numa modalidade preferida o vector é um vector viral.

Numa modalidade preferida o gene exógeno codifica para um gene suicida, e/ou um gene marcador e/ou uma molécula biologicamente activa, e/ou um receptor, e/ou um factor solúvel retido na célula ou libertado fora da célula, e/ou um gene que confere resistência a um pró-fármaco.

A invenção será agora descrita por meio de exemplos não limitativos, fazendo referência às seguintes figuras:

**FIGURA 27. Activação com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 (ba CD3/CD28) e cultura com IL-7 e IL-15 promovendo a expansão de células T e gerando**

**eficientemente linfócitos humanos geneticamente modificados com uma relação preservada CD4/CD8.**  $5 \times 10^6$  PBMC foram estimulados ou com aCD3 e cultivados com IL-2 ou com baCD3/CD28 e cultivados com IL-7 e IL-15. No dia 14, as células foram contadas por exclusão de tripano azul. (A) São relatadas médias de expansão de células T nas duas condições de estimulação e de cultura (n = 4 doadores). 48 e 72 h após a simulação inicial, as células foram transduzidas pelo vector retroviral SFCMM3. No dia 6, as células geneticamente modificadas foram quantificadas por citometria de fluxo após coloração com anticorpos anti-LNGFR. (B) São relatadas médias de eficiência de transdução (em %) nas duas condições de estimulação e de cultura (n = 4 doadores). No dia 14, as células foram analisadas por citometria de fluxo para a expressão  $\Delta$ LNGFR e para a expressão de CD4 e CD8. (C) São relatadas médias da relação CD4/CD8 em células geneticamente modificadas geradas com os dois protocolos relatados (n = 4 doadores).

**FIGURA 28. Activação com baCD3/CD28 e cultura com IL-7 e IL-15 gerando linfócitos humanos TK<sup>+</sup> com fenótipo de memória central.** No dia 14, células TK<sup>+</sup> geradas com aCD3 e cultivadas com IL-2 ou geradas com baCD3/CD28 e cultivadas com IL-7 e IL-15 foram analisadas para o fenótipo de memória. Depois do chaveamento para a expressão  $\Delta$ LNGFR, as células foram analisadas por citometria de fluxo para a co-expressão CD45RA e CD62L. São relatadas médias da distribuição relativa (eixo y, %) dos CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (barras pretas), CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> (barras cinza escuro), CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> (barras cinza claro) ou CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (barras brancas) para (A) para células CD4<sup>+</sup> e (B) para células CD8<sup>+</sup> obtidas a partir de n = 4 doadores. As células também foram analisadas por citometria de fluxo para a co-expressão CD27 e CD28. São relatadas médias da distribuição relativa

(eixo y, %) de  $CD28^+CD27^+$  (barras pretas),  $CD28^-CD27^+$  (barras cinza escuro),  $CD28^-CD27^-$  (barras cinza claro) ou  $CD28^+CD27^-$  (barras brancas) para (C) células  $CD4^+$  e (D) células  $CD8^+$  obtidas a partir de  $n = 4$  doadores.

**FIGURA 29. Linfócitos humanos  $TK^+$  de memória central são células não-polarizadas.** No dia 14, células  $TK^+$  geradas com aCD3 e cultivadas com IL-2 ou geradas com baCD3/CD28 e cultivadas com IL-7 e IL-15 foram analisadas para a produção de citocinas. Depois do chaveamento para a expressão  $\Delta LINGFR$ , as células foram analisadas por citometria de fluxo para a produção de IFN- $\gamma$  e IL-4. São relatadas médias da distribuição relativa (eixo y, %) de IL-4 $^+$ IFN- $\gamma^-$  (barras brancas), IL-4 $^+$ IFN- $\gamma^+$  (barras cinza) ou IL-4 $^-$ IFN- $\gamma$  (barras pretas) para (A) células  $CD4^+$  e (B) células  $CD8^+$ .

**FIGURA 30. Ativação com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e cultura com IL-7+/-IL-15 ou IL-2 promovendo a expansão de células T e gerando eficientemente linfócitos humanos geneticamente modificados com uma relação preservada CD4/CD8.** PBMC foram estimulados ou com grânulos conjugados com anti-CD3 e anti-CD28 (chamado "B") e cultivados sem citocinas, IL-7+ IL-15, IL-2 ou IL-7, ou foram estimulados com anti-CD3 solúvel e cultivados com IL-2. 48 e 72 h após o estímulo inicial, as células foram transduzidas pelo vector retroviral SFCMM3. A) No dia 6, as células geneticamente modificadas foram quantificadas por citometria de fluxo após coloração com anticorpos anti-LINGFR. São relatadas médias de eficiência de transdução (em %) em condições diferentes de estimulação e de cultura. B) No dia 10, as células foram analisadas por citometria de fluxo para a expressão  $\Delta LINGFR$  e para a expressão de CD4 e CD8. São relatadas médias de relação CD4/CD8 em células geneticamente modificadas geradas com os

diferentes protocolos. C) No dia 6 e 9, as células foram contadas por exclusão de tripano azul. São relatadas médias de expansão de células T em condições diferentes de estimulação e de cultura (n = 5 doadores). \* = P <0,05\*\* = p <0,01.

**FIGURA 31. Ativação com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e cultura com IL-7 +/- IL-15 ou IL-2 gerando linfócitos humanos transduzidos com fenótipo de memória central.** No dia 10 linfócitos transduzidos gerados tanto com grânulos conjugados com anti CD3 e anti-CD28 e cultivados sem citocinas, IL-7+ IL-15, IL-2 ou IL-7, ou estimulados com anti-CD3 solúvel e cultivados com IL-2 foram analisados para fenótipo de memória. As células foram analisadas por citometria de fluxo para a co-expressão CD45RA e CD62L. Médias da distribuição relativa (eixo y, %) de CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (células ingênuas), CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> (células de memória central), CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> (células efectoras de memória) ou CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (efectores terminalmente diferenciados) são relatados em células CD3<sup>+</sup>ΔLNGFR<sup>+</sup>. (n = 6 doadores). \* = P <0,05\*\* = p <0,01.

**FIGURA 32 Cinética de expressão de receptor β IL-2/15 (CD122) não dependendo do processo de ativação, cultura e transdução.** Nos dias 0, 2, 4, 9 e 13, depois da estimulação inicial, linfócitos transduzidos gerados tanto com grânulos conjugados com anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados sem citocinas, IL-7+ IL-15, IL-2 ou IL-7, ou estimulados com anti-CD3 solúvel e cultivados com IL-2 foram analisados para a expressão de CD122. A % de células CD3<sup>+</sup> (nos dias 0, 2 e 4) e de células transduzidas (nos dias 9 e 13) expressam CD122 em diferentes pontos temporais é relatada em A) células CD8<sup>+</sup> e B) células CD4<sup>+</sup>. (n = 4 doadores).

**FIGURA 33** Ativação com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados com IL-7 +/- IL-15 ou IL-2 promovendo a expressão intensa e prolongada do receptor  $\alpha$  IL-2 (CD25) em linfócitos transduzidos. Nos dias 0, 2, 4, 9 e 13, após a estimulação inicial, linfócitos transduzidos gerados tanto com grânulos conjugados com anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados sem nocitocinas, IL-7+ IL-15, IL-2 ou IL-7, ou estimulados com anti-CD3 solúvel e cultivados com IL-2 foram analisados para a expressão de CD25. A % de células CD3+ (nos dias 0, 2 e 4) e de células transduzidas (nos dias 9 e 13) expressando CD25 em diferentes pontos temporais é relatada em A) células CD8+ e B) células CD4+. (n = 4 doadores). \* = P <0,05\*\* = p <0,01.

**FIGURA 34** Ativação com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados com IL-7 promovendo a expressão intensa e prolongada de receptor  $\alpha$  IL-7 (CD127) em linfócitos transduzidos. Nos dias 0, 2, 4, 9 e 13, após a estimulação inicial, linfócitos transduzidos gerados tanto com grânulos conjugados com anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados sem citocinas, IL-7+ IL-15, IL-2 ou IL-7, ou estimulados com anti-CD3 solúvel e cultivadois com IL-2 foram analisados para a expressão de CD127. A % de células CD3+ (nos dias 0, 2 e 4) e de células transduzidas (nos dias 9 e 13) expressam CD127 em diferentes pontos temporais é relatada em A) células CD8+ e B) células CD4+. (n = 4 doadores). \* = P <0,05\*\* = p <0,01.

**FIGURA 35** Ativação com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados com IL-7 preservando um potencial de alta alorreatividade proliferativa e baixa sensibilidade a sinais de apoptose em células transduzidas. Células T transduzidas geradas tanto com grânulos conjugados com anti-CD3 e anti-CD28 e cultivados com IL-7 e IL-2, ou por activação com anti-CD3 solúvel e cultivados em

IL-2 foram coradas com CFSE no dia 9, após a estimulação inicial, e foram co-cultivados com PBMCs alogênicos irradiados. Linfócitos do sangue periférico não-manipulados (PBL) dos mesmos doadores foram corados com CFSE, co-cultivados com os mesmos PBMCs alogênicos irradiados e utilizados como controlo. Após 7 dias as células foram contadas, marcadas com To-pro3, e analisadas por FACS para avaliar a percentagem de divisão e/ou morte das células. A) Percentagem de células em divisão. B) Número total de células a morrer. A activação induzindo a morte celular foi calculada com células em divisão (parte inferior dos histogramas a branco) e a morte por negligência foi calculada nas células não-divididas (parte superior dos histogramas a preto). \* =  $P < 0,05$ \*\* =  $p < 0,01$ .

**FIGURA 36 Capacidade de auto-renovação das células da memória central geneticamente modificadas geradas com grânulos conjugados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e cultivadas com IL-7, após o estímulo alogénico.** A) As células tratadas como descrito na figura 35 foram analisadas para a expressão de CCR7 e IL-7RA 7 dias após o MLR se ter iniciado. A percentagem de células em divisão CCR7+ (painel superior) e IL-7RA+ (painel inferior) é mostrada no quadrante superior esquerdo. B) As células foram então re-desafiadas *in vitro* com os mesmos estimuladores alogênicos, seguindo as mesmas condições de cultura utilizadas na primeira estimulação. É mostrada a percentagem de células em divisão após a segunda estimulação

**Figura 37. Linfócitos transduzidos gerados com grânulos de anticorpos CD3/CD28 rapidamente enxertados em ratos NOD/scid**

Ratos NOD/SCID foram condicionados e transplantados com

pele humana, infundidos iv com  $20 \times 10^6$  de linfócitos transduzidos gerados com grânulos CD3/CD28 e cultivados com IL7 ou IL2, ou com OKT3 e cultivados com IL-2. O quimerismo humano foi avaliado semanalmente por citometria de fluxo após coloração para CD3 humano e rato CD45. Os quadrantes e percentagens foram definidos de acordo com a coloração de isótipo de controlo. Foi mostrada a cinética do quimerismo humano (n = 4 doadores).

**Figura 38. Linfócitos transduzidos gerados com grânulos CD3/CD28 e cultivados com IL-7 induzindo GvHD xenogénica grave em ratos NOD/scid**

Ratos NOD/scid foram condicionados e transplantados com pele humana, infundidos iv com  $20 \times 10^6$  de linfócitos transduzidos gerados com grânulos CD3/CD28 e cultivados com IL7 ou IL2, ou com OKT3 e cultivados com IL-2. Os ratos foram monitorizados para GvHD xenogénica de acordo com 1) a perda de Wight. 2) pontuação clínica de GvHD (descrito no material e métodos). Controlos: animais que não receberam infusões de linfócitos,

**Figura 39. Linfócitos transduzidas gerados com grânulos CD3/CD28 e cultivados com IL-7 induzindo GvHD alogénico grave em ratos NOD/scid**

Três semanas após a infusão de células T humanas, os ratos NOD/scid foram sacrificados e pele humana foi removida bilateralmente. Todas as biópsias foram posteriormente analisadas cegamente por patologistas através de ematossilina-eosina (EE) e coloração CD3 anti-humana ( $\alpha$ hCD3). São relatadas secções representativas.

## **Materiais e Métodos**

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comité de Ética do Instituto Científico San Raffaele e realizados de acordo com suas directrizes.

### **Citometria de fluxo**

Onde indicado as células foram coradas à superfície com anti-CD4 ou anti-CD8 mAb, e anti-CD44, anti-CD127, anti-CD25, anti-CD132 e anti-CD62L mAbs (todos da PharMingen excepto o anti-CD127 Ab, clone A7R34, da Bioscience), e coradas, permeabilizadas e coradas adicionalmente com anti-Bcl-2 mAb de acordo com as instruções do fabricante.

### **Activação, cultura, e transdução retroviral de células T humanas**

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de separação Lymphoprep de fracções de sangue de doadores saudáveis obtidos após consentimento informado (Fresenius, Oslo, Noruega). PBMC foi cultivado em meio RPM11640 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com antibióticos de glutamina e com 10% de FBS inactivado pelo calor (Bio-Whittaker Itália, Milano, Italy). PBMC foi semeado em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$ /ml) e activado com anti-aCD3 (OKT3 30ng/ml, OrthoBiotech. Raritan, NJ) ou grânulos para-magnéticos baCD3/CD28 (3:1 grânulos/células T) (Dynabeads, Dynal Biotcch, ou Xcyte. Therapies Inc., Seattle WA, EUA, Invitrogen). As células T foram enriquecidas por baCD3/CD28 antes da cultura. As

células activadas com aCD3 foram cultivadas com IL-2 recombinante humano a 600 UI/ml (Chiron, Emeryville, CA).

As células activadas com baCD3/CD28 foram cultivadas: 1. Na ausência de citocinas; 2. com IL-7 recombinante humano na concentração mínima de 5 ng/ml (Peprotech, London, UK); 3. com IL-7 recombinante humano e A-15 ambos na concentração mínima de 5 ng/ml cada. (Peprotech, London, UK) No dia 2 e 3, as células foram transduzidas com o sobrenadante retroviral SFCMM3 por espinoculação a 2400 rpm por 2h a 37°C com 8µg/ml de polibrene (Sigma, St Louis, MO). O vector retroviral SFCMM3 codifica para o gene suicida TK sob o promotor LTR e para uma forma truncada do receptor de baixa afinidade para o factor de crescimento neural ( $\Delta$ LNGFR) sob o promotor SV40 (27). O sobrenadante retroviral foi fornecido por Molmed s.p.a. No dia 6, após a activação de células T, células do tamanho de grânulos usadas para a estimulação foram removidas das células T, de acordo com instruções do fabricante. Em algumas experiências, no dia 7 após a activação de células T, os linfócitos transduzidos foram positivamente seleccionados de acordo com o protocolo que se segue (protocolo intitulado: imuneselecção positiva de linfócitos transduzidos).

As células foram cultivadas até 14 dias. No dia 14, as vezes de expansão foram calculadas multiplicando-se a percentagem de células LNGFR<sup>+</sup> determinada por citometria de fluxo com a contagem de azul de tripano. O meio e as citocinas foram substituídos, de acordo com o protocolo inicial, a cada 3-4 dias. Em pontos temporais

seleccionados, as vezes de expansão foram calculadas multiplicando-se a percentagem de células  $\Delta$ LNGFr' determinada pela citometria de fluxo com a contagem de azul de tripano.

#### **Imunoselecção positiva de linfócitos transduzidos.**

No dia 7 após a activação de células T, os linfócitos transduzidos foram positivamente seleccionados. Como as células transduzidas expressam  $\Delta$ LNGFr na sua superfície, foram utilizados anticorpos anti-LNGFr cobertos com grânulos magnéticos para separar os linfócitos transduzidos e não-transduzidos.

As células foram recolhidas a partir de placas em tubos, lavadas (1500 rpm, 10 min. À temperatura ambiente-RT) e ressuspensas em W78 numa concentração final de  $5 \times 10^6$ /ml. Foi então adicionado anticorpo anti-LNGFr 20.1 à suspensão de células ( $1 \text{ g}/20 \times 10^6$ ) e as células foram colocadas para girar a 10 rpm por 30 min à temperatura ambiente. As células T foram lavadas uma vez e ressuspensas em WB em  $25 \times 10^6$ /ml. Foi então adicionado Dynabeads M-450 Sheep anti-rato IgG ( $5 \times 10^6$  grânulos/ $10^6$  células positivas) e as células foram colocadas para girar a 10 rpm por 30' à temperatura ambiente. As células transduzidas foram então magneticamente seleccionadas. Para esta finalidade, os tubos foram colocados perto do íman por 3 min e a fracção negativa foi descartado. Este procedimento foi repetido por um total de três vezes. Finalmente, a fracção de células ligadas aos grânulos foi removida do íman, lavada e ressuspensa em meio fresco com a mistura de citocinas apropriadas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml.

### **Citometria de fluxo de células T transduzidas**

A citometria de fluxo foi utilizada para análise do fenótipo de superfície, eficiência de transdução, ciclo celular e produção de citocinas. Foram utilizados os anticorpos seguintes (PharMingen): FITC conjugado mAb para CD4 humano, CD8, CD45RA, CD27 e IFN- $\gamma$ , (PE) conjugado com mAb para CD4 humano, CD8, LNRFER, CD62L, CD28 e IL-4, proteína peridrina clorofila-a (PerCP) conjugado com mAb para rato CD45 (Ly5.1), e alofococianina (APC) conjugada com mAb CD3 humano. As amostras foram executadas através de um citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA), após controlo fluorocromo do isótipo combinado conjugado com o mAb corado irrelevante e os dados foram analisados usando Software CellQuest (Becton Dickinson).

Os anticorpos conjugados de fluorocromo CD127, CD122, CCR7, e para o rato CD45 (PharMingen, San Diego, CA, EUA) também foram utilizados para corar os linfócitos

### **Produção de citocinas**

Para a determinação da produção de citocinas, as células foram semeadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^6$ /ml) e estimuladas com 50ng/ml de PMA (estigma) e 1 $\mu$ g/ml de ionomicina (Sigma). Após 4h, foi adicionado brefeldin A (Sigma) por 2h adicionais (10 $\mu$ g/ml). As células foram então coradas com o marcador anti-superfície de anticorpos conjugados com fluorocromo apropriado e fixadas com 1% de par-formaldeído a 4°C por 10 min. A coloração intracelular foi realizada com os anticorpos de fluorocromo anti-citocina apropriados após incubação por 20 min à

temperatura ambiente em PBS 2% de FBS contendo 0,05% de saponina (Sigma).

### **Ensaio de diluição CFSE e reacção mista de linfócitos (MLR)**

Análise de alorreactividade de células T foi realizada no dia 10 após a cultura inicial de linfócitos. As células T transduzidas foram marcadas com CFSE no dia 10, e depois cultivadas com PBMCs alogénicos irradiados. O CFSE consiste numa molécula de fluoresceína contendo um grupo éster funcional succinimidil e duas metades de acetato. O CFSE difunde-se livremente nas células e esterases intracelulares unindo os grupos acetato e convertendo-os num corante de membrana fluorescente impermeante. O corante não é transferido para as células adjacentes. O CFSE é retido pela célula no citoplasma e não afecta adversamente a função celular. Durante cada ronda de divisão celular, a intensidade relativa do corante diminui pela metade.

### **Procedimento de coloração CFSE:**

As células foram lavadas duas vezes em PBS (na ausência de soro) e ajustadas para  $2 \times 10^7$ /ml. O CFSE foi diluído a 1  $\mu$ M em PBS e misturado com a suspensão de células numa relação de 1:1. As células foram centrifugadas rapidamente, e misturadas por 8 min. à temperatura ambiente. O FBS foi então adicionado na proporção 1:1 e 1 minuto depois as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas duas vezes com uma solução contendo 10% FBS (PBS ou meio).

## MLR

No final do procedimento, as células T transduzidas coradas por CFSE (respostas) foram colocadas em cultura em placas de 24 poços com 2000 cGy de PBMCs alogénicos irradiados (estimuladores) na proporção de 1:1. Não foram adicionadas citocinas à cultura de células. As células T transduzidas coradas por CFSE colocadas em cultura na ausência de estimuladores foram utilizadas como controlo negativo. As células colocadas em cultura com o anticorpo anti-CD3 solúveis foram utilizadas como controlo positivo.

## Leituras

Em pontos de tempo seleccionados após a estimulação, as amostras de células foram recolhidas e coradas com marcadores anti-superfície de anticorpos monoclonais conjugados de fluorocromo. Imediatamente antes da aquisição FACS, 1  $\mu$ l de solução To-Pro-3 foi adicionada a cada amostra FACS. A To-Pro-3 é um corante vermelho escuro intercalando ADN, detectável em fluorescência 4, que oferece a possibilidade de co-corar células com anticorpos conjugados FITC, PE e APC. A sua função é revelar a fracção de células mortas.

## **Análise in vivo**

Ratos com defeitos imunológicos na adaptação (scid, genes de recombinação activada<sup>-/-</sup>), bem como no compartimento inato (NOD, cadeia comum  $\gamma$ <sup>-/-</sup>) são comumente usados para estudar a biologia dos linfócitos humanos *in vivo*. Utilizamos ratos NOD/scid para testar a actividade dos

linfócitos da memória central geneticamente modificados *in vivo*. Foram obtidos ratos do sexo feminino de seis a oito semanas de idade NOD/scid de Charles-River Italia (Calco, Itália). O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê interno para estudos com animais do nosso Instituto (Institutional Animal Care and Use Committee [IACUC]). Os ratos foram tratados de acordo com os seguintes protocolos:

### **Modelo da doença xenogénica enxerto-versus-hospedeiro**

Foram obtidos ratos NOD/scid fêmeas de 6-8 semanas de idade a partir de Charles-River Itália (Calco, Itália). Uma semana antes da infusão, os ratos foram transferidos dos isoladores de fluxo laminar para gaiolas normais e mantidos sob condições livres de patógenos específicas recebendo água estéril e grânulos irradiados *ad libitum*. Um dia antes da experiência, os ratos receberam 1 mg de anticorpo monoclonal de bloqueio anti-rato IL-2R $\beta$  ip para neutralizar a actividade NK residual. O anticorpo anti-IL2R $\beta$  foi produzido como descrito a partir do hibridoma TM $\beta$ -1 gentilmente cedido pelo Prof. Tanaka (Osaka University, Japão). No dia 0, os ratos receberam irradiação corporal total com uma dose única de 350 cGy (irradiação gama a partir de um acelerador linear) e foram imediatamente infundidos com PBL inalterado ou linfócitos humanos transduzidos com o vector retroviral SFCMM3 (28). O PBL inalterado foi obtido a partir de PBMC após o esgotamento dos monócitos contaminantes, células B- e NK- com o kit de isolamento de células T Pan (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemanha). As células foram ressuspendidas em 500 $\mu$ l de meio X-VIVO15 e infundidas i.p. Os ratos foram monitorizados para GvHD por meio do cálculo da perda de peso. Os ratos moribundos foram sacrificados por razões

éticas. O quimerismo humano foi determinado semanalmente por citometria de fluxo após a sangria da veia da cauda. O quimerismo humano foi calculado da seguinte forma: quimerismo humano (%) =  $[\text{huCD3}^+ / (\text{huCD3}^+ + \text{mCD45}^+) \times 100$ .

### Análise de GvHD xenogénico

Na semana 1, 2 e 3 após a infusão de células T, os ratos foram pesados e avaliados quanto à GvHD xenogénica de acordo com a seguinte pontuação: perda de peso (0 para perda de peso <10%, 1 para 10%-25%, 2 para > 25 %), arqueamento (0-2), actividade (0-2), textura da pele (0-2), e integridade da pele (0-2), o índice máximo de 10. A perda de peso também foi estimada como uma variável independente, uma vez que foi considerado o critério mais objetivo (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de GvHD-xeno clínico em ratos infundidos com células T humanas

Critérios	Grau 0	Grau 1	Grau 2
Perda de peso	<10%	10-25%	>25%
Postura	Normal	Arqueada apenas em repouso	Arqueamento severo prejudicando o movimento
Actividade	Normal	Decréscimo ligeiro a moderado	Estáticos a não ser que estimulados
Textura da pele	Normal	Enrugamento ligeiro a moderado	Enrugamento severo/tratamento escasso
Integridade da pele	Normal	Descamação nas patas/cauda	Áreas óbvias sem pele

## **Modelo GvHD alogénico**

No modelo GvHD alogénico, os ratos foram transplantados com pele humana e infundidos com linfócitos alogénicos geneticamente modificados para avaliar a sua capacidade de alojar a pele humana e mediar uma reacção GvH alogénica. Uma semana antes do transplante, os ratos foram transferidos dos isoladores de fluxo laminar para gaiolas normais e mantidos sob condições livres de patógenos específicas recebendo água estéril e grânulos irradiados ad libitum. Cerca de três semanas antes da infusão de células T humanas, os ratos são anestesiados com 12-18 mg de Avertin/rato por via intraperitoneal. Eles foram, então, depilados na parte traseira, e foi realizada bilateralmente uma incisão horizontal da pele no dorso do animal. A bolsa subcutânea foi então aberta, e foi introduzido um pequeno pedaço de epiderme abdominal humana (privada de gordura e tecido conjuntivo dérmico). No final do procedimento, a ferida foi suturada. Como a temperatura dos ratos diminuiu progressivamente durante a operação, os animais foram colocados numa caixa aquecida por cerca de 30 min. e finalmente transferidos para as suas gaiolas.

## **Infusão de células T humanas.**

Para facilitar o enxerto de linfócitos humanos em ratos NOD/scid, inactivou-se funcionalmente células NK com um receptor  $\beta$  de anticorpos IL-2 anti-rato (TM $\beta$ -1) antes da transferência de linfócitos. O anticorpo foi produzido a partir do hibridoma TM $\beta$ -1 gentilmente cedido pelo Prof. Tanaka (Osaka University, Japão). No dia 0, os ratos receberam irradiação corporal total com uma dose única de 300 cGy (irradiação  $\gamma$  a partir de um acelerador linear), os

animais foram então ponderados e imediatamente infundidos com linfócitos humanos transduzidos que haviam sido colhidos no dia 9, após a estimulação inicial. As células foram injectadas por via intravenosa em 250 µl de solução salina.

### **Análise do enxerto de células T**

Na semana 1, 2 e 3 após a infusão de células T, foram retirados cerca de 300 µl de sangue/rato a partir de uma pequena incisão na veia da cauda e recolhido em tubos contendo heparina. As células vermelhas do sangue foram lisadas com uma exposição a ACK por 3 min. e coradas para análise citofluorimétrica como descrito no parágrafo intitulado "coloração para marcadores de superfície e análise citofluorimétrica".

### **Análise ou GvHD alogeico.**

Na semana 3 após a infusão de células T, ou antes, em caso de GvHD grave, os ratos foram sacrificados e os dois pedaços de pele humana retirados bilateralmente, e fixados em formalina, a pele embebida em parafina foi cortada com 4 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina para avaliação morfológica. A avaliação imunohistoquímica para a presença de linfócitos T humanos foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-CD3 humano (Dako, Glostrup, Dinamarca) na diluição 1:100, por meio do método do complexo peroxidase avidina/biotina usando um Immunostainer Dako automatizado. A reacção de coloração foi revelada pelo método cromógeno de tetrahidrocloreto e os cortes

foram contrastados com hematoxilina. As fotos foram tiradas com uma AxioCam Zeiss HRC.

### **Análises estatísticas**

Para cada variável considerada neste estudo, foram calculados a mediana média e o desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA) e as suas inclusões na forma Statcel2 (OMS publicar, Saitama, Japão). Foi realizado o Teste de Scheffe F, após a análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos, e foi realizado o teste de Mann-Whitney U seguinte ao teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos.

### **Resultados e Discussão**

#### **Geração de células T humanas da memória central geneticamente modificadas**

A proliferação celular é necessária para a transdução retroviral de linfócitos T. Os autores activaram PBMC com aCD3 ou baCD3/CD28. As células foram activadas com baCD3/CD28 e cultivadas com IL-7 e IL-15 ou com aCD3 e cultivadas com IL-2 (Figura 27A). As células foram transduzidas no dia 2, por espinoculação, com o vector retroviral SFCMM3. A transdução foi realizada ao mesmo tempo, e seguindo o mesmo protocolo. A activação com baCD3/CD28 na presença de IL-7 e IL-15 promoveu uma expansão maior de células T (Figura 27A) e levou a uma maior eficiência de transdução do que a activação com aCD3 na presença de IL-2 (Figura 27B). Além disso, no final do

período de cultura, a relação fisiológica CD4/CD8 foi analisada e encontrada ser melhor mantida em células transduzidas activadas com baCD3/CD28 e cultivadas com IL-7 e IL-1 do que com células activadas com aCD3 e cultivadas com IL-2 (Figura 27C).

### **Activação policlonal necessária para a transdução retroviral de linfócitos T enriquecidos para as células de memória.**

Para determinar a distribuição relativa de subconjuntos de memória em células T humanas transduzidas com o vector retroviral, os autores analisaram a co-expressão de CD45RA/CD62L. No dia 14, células T transduzidas activadas com aCD3 e cultivadas com IL-2 foram principalmente CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>, isto é, células de memória efectoras. Pelo contrário, células T transduzidas CD4<sup>+</sup> activadas com baCD3/CD28 e cultivadas com IL-7 e IL-15 foram altamente enriquecidas para CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, isto é, células de memória central (Figura 28 A). Um enriquecimento de células de memória central CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, no caso de células activadas por baCD3/CD28 e cultivadas com IL-7 e IL-15 também foi observado para células CD8 transduzidas (Figura 28B). Para melhor definir o fenótipo de memória, analisámos também a co-expressão de CD28/CD27. Enquanto para células CD4<sup>+</sup> transduzidas não houve diferença na distribuição relativa dos subconjuntos entre as duas condições (Figura 28C), para células CD8<sup>+</sup> transduzidas, a activação com baCD3/CD28 e cultura com IL-7 e IL-15 favoreceu as células T CD28<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (Figura 28D).

## **Correlação funcional das células T humanas de memória central geneticamente modificadas**

Os linfócitos T humanos centrais e efectores de memória, conforme identificado pelo fenótipo de superfície, diferem na capacidade de produzir citocinas efectoras. No dia 14, os autores re-estimularam as duas populações de células T geneticamente modificadas e analisaram-nas para a produção de citocinas. As células T CD4<sup>+</sup> estimuladas com aCD3] e cultivadas com IL-2 produziram eficientemente o protótipo da citocina IFN- $\gamma$  efectora.

Em agudo contraste, a maioria das células T CD4<sup>+</sup> estimuladas com baCD3/CD28, IL-7 e IL-15 foram células não-polarizadas e nem produziram IFN- $\gamma$ , nem IL-4 (Figura 29A). Um resultado similar foi obtido com células T CD8<sup>+</sup> (Figura 29B).

## **Potencial de GvHd em células T humanas de memória central geneticamente modificadas**

Modelos de xenoenxerto diferentes têm sido propostos para estudar a GvHd induzida por linfócitos humanos.

Para avaliar a reactividade relativa anti-hospedeira dos dois genes suicidas modificados da memória central e efectora de linfócitos T humano *in vivo*, essas populações foram injectadas em ratos NOD/scid condicionados com irradiação não-letal e anti-NK. Os ratos de controlo foram infundidos com PBL humano purificado singeneico. Os autores observaram que os linfócitos da memória central

geneticamente modificados foram mais eficientes na enxerto do que os seus contrapartes de memória efectora (quimerismo humano na semana 1: Faixa de 0,45% em média 6,2-1,1 para as células de memória efectora geneticamente modificadas vs média de 4, faixa de 5% 4,1-5,2 para as células de memória central geneticamente modificadas, Tabela 2. 5 de 6 ratos infundidos com células T de memória efectora geneticamente modificadas apresentaram uma diminuição do quimerismo humano após a semana 1 e não apresentaram GvHD. Por outro lado, quimerismo humano persistente foi observado na maioria dos ratos infundidos com células T de memória central suicidas geneticamente modificadas e 4 ratos de 6 desenvolveram GvHD grave.

**Tabela 2. Doença de enxerto e enxerto-versus-hospedeiro**

	PBL	Células TK <sup>+</sup> de memória efectora	Células TK <sup>+</sup> de memória central
Quimerismo humano em % (faixa) <sup>a</sup>	3,6 (2,5-5)	0,45 (0,2-1,1)	4,5 (4,1-5,2)
Incidência de GvHD <sup>b</sup>	6/6	1/6	4/6

<sup>a</sup> média (intervalo) na semana 1 após a infusão

<sup>b</sup> definido como perda de peso > 10% do peso corporal inicial

### **Geração de células T humanas de memória central geneticamente modificadas**

Para determinar os requisitos mínimos para obter um número células T humanas de memória central geneticamente modificadas adequados para aplicação clínica, foram comparados as seguintes cinco condições de transdução de células T:

1. anticorpos anti-CD3 solúveis (OKT-3)+ altas doses de interleucina 2 (600 UI/ml);
- 2.células anti CD3/CD28 do tamanho de grânulos sem qualquer citocina;
- 3.células anti CD3/CD28 do tamanho de grânulos + doses baixas de IL-2 (200 UI/ml);
4. células anti CD3/CD28 do tamanho de grânulos + doses baixas de IL-7 (5 ng/ml);
- 5.células anti CD3/CD28 do tamanho de grânulos + doses baixas de IL-7 (5 ng/ml) + doses baixas de IL-15 (5 ng/ml).

As células foram transduzidas e cultivadas seguindo os protocolos descritos em materiais e métodos. Essas experiências produziram os seguintes resultados:

1. Activação com grânulos anti CD3/CD28 permitindo maior eficiência de transdução do que a activação com anticorpos anti-CD3 solúveis.

Como mostrado na figura 30A a eficiência da transdução retroviral foi significativamente maior após a estimulação com células de tamanho grânulos magnéticos que após a estimulação com o anticorpo anti-CD3 solúvel. Este resultado foi independente do uso de citocinas na mistura de cultura.

2. Activação com grânulos CD3/CD28 seguido pela cultura na presença de citocinas (IL2, IL7 + IL15 ou IL7) preserva a relação fisiológica CD4/CD8 nos linfócitos T transduzidos.

Para avaliar a capacidade dos nossos protocolos de transdução em preservar a relação fisiológica CD4/CD8, analisámos a relação de células CD4/CD8 transduzidas produzidas por diferentes protocolos, 10 dias após a estimulação inicial, como mostrado na figura 30B. Apenas a estimulação com grânulos magnéticos seguido pela cultura de citocinas (IL2, IL7 ou IL7 + IL15) manteve uma relação fisiológica nas células T CD4/CD8 transduzidas, enquanto a média das proporções CD4/CD8 observadas com condições de outra cultura não excedeu 1/1.

3. Activação com grânulos CD3/CD28 seguido pela cultura na presença de citocinas (IL2, IL7 + IL15 ou IL7) induz uma taxa de proliferação significativamente maior das células transduzidas do que em condições de outra cultura.

O protocolo de transferência genética *ex vivo* para aplicação clínica, deve cumprir com os critérios relevantes relacionados com a viabilidade: uma das questões de viabilidade importantes na tradução clínica de uma abordagem de terapia genética relaciona-se com número e expansão celular *in vitro*. Como mostrado na figura 30C, uma diferença estatisticamente significativa foi observada no número de células obtidas entre as células geneticamente modificadas estimuladas com grânulos e cultivadas com as citocinas, em comparação com as outras condições (apenas grânulos e OKT3+IL-2). Estes resultados mostram que os linfócitos transduzidos obtidos com grânulos conjugados anti-CD3/CD28 e cultivados com IL-7, IL-7 + IL-15 ou IL-2

expandiram-se rapidamente *in vitro* para números adequados para aplicação clínica.

4. Activação com grânulos anti CD3/CD28 gera principalmente linfócitos de memória central transduzidos CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>

Investigámos o imunofenótipo de células transduzidas obtidos por diferentes condições de cultura através de coloração FACS para CD3, CD4, CD8, CD45RA e CD62L 10 dias após a estimulação inicial. Observou-se que uma fracção muito elevada (cerca de 80%) de ambas as células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, que tinham sido estimuladas com grânulos anti CD3/CD28, foi CD45RA<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>: este padrão corresponde a linfócitos T de memória central. Pelo contrário, células T estimuladas com OKT3 mostraram 60% de células T de memória efectora CD8<sup>+</sup> e 45% CD4<sup>+</sup> (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) versus 30% de linfócitos TK<sup>+</sup> de memória central CD8<sup>+</sup> e 50% CD4<sup>+</sup> (Fig. 31).

**Expressão do receptor de cadeia  $\gamma$  durante a cultura de linfócitos transduzidos**

As expressões de citocinas receptoras são reguladas firmemente durante a estimulação das células T. Analisámos a cinética da expressão dos receptores de citocinas de cadeia  $\gamma$  durante diferentes culturas de células T e protocolos de transdução, como medida de funções das células T e potencial. Para esta finalidade, foi realizada uma análise após a coloração citofluorimétrica de células transduzidas com anticorpos marcados com fluorocromo para CD122 (receptor IL-2/15 de cadeia  $\beta$  comum), CD25 (IL-2 receptor de cadeia  $\alpha$ ) e CD 127 (IL-7 receptor de cadeia  $\alpha$ ) em diferentes pontos temporais após a primeira estimulação.

## **1. Expressão de receptor IL-2/15 de cadeia $\beta$ (CD122) não muda entre os diferentes protocolos de transdução**

Durante o curso da resposta imunológica expressão do receptor  $\beta$  IL-2/IL-15 aumenta após a activação das células T e depois diminui para um nível intermediário de expressão que é mantida durante toda a fase de memória celular (13).

A Figura 32 mostra a cinética de expressão de CD122 em linfócitos transduzidos durante 13 dias de cultura. Nós não observámos diferenças entre os cinco protocolos em termos de expressão de CD122 em células T cultivadas. Em todos os casos, as células T e, em particular as células CD4<sup>+</sup>, CD 122 sobre-regulado após a activação, atingiram um pico por volta do dia 4, quando quase 100% de células geneticamente modificadas expressaram a molécula. As células, então, lentamente desregularam a expressão CD122, atingindo o mesmo nível de expressão observado antes da estimulação 13 dias após o início da cultura de células T, quando as células haviam chegado ao estado de repouso.

## **2. Estimulação com grânulos CD3/CD28 promove uma expressão intensa e prolongada de receptor $\alpha$ IL-2 em células T transduzidas**

O receptor  $\alpha$ IL-2 (CD25) é um marcador de activação relevante para linfócitos T. Em condições fisiológicas, as células T ingénuas não expressam CD25, no entanto, a sua expressão é regulada rapidamente por activação de células T e, geralmente, diminui antes do pico da resposta proliferativa.

Em células transduzidas activadas por grânulos, independentemente de condições de cultura subsequente, a citometria de fluxo mostrou que no dia 2 após a estimulação a maioria das células T sofreu um aumento significativo de expressão de receptor  $\alpha$  IL-2. Pelo contrário, apenas 40% das células transduzidas activadas com OKT3 solúvel sobre-regularam o receptor (figura 33), sugerindo que a maioria das células T não foram adequadamente activadas com este procedimento de estimulação. Enquanto o CD25 é expresso, as células T podem proliferar para IL-2, participando, assim, activamente da resposta imune. Em células transduzidas produzidas após a activação com grânulos, a expressão de CD25 manteve-se elevada na maioria das células até ao dia 13. Pelo contrário, as células que sobre-regularam CD25 após estimulação com o anticorpo anti-CD3 solúvel atingiram um pico de expressão dois dias mais tarde do que células activadas com grânulos e então rapidamente para baixaram a regulação da molécula CD25.

### 3. Células transduzidas activadas com grânulos anti-CD3/CD28 + IL-7 mostram a expressão máxima do receptor $\alpha$ IL-7, um marcador de longa sobrevivência de células T de memória

Em condições fisiológicas, o receptor  $\alpha$  IL-7 (CD127) é constituidamente expresso por células T ingénuas. A sua expressão é sub-regulada pela activação de células T (de forma especular em relação ao CD25) e tal sub-regulação pode promover a morte celular. Por outro lado, a expressão de CD127 aumenta à medida que a resposta imune prossegue, atingindo altos níveis nas células T de memória. IL-7 é um factor potente para a sobrevivência de linfócitos T de memória: o rastreo do receptor por IL7 T promove a

sobrevivência e proliferação celular e protege as células da apoptose através de diferentes vias de sinalização intracelular. Analisámos a cinética de expressão CD127 nas nossas células transduzidas. O receptor  $\alpha$  IL-7 passou por uma profunda sub-regulação após a estimulação (aproximadamente entre o dia 1 e o dia 6). Do dia 7, a sua expressão aumentou progressivamente e, curiosamente, foi observada uma diferença significativa na proporção de células transduzidas CD127<sup>+</sup> obtidas com grânulos CD3/CD28 e IL-7 em comparação com todas as outras condições (Figura 34). Do dia 9, mais de 80% de ambas as células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> TK<sup>+</sup>, que haviam sido estimuladas com células do tamanho de grânulos e IL-7, foram positivas para o receptor  $\alpha$  IL-7. Isto sugere que o IL-7 é responsável pela manutenção de altos níveis de expressão de CD127 na maioria das células T após a activação, proporcionando assim uma vantagem de sobrevivência a longo prazo exclusiva para as células transduzidas.

#### **Linfócitos transduzidos gerados com grânulos + IL-7 tendo maior potencial alorreactivo**

A partir dos resultados anteriormente apresentados, verifica-se que a activação com grânulos magnéticos anti-CD3/CD28 e o efeito adjuvante de citocinas (IL-7, em particular) são factores importantes para a geração de linfócitos T transduzidos de memória central, com um potencial de sobrevivência alto.

O nosso objectivo seguinte foi verificar se esses linfócitos T transduzidos CM eram realmente capazes de provocar uma resposta imune potente e eficaz. Respondemos

a esta questão *in vitro*, estimulando as células transduzidas com antígenos alogénicos e obtivemos os seguintes resultados:

1. Linfócitos transduzidos gerados com grânulos + IL-7 tendo maior potencial proliferativo quando estimulados com um antígeno alogénico.

Células T transduzidas geradas com cada uma das cinco condições foram coradas com CFSE e co-cultivadas com PBMCs alogénicos irradiados. Depois de uma semana contamos o número de células e analisámos a diluição CFSE por FACS para avaliar a percentagem de células em divisão. Como mostrado na figura 35A, encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre IL-7, contendo as condições e os outros protocolos. Em células T CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>: Na verdade, uma alta percentagem (40%) de células transduzidas geradas com grânulos CD3/CD28+ IL-7 tinha-se dividido em 1 semana após a estimulação alogénica. Pelo contrário, apenas 20% das células transduzidas geradas com OKT3 se tinham dividido nas mesmas condições de cultura.

2. Linfócitos transduzidos gerados com grânulos + IL-7 tendo menor sensibilidade para a morte.

A fim de manter a homeostase dos linfócitos T, a activação maciça de células T em resposta a um desafio alogénico é geralmente seguida por um extenso programa de apoptose, IL-2 sendo o principal interveniente na assim chamada "morte induzida por activação celular", (AICD). Mecanismos para neutralizar a AICD são necessários para o desenvolvimento de uma memória imunológica eficiente e de longa duração após as respostas imunes primárias. Para investigar a

sensibilidade das células transduzidas a AICD, corámos nós linfócitos CFSE<sup>+</sup> alo-estimulados com To-Pro 3, um corante fluorescente, que se liga selectivamente a células mortas. Foi calculado o número de células mortas em populações de células transduzidas divididas e não divididas, a fim de avaliar, respectivamente, a activação da morte celular induzida e a morte por negligência (35B figura). As células transduzidas cultivadas em IL2 (independente do sinal de activação) demonstraram ser altamente sensíveis a AICD e à morte por negligência. Pelo contrário, as células transduzidas geradas com grânulos CD3/CD28+ IL-7 apresentaram a menor mortalidade, comparável à dos linfócitos inalterados. Esta observação pode estar relacionada com a expressão persistente de CD127 numa alta proporção (33% de CD8<sup>+</sup> e 52% de CD4<sup>+</sup>) de linfócitos geneticamente modificados gerados com grânulos CD3/CD28 e IL-7. De acordo com esta observação, os linfócitos transduzidos gerados com grânulos CD3/CD28 e IL-2, que demonstraram ser altamente sensíveis à morte celular, mostraram a menor proporção de células que expressam células CD127<sup>+</sup> (30%). As parcelas de FACS na figura 36A mostram um exemplo representativo de detecção de CD127 em linfócitos T transduzidos corados com CFSE 10 dias após a estimulação alogénica.

3. Linfócitos transduzidos gerados com grânulos + IL-7 preservando um fenótipo de memória central, após o estímulo alogénico.

A MMemória imunológica é assegurada por uma capacidade de auto-renovação de células de memória, que, no reencontro com o antígeno, se dividem e geram ambos os efectores, capazes de eliminar directamente o patógeno, e células de memória, capazes de proteger o hospedeiro a

longo prazo. Para verificar se os linfócitos de memória central, geneticamente modificados tinham essa capacidade de auto-renovação, analisámos a expressão de CCR7 (um marcador de células de memória central) sobre as células coradas com CFSE, no dia 10 após o estímulo alogénico. Como mostrado na figura 36A, os nossos dados mostram que 59% dos linfócitos CD3<sup>+</sup> geneticamente modificados gerados com grânulos CD3/CD28 e IL-7, que tinham sofrido pelo menos uma divisão, foram positivos para a expressão CCR7. Pelo contrário, apenas 17% dos linfócitos CD3<sup>+</sup> geneticamente modificados gerados com OKT3 expressaram CCR7. A cultura na presença de IL-7 era essencial para preservar a capacidade de auto-renovação dos linfócitos de memória central, uma vez que apenas 36% dos linfócitos CD3<sup>+</sup> geneticamente modificados gerados com grânulos CD3/CD28 e IL-2 mantiveram a expressão de CCR7 após o estímulo alogénico. De acordo com este resultado, quando as células foram re-desafiadas *in vitro* com os mesmos estimuladores alogénicos, seguindo as mesmas condições de cultura utilizadas na primeira estimulação, mais de 70% das células transduzidas geradas com grânulos CD3/CD28 e IL-7 e apenas 50 % de células transduzidas geradas com OKT3 proliferaram na semana seguinte (figura 36B).

#### **Linfócitos transduzidos gerados com grânulos + IL-7 tendo maior potencial alorreactivo *in vivo***

Para avaliar a eficácia células T transduzidas da memória central *in vivo*, foi estabelecido um novo modelo quimérico, com base em ratos NOD/Scid transplantados com pele humana. Com base nos resultados obtidos *in vitro*, decidimos investigar a potência de linfócitos de memória central

geneticamente modificados gerados com grânulos CD3/CD28 + IL-7, grânulos CD3/CD28 + IL-2 e para comparar a actividade funcional dessas células com linfócitos de memória efectores geneticamente modificados, gerados com OKT-3 e IL-2, e actualmente utilizados em ensaios clínicos. Após a infusão de células transduzidas, a reactividade xenogénica de células T foi determinada pela observação clínica, enquanto a GvHD alogénica foi avaliada histologicamente e correlacionada com a análise da infiltração da pele humana por células transduzidas. Os resultados desses estudos estão resumidos abaixo:

**Células geneticamente modificadas geradas com CD3/CD28 e IL-7 rapidamente enxertadas em ratos NOD/Scid transplantados com pele**

O número de linfócitos T humanas no sangue periférico dos ratos aumentou da semana 1 para a semana 2 após a infusão. As células transduzidas geradas com grânulos enxertaram em maior medida do que as células transduzidas geradas com OKT-3. A diferença foi mais evidente na segunda semana após a infusão de células T (Fig 37).

**Activação com grânulos CD3/CD28 e estimulação IL-7 conferem às células transduzidas a mais elevada reactividade contra os antígenos xenogénicos.** A GvHD xenogénica foi monitorizada de acordo com um resultado clínico descrito em material e métodos e medindo a perda de peso.

Os ratos NOD/Scid infundidos perderam progressivamente o seu peso e alguns deles morreram de GvHD xenogénica ou foram sacrificados por razões éticas. As células T mais

xeno-reactivas foram aqueles estimulados com grânulos anti-CD3/CD28 e cultivadas com IL-7, seguido por células transduzidas gerados com grânulos CD3/CD28 e IL-2. A estimulação com anticorpos anti CD3 solúveis não gerou células T fortemente xeno-reactivas, como os ratos infundidos com esses linfócitos não mostraram nem uma perda significativa de peso corporal, nem o surgimento de outros sinais xeno-GvHd clínicos (Fig. 38).

**Activação com grânulos CD3/CD28 e estimulação IL-7 conferem às células transduzidas a mais alta reactividade contra antígenos alogénicos**

O nosso modelo quimérico de pele humana NOD/Scid, consistindo em ratos NOD/Scid, que foram submetidos a transplante de pele, através da inserção de dois pedaços de epiderme humana abdominal em duas bolsas subcutâneas nas costas do rato e que posteriormente foram infundidos por via intravenosa com células geneticamente modificadas. O transplante de pele humana permite investigar a reactividade das células T contra antígenos alogénicos, por estudos histológicos. A pele humana transplantada contém, de facto, não só células epidérmicas e do estroma, mas também algumas células apresentando antígenos, que são capazes de atrair linfócitos circulantes e, possivelmente, promover a sua activação. Três semanas após a infusão de células T humanas, os ratos quiméricos NOD/Scid foram sacrificados e removida a pele humana bilateralmente. Todas as biópsias foram posteriormente analisadas cegamente por patologistas através de coloração ematoxilina-eosina (EE) e anti CD3 humano. Observámos uma grande infiltração de células T humanas no contexto da pele humana, apenas em ratos que tinham sido infundidos com "grânulos + IL-7" que

estimularam os linfócitos T. Em condições "OKT-3" o nível de infiltração de células T do tecido, se houvesse, foi claramente de reposição. A Figura 39 mostra exemplos representativos desses resultados.

## **Conclusão**

Embora seja geralmente reconhecido que as células T desempenham um papel central na geração de imunidade a patógenos, a tumores, e imuno-deficiências e doenças auto-imunes, tem sido difícil usá-las como marcadores de diagnóstico e prognóstico da imunocompetência em humanos. Além disso, as técnicas adequadas para a expansão linfócitos de memória intermediária e central não polarizada poli-funcional estão em falta.

Os resultados descritos neste relatório identificam novas condições de cultura que:

A) permitem a acumulação Ag-independente de células T de memória em preparado *in vivo*;

B) a expansão guiada de linfócitos de memória central, apesar da estimulação policlonal de linfócitos e da manipulação genética.

Resultados indicam que IL-7 e IL-15 podem ser usados para enriquecer amostras biológicas, tais como LN periférico, sangue e tumor para preparados Ag *in vivo* (tumor/patógenos /alérgenos/próprios antígenos) específicos para células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Quando comparado com IL-2, IL-7 mantém

melhor o fenótipo de linfócitos originais e representação e favorece melhor a sobrevivência de todos os subconjuntos de linfócitos T, permitindo a detecção e expansão de linfócitos T de memória CD4<sup>+</sup> raros.

A capacidade de enumerar células T Ag-específicas CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> no contexto da infecção viral crónica, doença auto-imune, vacinação ou imunoterapia proporcionaria uma medida directa para a imunocompetência do paciente ou doença e auxiliaria os médicos na escolha da terapia mais adequada. Além disso, a possibilidade de enriquecer células T de memória *in vivo*, sem alterar o seu fenótipo pode melhorar a sua caracterização, bem como a sua exploração para a resposta imune nas estratégias de imunoterapia adoptiva. Finalmente, as células T de memória central geneticamente modificadas pode ser obtida mediante activação CD3/CD28 e cultura com as citocinas homeostáticas. Quando infundidas em hospedeiros imunodeficientes condicionados as células T de memória central geneticamente modificadas i) enxertam e expandem em níveis significativamente mais elevados do que as células T de memória efectora geneticamente modificadas e ii) são mais potentes do que os linfócitos de memória efectora geneticamente modificados a induzem uma resposta imune para o hospedeiro e antígenos alogénicos.

Estes resultados demonstram que linfócitos de memória central geneticamente modificados totalmente funcionais podem ser obtidos e explorados para a cura de doenças humanas.

## REFERÊNCIAS

1. Jenkins, M.K., A. Khoruts, E. Ingulli, D.L. Mueller, S.J. McSorley, R.L. Reinhardt, A. Itano, and K.A. Pape. 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19:23-45.
2. Sprent, J., and C.D. Surh. 2002. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20:551-579.
3. Marrack, P., J. Bender, D. Hildeman, M. Jordan, T. Mitchell, M. Murakami, A. Sakamoto, B.C. Schaefer, B. Swanson, and J. Kappler, 2000. Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol* 1:107-111.
4. Novak, E.J., A.W. Liu, G.T. Nepom, and W.W. Kwok. 1999. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest* 104:R63-67.
5. Mallone, R., and G.T. Nepom. 2004. MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin Immunol* 110:232-242.
  
6. Boursalian, T.E., and K. Bottomly. 1999. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol* 162:3795-3801.
7. Seddon, B., and R. Zamoyka. 2002. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *J Immunol* 169:3752-3759.
8. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
9. Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyka. 2003. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4:680-686.
10. Kondrack, R.M., J. Harbortson, J.T. Tan, M.E. McBreen, C.D. Surh, and L.M. Bradley. 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 198:1797-1806.
11. Li, J., G. Huston, and S.L. Swain. 2003. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 198:1807-1815.
12. Lenz, D.C., S.K. Kurz, E. Lemmens, S.P. Schoenberger, J. Sprent, M.B. Oldstone, and D. Homann. 2004. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9357-9362.
13. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 194:1711-1719.
14. Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 200:725-735.
15. Jaleco, S., L. Swainson, V. Dardalhon, M. Burjanadze, S. Kinet, and N. Taylor. 2003. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 171:61-68.

16. Jameson, S.C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2:547-556.
20. Appelbaum, F.R. 2001. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 411:385-389.
21. Bonini, C., G. Ferrari, S. Verzeletti, P. Servida, E. Zappone, L. Ruggieri, M. Ponzoni, S. Rossini, F. Mavilio, C. Traversari, and C. Bordignon. 1997. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276:1719-1724.
22. Fehse, B., F.A. Ayuk, N. Kroger, L. Fang, K. Kuhlcke, M. Heinzelmann, T. Zabelina, A.A. Fauser, and A.R. Zander. 2004. Evidence for increased risk of secondary graft failure after in vivo depletion of suicide gene-modified T lymphocytes transplanted in conjunction with CD34+-enriched blood stem cells. *Blood* 104:3408-3409.
23. Tiberghien, P., C. Ferrand, B. Lioure, N. Milpied, R. Angonin, E. Deconinck, J.M. Certoux, E. Robinet, P. Saas, B. Petracca, C. Juttner, C.W. Reynolds, D.L. Longo, P. Herve, and J.Y. Cahn. 2001. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97:b3-72.
27. Verzeletti, S., C. Bonini, S. Markt, N. Nobili, F. Ciceri, C. Traversari, and C. Bordignon. 1998. Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. *Hum Gene Ther* 9:2243-2251.
28. Bondanza, A., V. Valtolina, Z. Magnani, M. Ponzoni, K. Fleischhauer, M. Bonyhadi, C. Traversari, F. Sanvito, S. Toma, M. Radrizzani, S. La Seta-Catamancio, F. Ciceri, C. Bordignon, and C. Bonini. 2005. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood*
44. Sauce, D., M. Bodinier, M. Garin, B. Petracca, N. Tonnelier, A. Duperrier, J.V. Melo, J.F. Apperley, C. Ferrand, P. Hervé, F. Lang, P. Tiberghien, and E. Robinet. 2002. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood* 99:1165-1173.
45. Cavalieri, S., S. Cazzaniga, M. Geuna, Z. Magnani, C. Bordignon, L. Naldini, and C. Bonini. 2003. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood* 102:497-505.
46. Markt, S., Z. Magnani, F. Ciceri, S. Cazzaniga, S.R. Riddell, C. Traversari, C. Bordignon, and C. Bonini. 2003. Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 101: 1290-1298.
47. Qasim, W., A. Trasher, D. King, S. Verfuether, J. Buddle, and H.B. Gaspar. 2002. Impact of retroviral gene transfer on T cell phenotype and function. *Blood* 100(11): Abstract 2562.
48. van Roon, J.A., C.A. Glaudemans, J.W. Bijlsma, and F.P. Lafeber. 2003. Differentiation of naive CD4+ T cells towards T helper 2 cells is not impaired in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 5:R269-76.
49. Dupré, L., S. Trifari, A. Follenzi, F. Marangoni, T. Lain de Lera, A. Bernad, S. Martino, S. Tsuchiya, C. Bordignon, L. Naldini, A. Aiuti, and M.G. Roncarolo. 2004. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther* 10:903-15.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* para a obtenção de uma variedade de população de células T de memória geneticamente modificadas, compreendendo as etapas de:
  - a) activação de linfócitos com pelo menos dois anticorpos de activação agonista do receptor específicos no qual um dos anticorpos de activação de agonista do receptor dos linfócitos é específico para o polipeptídeo CD3 e os outros anticorpos de activação de agonista do receptor dos linfócitos é específico para o anticorpo CD28;
  - b) exposição dos linfócitos activados a uma quantidade efectiva de pelo menos IL-7 e IL-15, capaz de expandir selectivamente populações de células T de memória;
  - c) inserção e expressão de um gene exógeno por meio de um vector apropriado para as células obtidas em b).
2. Método *in vitro* da reivindicação 1 em que as ditas populações de células T de memória compreendem populações de células CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> e/ou  $\gamma\delta$  e/ou NKT T.
3. Método *in vitro* das reivindicações 1 ou 2 em que os ditos linfócitos são derivados de uma amostra biológica pertencente ao grupo de: sangue e outras amostras líquidas de origem biológica, amostras de tecido sólido, culturas de tecidos de células derivadas, e os descendentes dos mesmos, células isoladas a partir de amostras biológicas.
4. Método *in vitro* das reivindicações 1 a 3 em que o agonista de activação do receptor de linfócitos

específicos é conjugado para suportes de imitação de células.

5. Método *in vitro* das reivindicações 1 a 4 em que o suporte de imitação de células são grânulos paramagnéticos.
6. Método *in vitro* das reivindicações 1 a 5 em que o vector é um vector viral.
7. Método *in vitro* das reivindicações 1 a 6 em que o gene exógeno codifica para um gene suicida, e/ou um gene marcador e/ou uma molécula biologicamente activa, e/ou um receptor, e/ou um factor solúvel retida na célula ou libertado para fora da célula, e/ou um gene que confere resistência a um pró-fármaco.

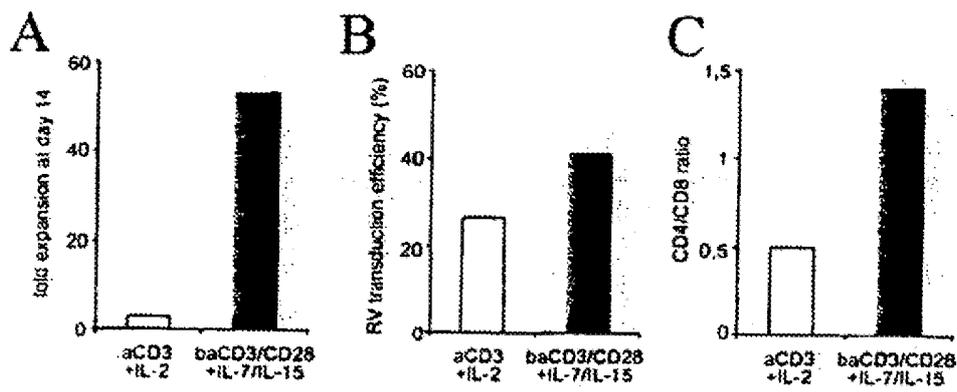


Figura 27

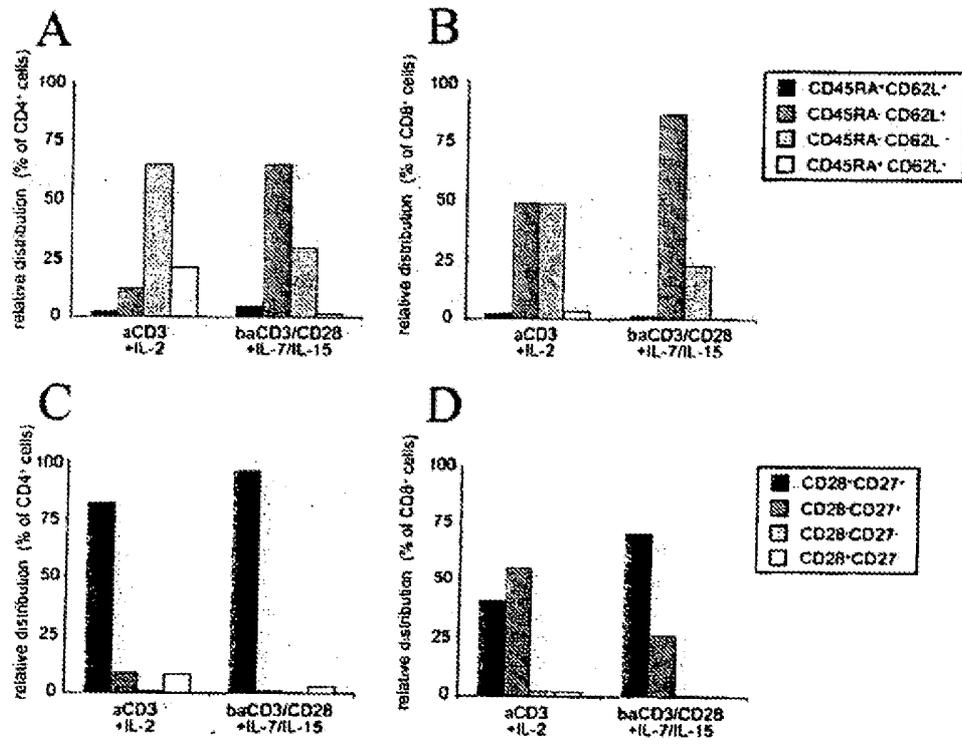


Figura 28

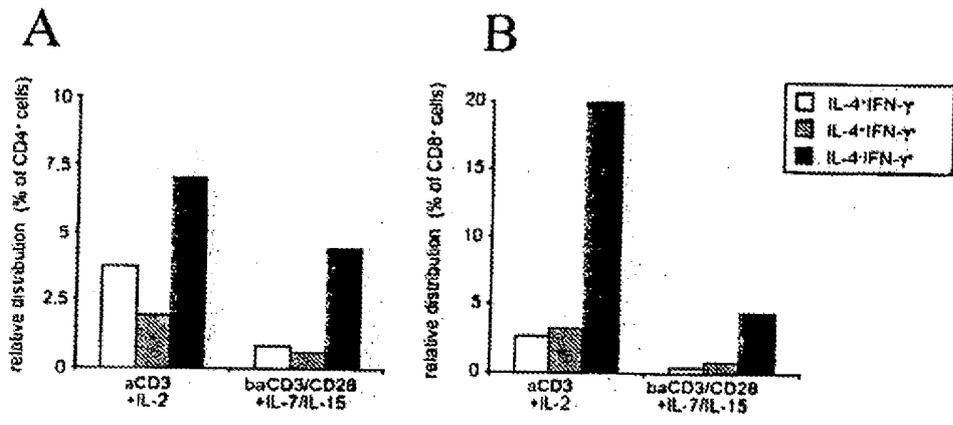


Figura 29

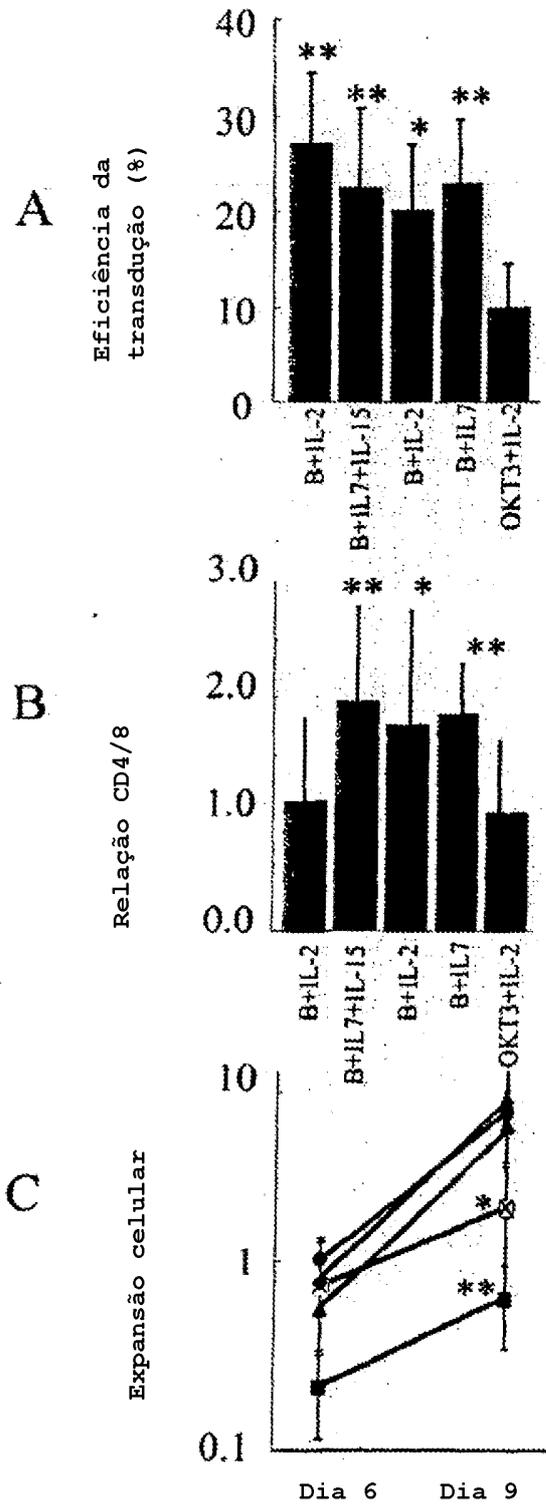


Figura 30

- \* B
- ◆ B+IL-7+IL-15
- ▲ B+IL2
- ♦ B+IL7
- OKT3 + IL-2

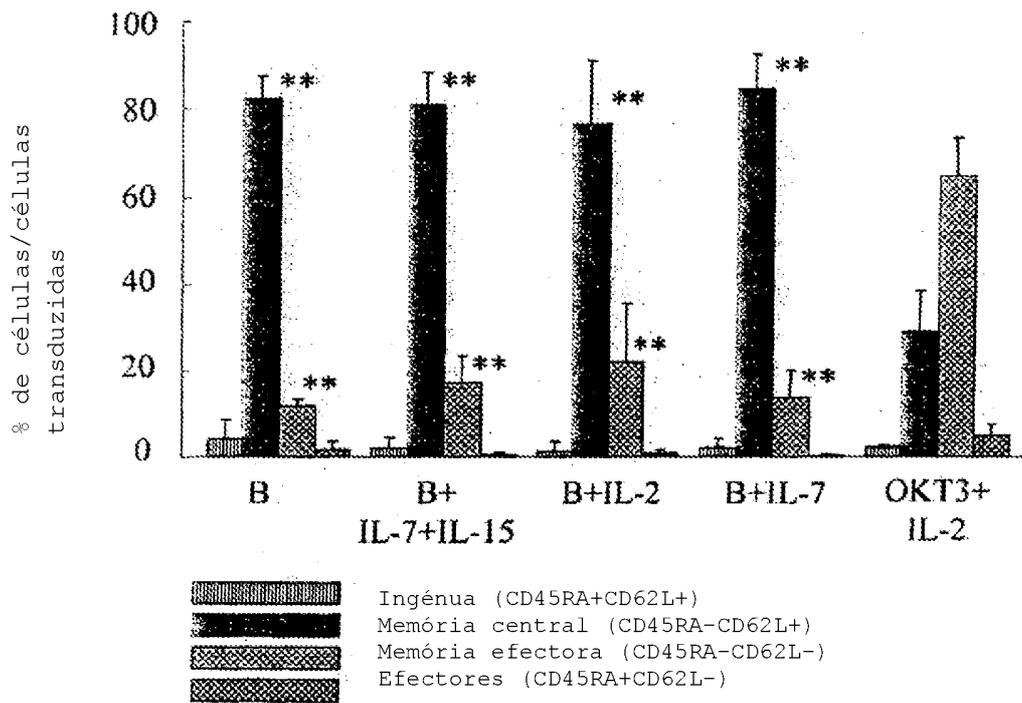
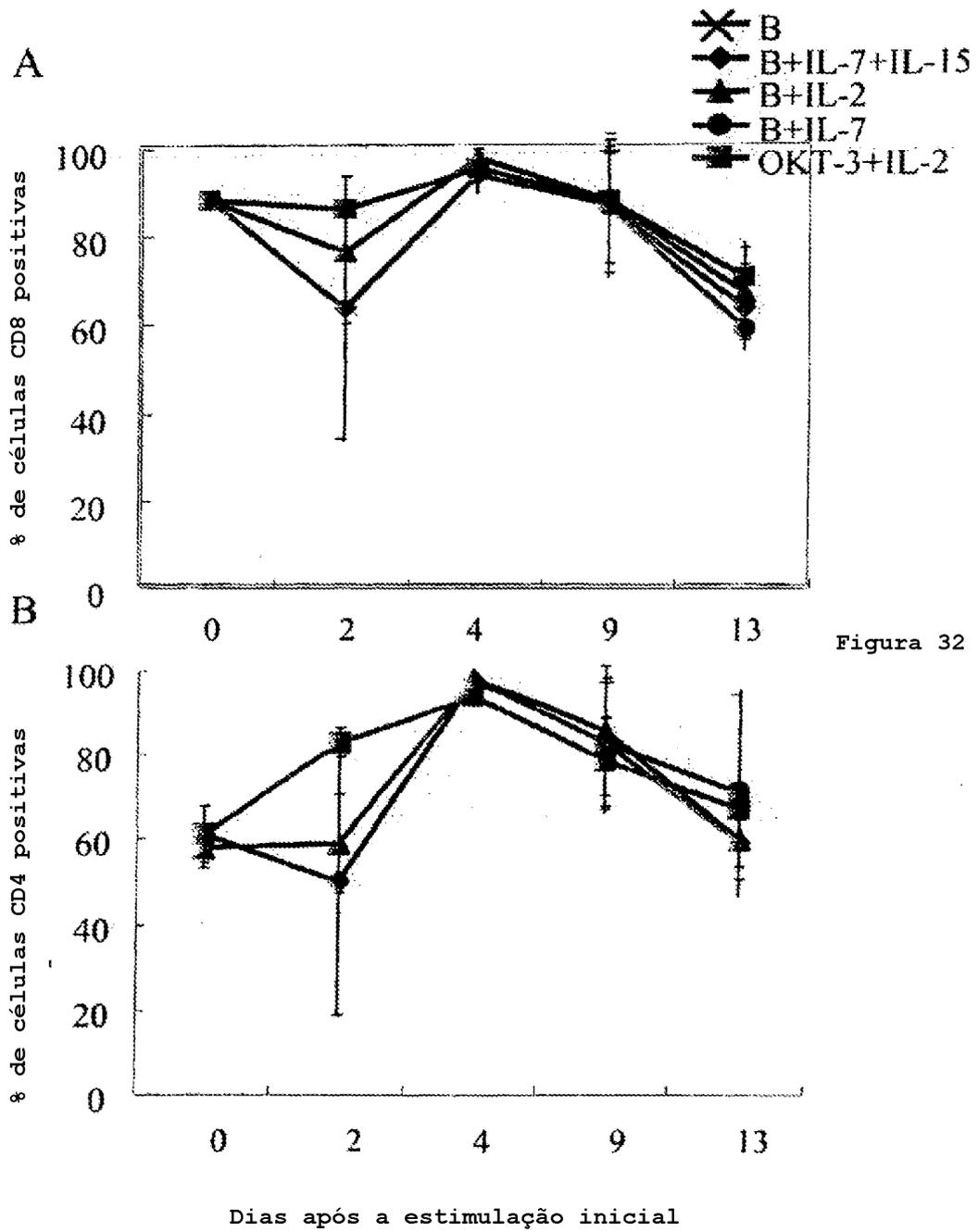


Figura 31



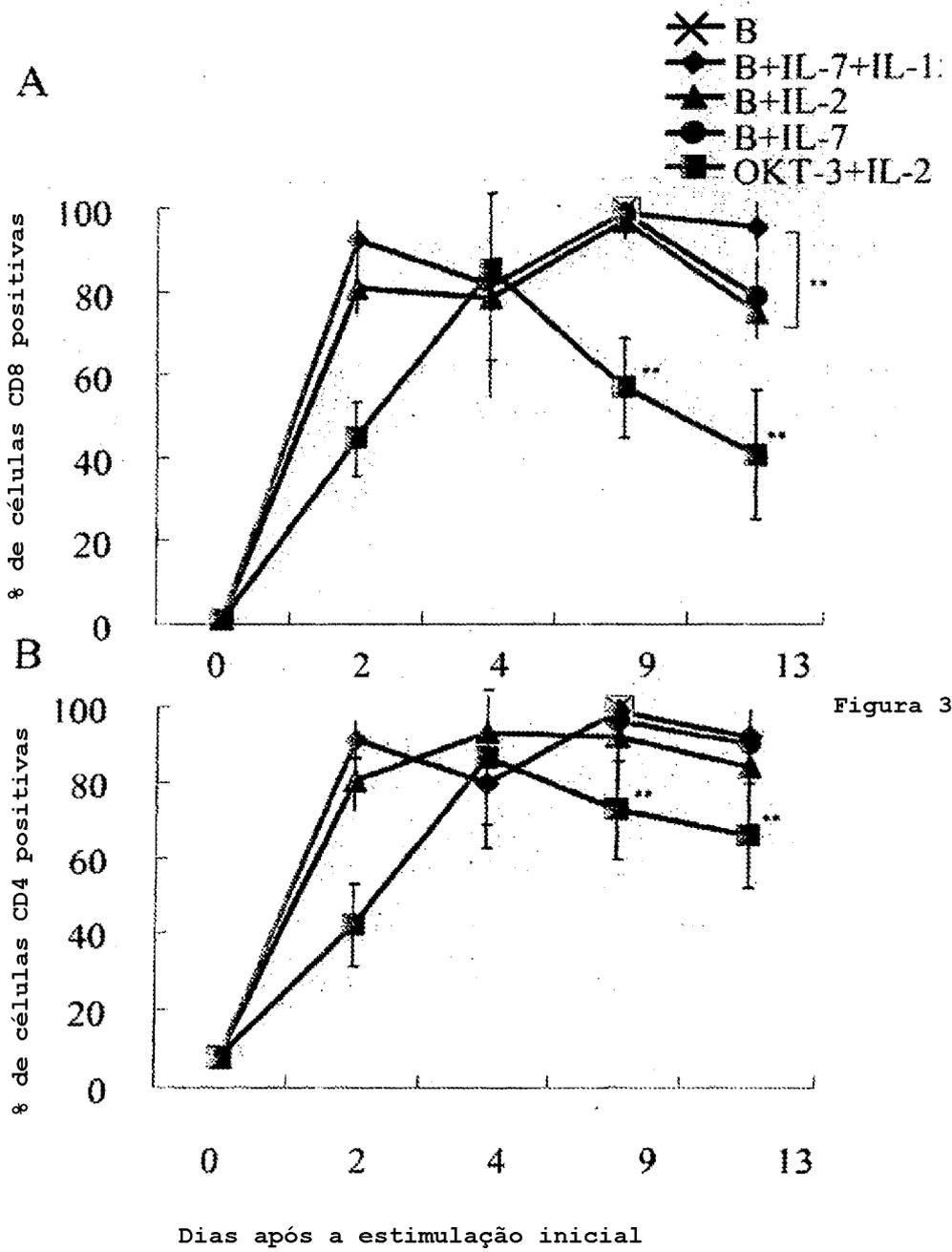
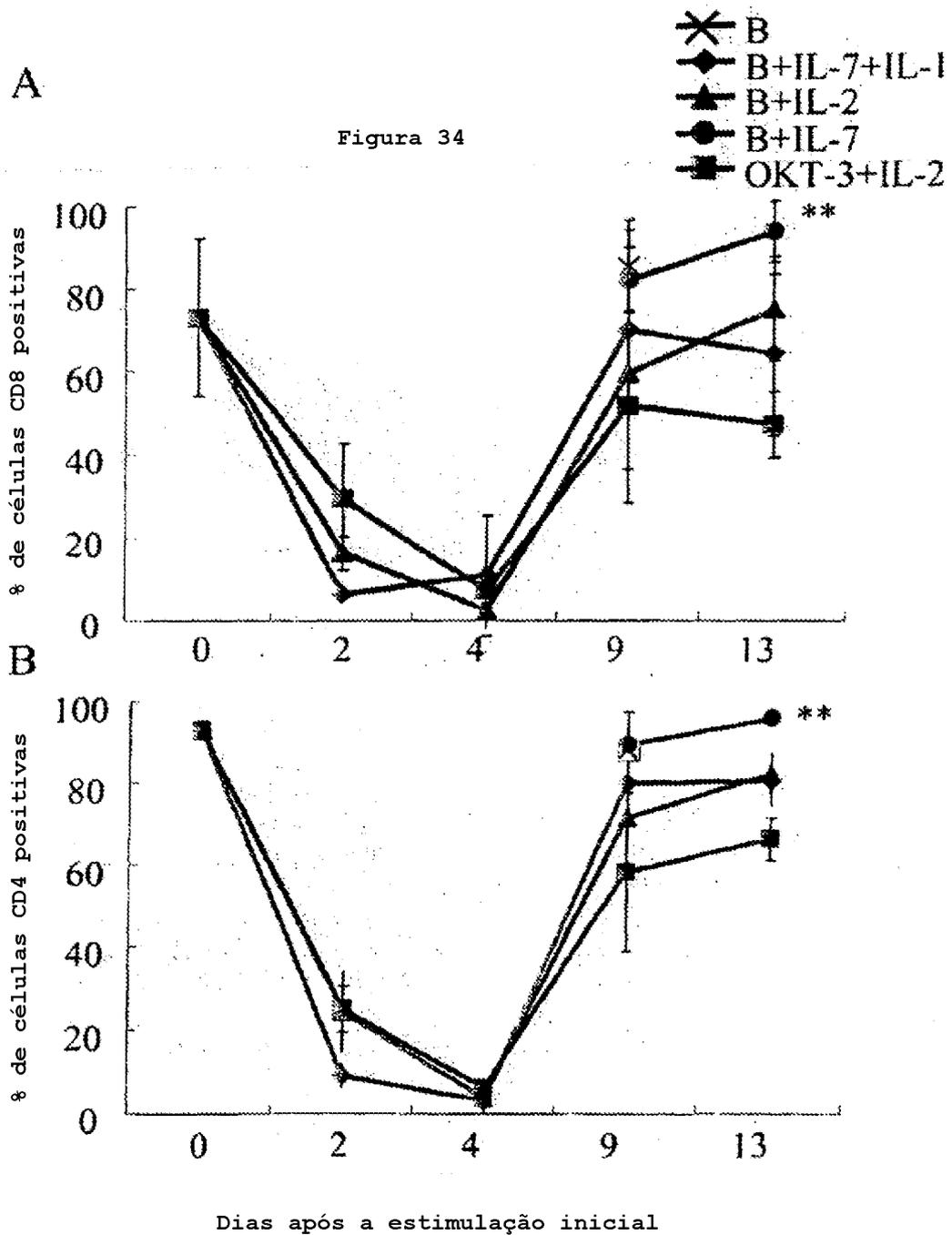
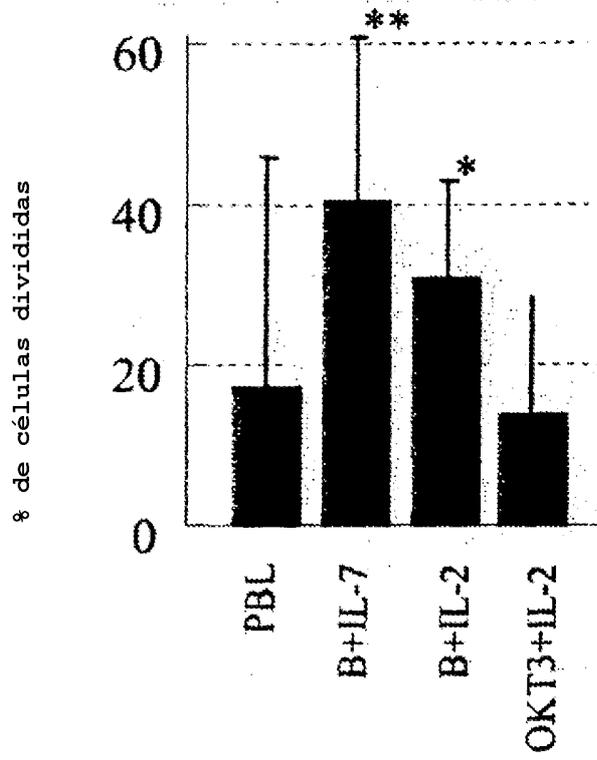


Figura 33



A



B

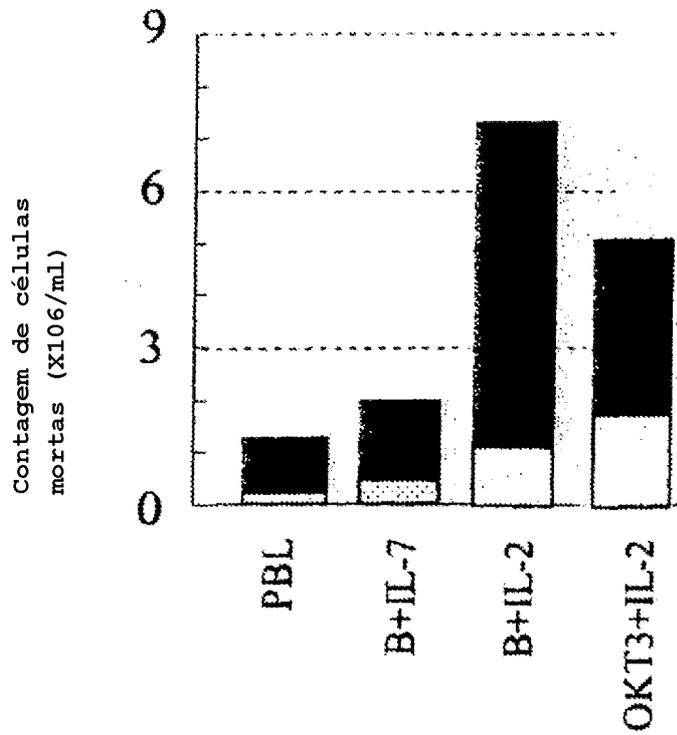


Figura 35

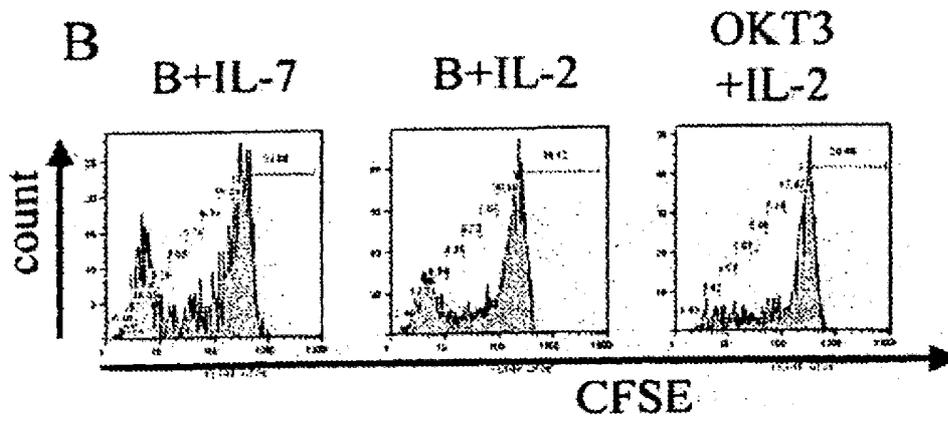
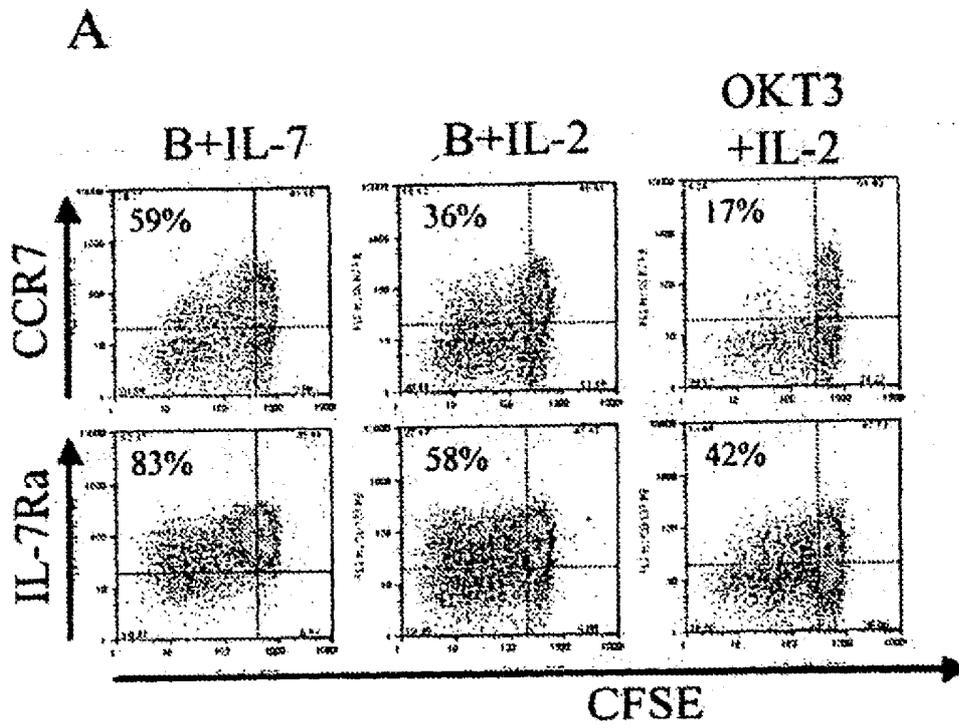


Figura 36

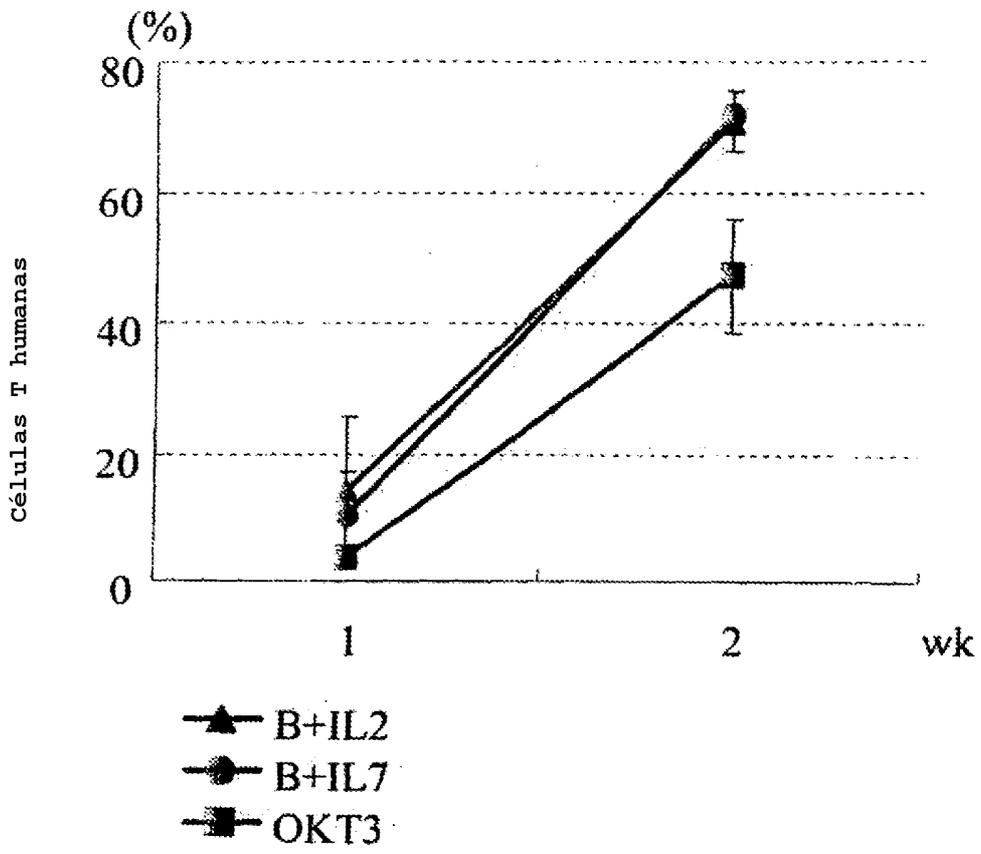
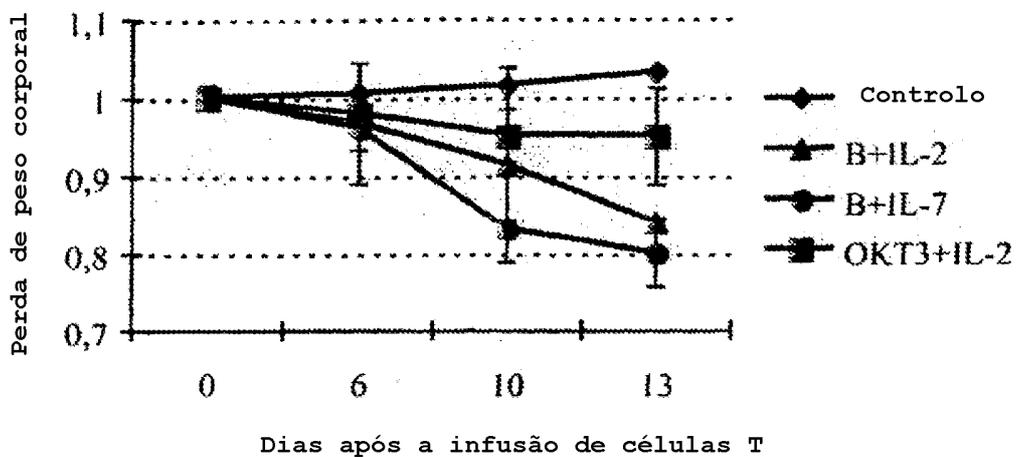


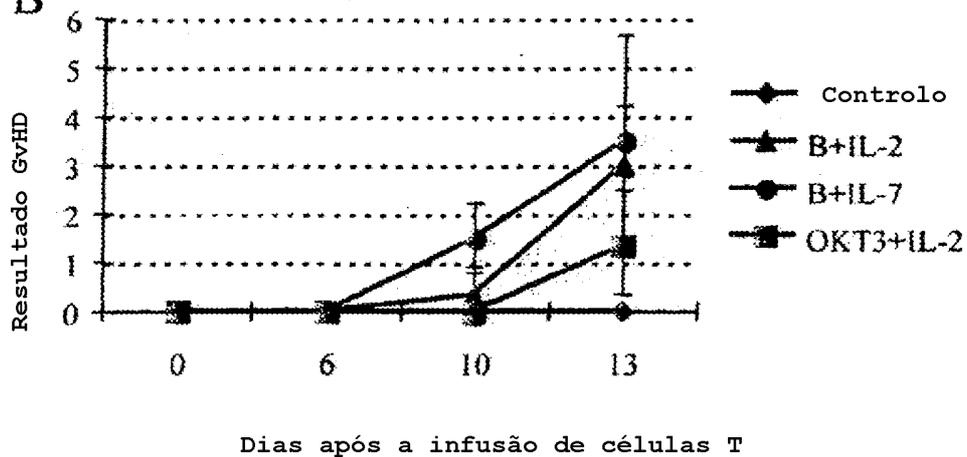
Figura 37

A

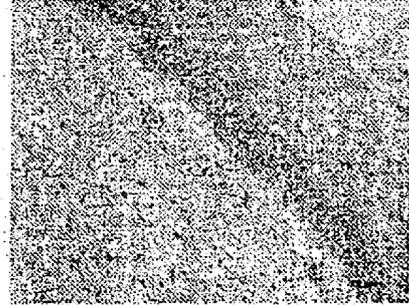
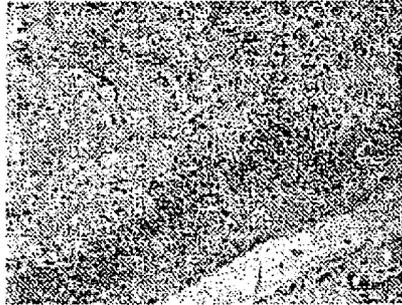
Figura 38



B



HE



$\alpha$ hCD3



B+IL-7

OKT3+IL-2

Figura 39