

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 152**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05291429 .8**  
96 Fecha de presentación: **01.07.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1739166**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **OBTENCIÓN DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS DE ANTÍGENOS DE LOS ALIMENTOS O DE AUTOANTÍGENOS A PARTIR DE UNA POBLACIÓN DE LEUCOCITOS O PBMC.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.11.2011**

73 Titular/es:  
**TXCELL S.A.  
ALLÉE DE LA NERTIÈRE, LES CARDOULINES  
06560 VALBONNE, FR y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE  
MÉDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:  
**Groux, Hervé;  
Cottrez, Françoise;  
Foussat, Arnaud y  
Brun, Valérie**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 368 152 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Obtención de células Tr1 específicas de antígenos de los alimentos o de autoantígenos a partir de una población de leucocitos o PBMC.

5 La invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de una población de células Tr1 específicas de antígenos de los alimentos o de autoantígenos de una población de leucocitos o PBMC, que comprende estimular la población de leucocitos o PBMC con el antígeno de alimentos o el autoantígeno, y recuperar la población de células Tr1 específicas del antígeno de los alimentos o el autoantígeno de la población de células estimuladas. Preferiblemente, la población de PBMC o leucocitos se vuelve a estimular por lo menos una vez con el mismo antígeno después de la etapa (1), en presencia de IL-2 y por lo menos una interleucina seleccionada entre IL-4 o IL-13. El método *in vitro* puede además comprender una tercera etapa de expandir la población de células Tr1 específicas del antígeno recuperadas, ventajosamente poniéndolas en contacto con células alimentadoras capaces de expresar factores necesarios para dicha expansión. Preferiblemente, las células alimentadoras son células alimentadoras de insectos recombinantes.

15 Entre las poblaciones de células T, existen ahora datos acumulativos de una subpoblación de células T diferente y con una nueva funcionalidad, denominadas células reguladoras Tr1 o células Tr1. Los inventores demostraron que las células T reguladoras 1 (Tr1) podrían utilizarse para tratar enfermedades inflamatorias (es decir, enfermedad de Crohn (H. Groux et al. Nature 1997, 389, 737-742), inflamación de la piel (Foussat et al. 2003 J. Immunol. 171, 5018-5026), aterosclerosis (Mallat et al. Circulation 2003, 108, 1232-1237) o esclerosis múltiple (Barrat et al. 2002, 195, 603-616). En todos estos modelos, se demostró que las células Tr1 antiinflamatorias se dirigían contra un antígeno específico y que era necesaria la administración de ese antígeno, preferentemente en el sitio de inflamación, para estimular las células Tr1 a que induzcan sus funciones antiinflamatorias. Por lo tanto, con el fin de usar las células Tr1 para tratar enfermedades humanas, debe ser posible aislar células Tr1 específicas de antígenos. No obstante, se ha comprobado que esto es muy difícil.

25 La solicitud de patente internacional WO 02/090357 describe la preparación de células Tr1 estimulando células T CD4<sup>+</sup> con células L de ratón transfectadas con HLA-II DR1 y CD58 (LFA3), seleccionando células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y expandiendo clones en presencia de IL-2 e IL-4.

30 Los inventores también han demostrado que las células Tr1 expresan marcadores específicos de superficie y que podrían caracterizarse por la coexpresión de los marcadores CD3 y CD4 como también por la expresión de CD49b y un alto nivel de expresión de CD18, y, si corresponde, por la demostración de una expresión excesiva de genes que codifican las proteínas CD4, PSGL-1, PECAM-1 y alfaV/beta3 (véase la solicitud de patente internacional publicada con el número WO 2005/000344).

35 Sorprendentemente, los inventores han observado que las células Tr1 purificadas aisladas de sangre humana basada en la expresión de estos marcadores (y en consecuencia las células Tr1 presentes en una población de PBMC o leucocitos) proliferaron vigorosamente en respuesta a antígenos de alimentos o autoantígenos, y que la respuesta proliferativa de estas células podría mantenerse con estimulación, usando IL-2 e IL-4 (IL para interleucina). Este potencial ofrece una importante ventaja frente a la técnica anterior, ya que de acuerdo con el conocimiento común del experto en la técnica, anteriormente era necesario aislar en primer lugar las células T vírgenes específicas de antígenos de una población de PBMC, en segundo lugar inducir la diferenciación de las células Tr1 específicas de antígenos, mientras que ahora es posible obtener células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos directamente de una población de PBMC (o leucocitos). En la presente invención, el método *in vitro* para obtener células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos se simplifica, y se aumenta la seguridad de los pacientes a quienes se les administran estas células, ya que estas células no se han modificado en términos de calidad.

45 En consecuencia, el objeto de la presente invención es un método *in vitro* para obtener una población de células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos de una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), comprendiendo dicho método:

- 1) estimular la población de PBMC o leucocitos con el antígeno del alimento o el autoantígeno,
- 2) recuperar la población de células Tr1 específicas del antígeno del alimento o el autoantígeno de la población de células estimuladas,
- 50 3) expandir la población de células Tr1 específicas del antígeno recuperada en la etapa (2) en un medio de cultivo Mp,

donde dicha etapa de expansión comprende:

- a) cultivar a una temperatura T1 en un medio de cultivo Mf, células alimentadoras capaces de expresar los factores del grupo (A) que comprenden
- 55 - un anticuerpo anti-CD3 modificado, donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en el reemplazo

del dominio intracitoplásmico anti-CD3 de la cadena pesada anti-CD3 con un dominio transmembrana, estando dicho anticuerpo anti-CD3 modificado anclado a la membrana celular de las células alimentadoras y siendo susceptible a interactuar con el complejo de proteínas CD3/TCR de las células T, o una de sus variantes,

- 5 - la proteína CD80 o CD86, preferiblemente la proteína CD80, anclada a la membrana celular de las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con la proteína CD28 de las células T, o una de sus variantes, y
- la proteína CD58 anclada a la membrana celular de las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con la proteína CD2 de las células Tr1, o una de sus variantes,
- 10 - IL-2 segregada por las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con el receptor de IL-2 de las células Tr1, o una de sus variantes, y
- una interleucina seleccionada de IL-4 o interleucina 13 (IL-13), preferiblemente IL-4, siendo dicha interleucina segregada por las células alimentadoras y susceptible a interactuar con el receptor de IL-4 de las células Tr1, o una de sus variantes,

15 permitiendo dicha temperatura T1 la proliferación de dichas células alimentadoras,

b) poner en contacto las células alimentadoras obtenidas en la etapa (a) depuradas o no de su medio de cultivo Mf, con la población de células Tr1 específicas de antígenos contenida en el medio de cultivo Mp, donde dicho medio de cultivo Mp no contiene inicialmente dicho grupo de factores que comprenden, con el fin de obtener una mezcla que contenga la población de células Tr1 específicas de antígenos, células alimentadoras y el medio de cultivo Mp,

20 c) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (b) que contiene los factores del grupo que son expresados por las células alimentadoras en el medio de cultivo Mp, donde dicha etapa (c) de cultivar se lleva a cabo a una temperatura T2 que es de por lo menos aproximadamente 35°C, de forma tal que:

- la población de células Tr1 específicas de antígenos prolifera, y
- 25 - las células alimentadoras no proliferan,

y donde la población de células Tr1 específicas de antígenos se expande,

d) recuperar la población de células Tr1 específicas de antígenos.

Los leucocitos abarcan varios tipos de células que se caracterizan por su importancia, su distribución, su número, su vida útil y su potencialidad. Estos tipos son los siguientes: los leucocitos polinucleares o granulares, entre los cuales se encuentran los leucocitos eosinofílicos, neutrofilícos y basofílicos, y las células mononucleares, o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), que son grandes glóbulos blancos y consisten en los tipos celulares del sistema inmunitario (linfocitos y monocitos). Los leucocitos o las PBMC pueden separarse de la sangre periférica a través de un método conocido por los expertos en la técnica. Ventajosamente, para la separación de las PBMC, se puede usar centrifugación, preferiblemente la centrifugación en gradiente de densidad, preferiblemente la centrifugación en gradiente de densidad discontinua. Una alternativa es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. En determinadas realizaciones, las PBMC se aíslan típicamente del hemoderivado de sangre completa mediante Ficoll-Hypaque, usando procedimientos estándar.

En otras realizaciones, las PBMC se recuperan mediante leucocitaféresis.

40 El término "antígeno" en la expresión "población de células Tr1 específicas de antígeno" se refiere a un péptido inmunogénico. Los péptidos inmunogénicos son péptidos que se unen a moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de un individuo y que son reconocidas por los receptores de células T de dicho individuo.

Los términos proteína, polipéptido empleados en la presente solicitud se refieren indistintamente a una molécula formada por la unión en una cadena larga de elementos más pequeños, los aminoácidos.

45 La expresión "antígeno de alimentos" se refiere a un péptido inmunogénico que proviene de los alimentos, como antígenos de alimentos de la siguiente lista no limitativa: antígenos bovinos tales como lipocalina, S100 de unión a Ca, alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina, albúmina de suero bovino, inmunoglobulina o caseínas. Los antígenos de alimentos pueden ser también antígenos de salmón atlántico tales como parvalbúmina, antígenos de pollo tales como ovomucoide, ovalbúmina, Ag22, conalbúmina, lisozima o albúmina de suero de pollo, antígenos de langostino tales como tropomiosina, antígenos de trigo tales como aglutinina u omega-5 gliadina, antígenos de apio tales como profilina de apio, antígenos de zanahoria tales como profilina de zanahoria, antígenos de manzana tales como thaumatina, proteína de transferencia de lípidos de manzana, profilina de manzana, antígenos de pera tales como profilina de pera, isoflavona reductasa, antígenos de palta tales como endoquitinasa, antígenos de damasco tales

como proteína de transferencia de lípidos de damasco, antígenos de durazno tales como proteína de lípidos de durazno o profilina de durazno, antígenos de soja tales como HPS, profilina de soja o (SAM22) PR-10 prot.

El término "autoantígeno" se refiere a un péptido inmunogénico derivado de una proteína de dicho individuo. Puede ser, por ejemplo, un autoantígeno de la siguiente lista no limitativa: receptor de acetilcolina, actina, adenina translocador de nucleótidos,  $\beta$ -adrenorreceptor, descarboxilasa aromática de L-aminoácido, receptor de asialoglucoproteína, proteína bactericida/potenciadora de permeabilidad (BPI), receptor sensor de calcio, enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol, cadena  $\alpha_V$  de colágeno de tipo IV, citocromo P450 2D6, desmina, desmogleína-1, desmogleína-3, F-actina, GM-gangliósidos, glutamato descarboxilasa, receptor de glutamato, H/K ATPasa, 17- $\alpha$ -hidroxilasa, 21-hidroxilasa, IA-2 (ICAS12), insulina, receptor de insulina, factor intrínseco de tipo 1, antígeno de la función de los leucocitos 1, glucoproteína asociada a mielina, proteína básica de mielina, proteína mielina oligodendrocito, miosina, P80-coilina, complejo de piruvato y deshidrogenasa E2 (PDC-E2), simporte yoduro de sodio, SOX-10, proteína compartida de músculo ocular y tiroides, tiroglobulina, peroxidasa de tiroides, receptor de tirotrópina, transglutaminasa de tejido, coactivador de transcripción p75, triptófano hidroxilasa, tirosinasa, tirosina hidroxilasa, ACTH, aminoacil-tRNA-histidil sintetasa, cardiolipina, anhidrasa carbónica II, proteínas asociadas a centrómero, ATPasa estimulada por nucleosomas dependientes de DNA, fibrilarina, fibronectina, glucosa 6 fosfato isomerasa, beta 2-glucoproteína I, golgina (95, 97, 160, 180), proteínas de choque térmico, proteína hemidesmosomal 180, histona H2A, H2B, queratina, receptor de IgE, proteína cisana Ku-DNA, nucleoproteína Ku, fosfoproteína La, mieloperoxidasa, proteinasa 3, RNA polimerasa I-III, proteína de reconocimiento de señal, topoisomerasa I, tubulina, vimenscina, proteína básica de oligodendrocito asociada a mielina (MOBP), proteína de proteolípidos, proteína específica de oligodendrocitos (OSP/Claudina 11), 3'fosfodiesterasa de nucleótido cíclico (CNPasa), antígeno BP 1 (BPAG1-e), transaldolasa (TAL), autoantígenos mitocondriacos humanos PDC-E2 (Novo 1 y 2), OGDC-E2 (Novo 3) y BCOADC-E2 (Novo 4), penfigoide bulloso (BP)180, laminina 5 (LN5), proteína DEAD-box 48 (DDX48) o antígeno asociado a insulinoma 2.

Los antígenos tales como antígenos bacterianos o víricos se excluyen de la expresión "antígeno de alimentos o autoantígeno".

El antígeno de alimentos o autoantígeno, que está principalmente compuesto por una secuencia de aminoácidos, se puede sintetizar mediante las técnicas usuales, como el método Fmoc, si se conoce la secuencia de aminoácidos, o por tecnologías de DNA recombinante (véase Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)). Algunos antígenos de los alimentos o autoantígenos también se comercializan (Sigma, L'Isle d'Abeau, Francia). El antígeno de alimentos o el autoantígeno también se puede extraer.

Preferiblemente, la población de células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o de autoantígenos se obtiene de una población de PBMC.

Más preferiblemente, la población de PBMC o leucocitos se vuelve a estimular por lo menos una vez con el mismo antígeno después de la etapa (1), en presencia de interleucina 2 (IL-2) y por lo menos una interleucina seleccionada del grupo que consiste en interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13).

La frecuencia de la estimulación del antígeno de los alimentos o el autoantígeno puede ser por lo menos una vez, preferiblemente una vez por semana, durante algunas semanas (por lo general, aproximadamente tres), o varias veces en intervalos de cinco a doce días. Se pueden realizar múltiples estimulaciones intercambiando una porción del sobrenadante de cultivo con la misma cantidad de medio de cultivo nuevo de PBMC o leucocito que contiene el antígeno.

Las IL-2 e IL-4 utilizadas para la re-estimulación de la población de PBMC o leucocitos puede sintetizarse, o se pueden emplear interleucinas recombinantes, y el experto en la técnica tendrá amplia experiencia con los métodos para obtener dichas interleucinas (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)). La IL-2 e IL-4 pueden adquirirse de diferentes fuentes, como R&D Systems y Peptotech.

Preferiblemente, el antígeno de alimentos o el autoantígeno es un antígeno recombinante o sintetizado.

Más preferiblemente, el antígeno de alimentos se selecciona entre ovalbúmina, caseína, proteína de soja, sus fragmentos, sus variantes o sus mezclas.

El término "variante" del antígeno de alimentos o autoantígeno se refiere en la presente solicitud a un antígeno que es prácticamente idéntico al antígeno natural y que comparte la misma actividad biológica. La diferencia mínima entre el antígeno natural y su variante puede yacer, por ejemplo, en una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos. Dichas variantes pueden contener, por ejemplo sustituciones de aminoácidos conservadoras en las que los residuos de aminoácidos se reemplazan con residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo las cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares descargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolinea,

fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Más preferiblemente, el antígeno de alimentos se selecciona de ovalbúmina de huevo de pollo de la secuencia SEQ ID N°23, alfa S1-caseína bovina en la secuencia SEQ ID N°24, beta-caseína bovina de la secuencia SEQ ID N°25, o secuencias que tienen por lo menos 70%, preferiblemente 75, 77, 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con una de las secuencias SEQ ID N°23, SEQ ID N°24 y SEQ ID N°25.

En otra realización preferida, el autoantígeno se selecciona entre insulina, proteína básica de mielina, sus fragmentos, variantes o mezclas.

La expresión "estimular la población de PBMC o leucocitos con el antígeno de alimentos o autoantígeno", tal como se emplea en la presente memoria, significa añadir el antígeno a la población de PBMC o leucocitos y al cultivo para hacer reaccionar con células T de dicha población de PBMC o leucocitos. Para producir una población de células Tr1 específicas de antígeno de alimentos o autoantígeno, la población de PBMC o leucocitos se pone en contacto con un antígeno de acuerdo con la presente invención en una forma adecuada para desencadenar una señal de activación primaria en las células T de dicha población de PBMC o leucocitos, es decir, el antígeno se presenta a la población de PBMC o leucocitos de modo tal que se desencadena una señal en las células T a través del complejo CD3/TCR. Por ejemplo, el antígeno se puede presentar a las PBMC o a los leucocitos en una forma soluble (o bien directamente para formar complejos con las moléculas MHC expresadas por las PBMC o los leucocitos, o el antígeno puede acoplarse a una forma soluble, polimérica o una superficie (plástica) unida de moléculas MHC) o mediante una célula que presenta antígenos (APC) junto con una molécula MHC. Una célula que presenta antígenos (APC), como una célula B, macrófago, monocito, célula dendrítica, célula Langerhans u otra célula que pueda presentar antígeno a las células T de dicha población de PBMC o leucocitos puede incubarse con las PBMC o los leucocitos en presencia del antígeno (por ejemplo, un antígeno soluble) tal como la célula que presenta antígenos presenta el antígeno a las PBMC o los leucocitos. Alternativamente, las APC pueden pre-incubarse con el antígeno antes de añadirse a las PBMC o a los leucocitos. Alternativamente, una célula que expresa el antígeno de alimentos o el autoantígeno puede incubarse con la población de PBMC o leucocitos.

Preferiblemente, la estimulación de la población de PBMC o leucocitos se realiza en los pocillos de una microplaca, un matraz de cultivo celular o una bolsa de cultivo celular. Los medios de cultivo de PBMC o leucocitos que se pueden utilizar se conocen en la técnica: por ejemplo, las PBMC o los leucocitos pueden estimularse en un medio RPMI enriquecido con suero humano o con X-vivo 15 (Cambrex).

Ventajosamente, la población de PBMC estimulada en la etapa (1) contiene entre  $0,01,10^6$  y  $100,10^6$  células/mL, preferiblemente entre  $0,2,10^6$  y  $5,10^6$  células/mL, más preferiblemente entre  $0,1,10^6$  y  $3,10^6$  células /mL, incluso más preferiblemente entre  $0,5,10^6$  y  $2,5,10^6$  células/mL y lo más preferiblemente entre  $10^6$  y  $2,10^6$  células/mL.

Más ventajosamente, el antígeno de alimentos o autoantígeno utilizado para estimulación de la población de PBMC en la etapa (1) está en forma soluble de 0,1 µg/mL a 5 mg/mL, preferiblemente de 1 a 200 µg/mL.

No obstante, el experto en la técnica sabe que la cantidad específica del antígeno de alimentos o autoantígeno utilizada para estimulación de la población de PBMC o leucocitos depende de qué antígeno de alimentos o autoantígeno se utilice.

En otra realización particular, la población de PBMC o leucocitos se incuba, antes de la estimulación en la etapa (1), con un marcador fluorescente de división celular, que permite determinar, por citofluorometría, que cuando la intensidad de fluorescencia de la población de células estimulada es por lo menos dos veces inferior a la intensidad de la fluorescencia de la población de PBMC o leucocitos, ha ocurrido la división celular en dicha población de células estimuladas, y que dicha población de células estimuladas que es recuperada en la etapa (2) es la población celular TR1 específica de antígenos. Dicho método, que permite controlar la división celular usando marcadores fluorescentes, se conoce en la técnica y es muy apropiado para uso en la etapa (2) de recuperar la población de células Tr1 específica de antígenos, ya que la población de células estimuladas cuya intensidad de fluorescencia es por lo menos dos veces menor que la intensidad de fluorescencia de la población de PBMC o leucocitos comprende la población de células Tr1 específica del antígeno de alimentos o el autoantígeno. Ventajosamente, la población de células estimuladas cuya intensidad de fluorescencia es por lo menos dos veces menor que la intensidad de fluorescencia de la población de PBMC o leucocitos es la población de células Tr1 específicas de antígeno de alimentos o autoantígeno.

Preferiblemente, el marcador fluorescente de división celular es el marcador de carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE), el marcador de diacetato de ácido carboxílico y oregon green 488 (Carboxi-DFFDA SE) o el marcador PKH26 (del descubridor Paul Karl Horan, PKH), todos comercializados por Invitrogen.

La etapa (2) de recuperar la población de células Tr1 específicas de antígeno de alimentos o autoantígeno se puede llevar a cabo con diversos métodos conocidos por la persona con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las células Tr1 pueden identificarse y/o purificarse por Elisa, citometría de flujo, cromatografía de inmovilización con anticuerpos marcados dirigidos contra dichos marcadores de células Tr1, por ejemplo con:

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

5 PC5- anti-CD3 conjugado (UCHT-1) - Caltag (PC5 para ficoeritrina-cianina 5) PE- anti-CD 18 conjugado (6.7) - Becton Dickinson (PE para ficoeritrina) FITC- anti-CD49b conjugado (AK-7) - Becton Dickinson o CD49b anti-humano de ratón marcado con PE (12F1-H6) (FITC para fluoresceína - isotiocianato). Los marcadores de células Tr1 específicos se conocen en la técnica y se describen detalladamente en la solicitud de patente internacional WO 2005/000344.

Por consiguiente, en una realización preferida, la población de células Tr1 específicas de antígenos se recupera en la etapa (2) por citofluorometría usando anticuerpos marcados fluorescentes dirigidos contra proteínas presentes en la superficie de las células de dicha población de células Tr1 específicas de antígenos.

10 También se pueden emplear ensayos ELISA y tinción intracelular para medir la expresión de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  y para identificar las células Tr1 a través de su perfil de expresión de citocinas. Dichos métodos se emplean usualmente en la técnica. Por ejemplo, el sobrenadante obtenido después de la etapa (1) de estimulación se puede poner en contacto con anticuerpos marcados con NIP dirigidos contra la expresión de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  (NIP para 4-hidroxi-5-yodo-3-nitrofenil) acetilo (NEP), seguido de adición de anticuerpo anti-NIP marcado con peroxidasa y  
15 ABTS (ABTS para 2,2'-azino-di (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) (de R&D Systems, Minneapolis, MN, y Chiron Corp., Emmerlyville, CA).

Preferiblemente, la población de células Tr1 específicas de antígenos se recupera en la etapa (2) mediante una técnica de clonación, ventajosamente como dilución limitante. El experto en la técnica conoce dichos métodos y no se describirán más detalladamente en la presente descripción.

20 Se ha contemplado que estos métodos de recuperación de la población de células Tr1 específicas de antígenos pueden emplearse solos o combinados. Por ejemplo, se puede emplear el "método CFSE" combinado con citofluorometría o con la técnica de dilución limitante de clonación. También es posible usar citofluorometría seguida por una técnica de clonación.

25 La población de PBMC o leucocitos es preferiblemente una población mamífera. Puede ser humana, como puede ser también mamífera no humana (perro, gato, ratón, rata, animales de interés agrícola, como ganado y aves de corral, etc.). Más preferiblemente, la población de PBMC o leucocitos es una población humana.

El medio de cultivo Mp puede ser de cualquier tipo, siempre que sea apropiado para dicha población de células Tr1 específicas de antígenos, y el experto en la técnica lo podrá seleccionar fácilmente (medio de Schneider, medio libre de suero).

30 En la presente solicitud, los términos "expansión", "proliferación" y "crecimiento" se pueden emplear en un modo intercambiable y se refieren al número en ascenso de células en una población celular. Preferiblemente, la población de células Tr1 específicas de antígenos se expande de manera exponencial.

35 Ventajosamente, la etapa (3) de expandir la población de células Tr1 específicas de antígenos consiste en contactar dicha población de células con microesferas CD3+CD28 (por ejemplo, adquiridas de Dynal, Oslo, Noruega) en presencia de IL-2 e IL-4.

La relación [células alimentadoras: población de células Tr1 específicas de antígenos] es indiferente cuando se añaden las células alimentadoras a la población de células Tr1 específicas de antígenos (etapa (b)). Ventajosamente, esta relación puede ser [1:1].

40 Las células alimentadoras pueden ser de cualquier tipo, siempre que no proliferen a la temperatura de cultivo T<sub>2</sub> de la población de células Tr1 específicas de antígenos, que es por lo menos aproximadamente 35°C.

La expresión "por lo menos aproximadamente 35°C" significa que la temperatura puede variar de 0,1°C a debajo de 35°C (entre 34,9°C y 35°C). No obstante, el experto en la técnica conoce dichas variaciones mínimas de temperatura.

45 El experto en la técnica con amplia experiencia en cultivo celular conoce las condiciones específicas que se han de utilizar, en particular las temperaturas de cultivo óptimas T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> de cada población de células alimentadoras y de la población de células Tr1 específicas de antígenos. El medio de cultivo Mf puede ser de cualquier clase, siempre que sea apropiado para dicho tipo de célula alimentadora, y el experto en la técnica podrá seleccionarlo fácilmente (medio de Schneider,...).

50 Se debe considerar que la etapa (b) de poner en contacto las células alimentadoras con la población de células Tr1 específicas de antígenos, y la etapa (c) de cultivar la mezcla a la temperatura T<sub>2</sub>, usualmente son etapas simultáneas: antes de ponerse en contacto, las células alimentadoras con la población de células Tr1 específicas de antígenos se cultivan por separado, respectivamente una a temperatura T<sub>1</sub> en el medio de cultivo Mf y la otra a temperatura T<sub>2</sub> en el medio de cultivo Mp. Luego, las células alimentadoras "solas", o el medio de cultivo Mf que contiene las células alimentadoras, se pone/ponen en contacto con la población de células Tr1 específicas de  
55 antígenos que está presente en su medio de cultivo Mp y que está siendo cultivada a temperatura T<sub>2</sub>. Por

consiguiente, las células alimentadoras pasan inmediatamente de la temperatura  $T_1$  a la temperatura  $T_2$  y dejan de proliferar, a diferencia de la población de células Tr1 específicas de antígenos, que se expande gracias al grupo de factores que son expresados por las células alimentadoras.

5 Es posible mantener durante un largo tiempo el crecimiento exponencial *in vitro* de la población de células Tr1 específicas de antígenos, como por lo menos dos o tres meses, volviendo a contactar las células alimentadoras regularmente, por ejemplo cada semana, con dicha población de células Tr1 específicas de antígenos.

Más ventajosamente, las células alimentadoras mueren durante la etapa (c) dado que la temperatura  $T_2$  ya no es apropiada para el cultivo de células alimentadoras. Más ventajosamente, los fragmentos de membrana celular de las células alimentadoras que resultan de la muerte de dichas células se eliminan en la etapa (d).

10 Después de un periodo de tiempo suficiente de cultivar la células Tr1 específicas de antígenos en la etapa (c), preferiblemente varias horas, el medio de cultivo obtenido se compone de una mezcla de la población de células Tr1 específicas de antígenos, células alimentadoras viables y opcionalmente fragmentos de membrana celular de las células alimentadoras, y la población expandida de células Tr1 específicas de antígenos debe recuperarse en la etapa (d). Dicha recuperación puede realizarse separando la población de células Tr1 específicas de antígenos de las células alimentadoras viables y opcionalmente dichos fragmentos de membrana celular, usando cualquier método de separación apropiado conocido por el experto en la materia, como por ejemplo citometría de flujo, empleando un ligando marcado específico capaz de unirse en la superficie de las células alimentadoras o una proteína de superficie celular de la población de células Tr1 específicas de antígenos. Se pueden emplear también otros métodos, como métodos de lavado y/o centrifugación tales como centrifugación en gradiente de densidad, usando medios como Ficoll®, siendo dicha centrifugación un método apropiado para eliminar fragmentos de membrana celular.

20 Se ha de destacar que la eliminación de los fragmentos de membrana celular de las células alimentadoras no es obligatoria pero se recomienda, más aun cuando la población expandida de células Tr1 específicas de antígenos tiene como fin administrarse a mamíferos. De lo contrario, existe el riesgo de que dicha población expandida de células Tr1 específicas de antígenos se contamine.

Ventajosamente, el grupo de factores comprende factores anclados a la membrana celular de las células alimentadoras y factores segregados por dichas células alimentadoras. Más ventajosamente, los factores de dicho grupo interactúan con las proteínas de la superficie celular de la población de células Tr1 específicas de antígenos que se ha de expandir.

30 Cuando las células alimentadoras se cultivan en la etapa (a), expresan algunos factores del grupo en su superficie de membrana celular y algunos otros factores en el medio de cultivo Mf. En la etapa (b) de contactar, los "factores de membrana" están ya anclados a la membrana de la célula alimentadora, pero los "factores segregados" pueden eliminarse si las células alimentadoras son previamente depuradas de su medio de cultivo Mf. De todas maneras, tanto los "factores de membrana" como los "factores segregados" se expresan mediante las células alimentadoras en la etapa (c), incluso si las células alimentadoras no proliferan más, y hasta la muerte de dichas células alimentadoras. Incluso es posible que los "factores de membrana" anclados a los fragmentos de membrana celular de las células alimentadoras muertas cumplan incluso una función en la producción de la población de células Tr1 específicas de antígenos.

40 La población de células Tr1 específicas de antígenos que se expande tiene proteínas de superficie celular implicadas en las señales celulares permitiendo su expansión. Dichas proteínas de superficie celular se activan gracias a ligandos específicos, o factores, que se proveen en la presente invención por las células alimentadoras: las células alimentadoras expresan el grupo de factores que permiten la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. La persona experta en la técnica conoce qué factores específicos deben ser expresados por las células alimentadoras, de modo tal que estos factores interactúan con una proteína de superficie celular de la población de células Tr1 específicas de antígenos.

Incluso más preferiblemente, las células alimentadoras son células recombinantes y contienen ácidos nucleicos heterólogos que codifican los factores de dicho grupo.

50 Las expresiones "células recombinante" o "célula alimentadora recombinante" se refieren a la introducción en dichas células de ácidos nucleicos heterólogos que codifican los factores del grupo. Dicha introducción abarca una diversidad de técnicas útiles para la introducción de ácidos nucleicos en las células alimentadoras, incluyendo electroporación, precipitación de fosfato de calcio, tratamiento de DEAE-dextrano, lipofección, microinyección e infección con vectores víricos. Dichos métodos adecuados se conocen en la técnica, y pueden hallarse, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)). Los ácidos nucleicos que se han de introducir pueden ser, por ejemplo, DNA que abarca los genes que codifican los factores susceptibles a interactuar con las proteínas de superficie celular de la población de células Tr1 específicas de antígenos que se ha de expandir, fragmentos de DNA genómico, RNA de cadena sencilla o vectores de expresión recombinantes que contienen cDNA que codifica dichos genes. Los ácidos nucleicos heterólogos pueden codificar los factores de longitud total o alternativamente pueden codificar sus fragmentos peptídicos que

son suficientes para permitir la producción de la población de células Tr1 específicas de antígenos de acuerdo con la presente invención, cuando se introducen en células alimentadoras. Los ácidos nucleicos pueden codificar los ligandos naturales (proteínas co-estimuladoras) de las proteínas de superficie celular de la población de células Tr1 específicas de antígenos, o sus fragmentos, o formas modificadas de los ligandos o sus fragmentos. La invención tiene como fin incluir el uso de fragmentos, mutantes o variantes (p. ej., formas modificadas) de los factores que retienen la capacidad de potenciar la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. Una "variante" de un factor significa una proteína que comparte una homología significativa con el ligando natural y que está implicada en la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. Las expresiones biológicamente activo o forma biológicamente activa de una proteína incluyen formas de factores que son capaces de efectuar la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. La persona con experiencia en la técnica puede seleccionar dichas variantes del factor en base a su capacidad de potenciar la expansión celular tras la introducción de ácidos nucleicos que codifican los factores en las células alimentadoras. La capacidad de una variante específica del factor de potenciar la expansión de una población de células Tr1 específicas de antígenos puede determinarse fácilmente, por ejemplo, comparando las células alimentadoras recombinantes con células alimentadoras no recombinantes mediante cualquier ensayo o método conocido. Asimismo, los expertos en la técnica apreciarán que los cambios en la secuencia de aminoácidos primaria de los factores probablemente serán tolerados sin obstaculizar en gran medida la capacidad de las proteínas de permitir la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. Por consiguiente, las variantes de los factores que tienen sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos según lo comparado con secuencias de aminoácidos naturales de factores nativos comparables, retienen incluso la actividad funcional de las formas naturales de los factores como se describe en la presente solicitud y también se abarcan en la presente invención. Dichas variantes pueden contener, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras (véase más arriba).

Los ácidos nucleicos tienen una forma adecuada para la expresión del factor, conteniendo dicha forma todas las secuencias codificantes y reguladoras requeridas para la transcripción y traducción de un gen, que pueden incluir un promotor, un potenciador y una señal de poliadenilación, y opcionalmente una secuencia necesaria para el transporte del factor hacia la superficie de las células alimentadoras, incluyendo una secuencia de señal N-terminal. Las secuencias reguladoras pueden también seleccionarse para proveer transcripción constitutiva o inducible. La expresión del factor en la superficie de la célula alimentadora puede confirmarse por tinción inmunofluorescente de las células. Por ejemplo, las células pueden teñirse con un anticuerpo monoclonal fluorescentemente marcado reactivo contra la molécula co-estimuladora o con un receptor soluble fluorescentemente marcado que se une al factor. La persona experimentada en la técnica que conoce bien los factores que han de ser expresados por las células alimentadoras también conoce los anticuerpos monoclonales apropiados que reconocen factores expresados por las células alimentadoras. Alternativamente, se pueden usar proteínas de ligandos solubles marcados que se unen a los factores para detectar su expresión en la superficie de la célula alimentadora. El experto en la materia conoce muy bien las técnicas y dispositivos empleados para detectar células teñidas inmunofluorescentes; preferiblemente, se utiliza un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) para la detección.

Cuando el ácido nucleico que codifica un factor está operativamente unido a elementos reguladores, típicamente es transportado en un vector, incluyendo, por ejemplo, plásmidos y virus.

Por lo tanto, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un factor de la presente invención operativamente unido a elementos de control reguladores también se denomina en este documento "vector de expresión". Los vectores de expresión se seleccionarán en relación al tipo de célula alimentadora, que se ha de transformar. Por ejemplo, cuando las células alimentadoras son células alimentadoras del insecto drosófila, los vectores constitutivos de la drosófila disponibles para expresión de proteínas en células de insectos cultivadas incluyen la serie pAc (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow, V. A., and Summers, M. D., (1989) Virology 170:31-39).

Además, se prefiere que las células alimentadoras no tengan ninguna molécula del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I y/o II intrínseca (MHC) en su superficie. Esto significa que estas células no expresan naturalmente las moléculas MHC, a menos que hayan sido genéticamente transformadas. La ausencia de estas moléculas MHC de clase I y/o II intrínseca en la superficie de las células alimentadoras es crucial para evitar una respuesta alogénica entre las células alimentadoras y la población de células Tr1 específicas de antígenos. En consecuencia, las células alimentadoras de la presente invención se pueden utilizar para expandir la población de células Tr1 específicas de antígenos de cualquier donante en un periodo de tiempo breve.

En una realización más particular, las células alimentadoras se depuran de su medio de cultivo Mf en la etapa (b).

Preferiblemente, las células alimentadoras son células alimentadoras de insectos, siendo T<sub>1</sub> inferior a T<sub>2</sub>.

Se puede utilizar cualquier célula alimentadora de insectos apropiada en la presente invención, siempre que cumpla con las condiciones anteriormente mencionadas. Pueden ser, por ejemplo, células alimentadoras de insectos de Sf9 (entre otras depósitos en ATCC con el número CRL 1711, o en DSMZ con el número ACC 125, y comercializadas por BD Biosciences Pharmingen, EE. UU.), Sf21 (entre otras depositadas en DSMZ con el número ACC 119 y también comercializadas por BD Biosciences Pharmingen, EE. UU.), o la línea celular S2. Preferiblemente, las células alimentadoras de insectos provienen de la línea celular de drosófila S2. La persona con experiencia en la

técnica conoce la línea celular de drosófila S2, que se ha descrito extensamente en la técnica anterior. La línea celular de drosófila S2 se comercializa (Invitrogen, Francia, etc.), y se ha depositado en particular en el banco alemán de microorganismos y células de cultivo DSMZ ("Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen") con el número ACC 130, descrito en Schneider, J Embryol Exp Morphol, 27:1972, 353; también se ha depositado en el banco americano de cultivos tipo ATCC con el número CRL 1963. Preferiblemente, las células alimentadoras de insectos provienen de la línea celular de drosófila S2 depositada el 25 de marzo de 2005 en la National Collection of Micro-organisms Cultures (CNCM, Pasteur Institute, Paris) con el número 1-3407.

Una gran ventaja provista por el uso de células alimentadoras de insectos cuando se va a expandir una población de células mamíferas, y en este caso una población de células Tr1 específicas de antígenos, es que (1) las células alimentadoras y las células mamíferas no proliferan a la misma temperatura ( $T_1$  es inferior a  $T_2$ , y  $T_2$  es por lo menos aproximadamente 35°C), y (2) los virus mamíferos no proliferan en células alimentadoras de insectos, evitando así la posible contaminación vírica de la población de células Tr1 específicas de antígenos proveniente de las células alimentadoras.

Más preferiblemente, el medio de cultivo Mp es un medio de cultivo libre de suero. Se prefieren los medios exentos de cualquier contaminante biológico, como los medios de cultivo libres de suero que se comercializan (XVIVO-15 de BioWhittaker, Walkersville, MD; medio AIM V de Invitrogen, etc.).

Más preferiblemente, el medio de cultivo Mf es un medio de cultivo libre de suero. Se prefieren los medios exentos de cualquier contaminante biológico, como por ejemplo los medios de cultivo libres de suero conocidos y comercializados (medio de Schneider sin suero comercializado por BioWhittaker, Walkersville, MD, medio de cultivo celular de insecto libre de suero GEBCO® como SFM comercializado por Invitrogen, o medio libre de suero Insectagro® comercializado por Krackeler Scientific Inc., EE. UU, etc.), con el fin de evitar la contaminación subsiguiente de la población celular.

Más ventajosamente, las células alimentadoras son células alimentadoras recombinantes que expresan el grupo de factores recombinantes que interactúan con las siguientes proteínas de superficie celular de la población de células Tr1 específicas de antígenos que se ha de expandir:

- el complejo de proteínas CD3/TCR,
- la proteína CD28,
- la proteína CD2,
- el receptor de interleucina 2 (IL-2), y
- el receptor de interleucina 4 (IL-4).

En realidad, para la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos, se requiere la estimulación del complejo TCR/CD3 (TCR para el receptor de células T y CD para el antígeno de diferenciación celular) para administración de una señal de activación primaria en una célula T. Se puede usar un anticuerpo monoclonal anti-CD3 para activar una población de células T vía el complejo TCR/CD3, ventajosamente un anticuerpo anti-CD3 modificado, donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en el reemplazo del dominio intracitoplásmico con un dominio transmembrana, de modo tal que dicho anticuerpo anti-CD3 modificado ancla hacia la membrana celular de las células alimentadoras e interactúa con el complejo de proteínas CD3/TCR de las células T.

Además, se ha implicado un número de proteínas en la superficie de las células T, intercambiamente denominadas "moléculas co-estimuladoras" o "co-estimuladores" en la regulación de la transición de una célula T en reposo hacia transformación en blasto y subsiguiente proliferación y diferenciación. Por lo tanto, además de la señal de activación primaria a través del complejo TCR/CD3, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal co-estimuladora. Se cree que una molécula co-estimuladora o accesoria, CD28, inicia o regula una vía de transducción de señales que es distinta de aquella estimulada por el complejo TCR.

El factor que interactúa con la proteína CD28 presente en la superficie de las células Tr1 específicas de antígenos y que es expresado por las células alimentadoras puede ser un anticuerpo monoclonal anti-CD28 o uno de sus fragmentos capaces de entrecruzar la molécula CD28; en cuyo caso, se puede contemplar una modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD28 añadiendo un dominio transmembrana con el fin de que ancle hacia la superficie celular de las células alimentadoras. Preferiblemente, se emplea el ligando natural para CD28 en lugar del anticuerpo monoclonal anti-CD28, es decir, por ejemplo, un número de la familia B7 de proteínas, como las proteínas B7-1(CD80) y B7-2 (CD86).

Otra molécula co-estimuladora, CD2, está implicada en las señales celulares, permitiendo la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. De modo similar, el factor expresado por las células alimentadoras que interactúa con CD2 puede ser un anticuerpo anti-CD2 monoclonal o su fragmento capaz de entrecruzar la molécula CD2; la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD2 monoclonal se puede contemplar añadiendo un dominio transmembrana para anclar a la superficie celular de las células alimentadoras.

Preferiblemente, se emplea el ligando natural para CD2 en lugar del anticuerpo monoclonal anti-CD2, es decir, la proteína CD58.

Además de los factores que están anclados a la membrana celular de las células alimentadoras, también se requieren factores que se segregan, tales como interleucinas, para la expansión de la población de células Tr1 específicas de antígenos. Entre estas interleucinas se encuentra IL-2, que interactúa con el receptor de IL-2 presente en la superficie de las células Tr1 específicas de antígenos, y o bien IL-4 o IL-13, que interactúa con el receptor de IL-4 de las células Tr1 específicas de antígenos.

En consecuencia, el grupo (A) de factores recombinantes comprende:

- un anticuerpo anti-CD3 modificado, donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en el reemplazo del dominio intracitoplásmico anti-CD3 de la cadena pesada anti-CD3 con un dominio transmembrana, estando dicho anticuerpo anti-CD3 modificado anclado a la membrana celular de las células alimentadoras y siendo susceptible a interactuar con el complejo de proteínas CD3/TCR de las células T, o una de sus variantes,
- la proteína CD80 o CD86, preferiblemente la proteína CD80, anclada a la membrana celular de las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con la proteína CD28 de las células T, o una de sus variantes, y
- la proteína CD58 anclada a la membrana celular de las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con la proteína CD2 de las células Tr1, o una de sus variantes,
- IL-2 segregada por las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con el receptor de IL-2 de las células Tr1, o una de sus variantes, y
- una interleucina seleccionada del grupo que comprende IL-4 e interleucina 13 (IL-13), preferiblemente IL-4, siendo dicha interleucina segregada por las células alimentadoras y susceptible a interactuar con el receptor de IL-4 de las células Tr1, o una de sus variantes.

Preferiblemente, el dominio transmembrana que reemplaza al dominio intracitoplásmico de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 es el dominio transmembrana del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Los factores que son expresados por las células alimentadoras pueden ser de cualquier origen. Preferiblemente, son del mismo origen que aquel de la población de PBMC o leucocitos de donde se obtiene la población de células Tr1 específicas de antígenos. Más ventajosamente la población de PBMC o leucocitos es una población humana. Más preferiblemente, los factores de dicho grupo son de origen humano.

Preferiblemente, la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 modificado está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°1, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°1, y donde la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 modificado está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°2, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°2.

Más preferiblemente, la proteína CD80 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°3, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°3.

Ventajosamente, la proteína CD86 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°4, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°4.

Incluso más preferiblemente, la proteína CD58 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°6, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°6.

En una realización preferida, la IL-2 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°5, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°5.

Ventajosamente, la IL-4 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°7, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°7.

Más ventajosamente, la IL-13 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°8, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°8.

La expresión "molécula de ácido nucleico que tiene por lo menos 70% de identidad con SEQ ID No. X" se refiere a cualquier secuencia que tenga por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99% de identidad con dicha secuencia SEQ ID No. X.

En general, después de varias horas de cultivo de la población de células Tr1 específicas de antígenos que se ha de expandir, como 12 horas, preferiblemente después de 24 horas de cultivo, más preferiblemente 48 horas, no hay más células alimentadoras viables en el medio de cultivo Mp. Ventajosamente, la población de células Tr1 específicas de antígenos expandida se recupera cuando las células alimentadoras están muertas, lo que permite en primer lugar obtener una mayor población de células Tr1 específicas de antígenos expandida, y en segundo lugar

recuperar rápida y fácilmente la población de células Tr1 específicas de antígenos, eliminando los fragmentos de membrana celular de las células alimentadoras, por ejemplo por métodos de lavado y/o centrifugación en gradiente de densidad, como se describió anteriormente.

5 Por lo tanto, en una realización preferida, la población de células Tr1 específicas de antígenos así expandida se recupera en la etapa (d) después de haber cultivado la población de células Tr1 específicas de antígenos en la etapa (c) durante por lo menos 12 horas, ventajosamente 24 horas.

10 Por porcentaje de identidad entre dos ácidos nucleicos (o secuencias de ácidos nucleicos) o dos secuencias proteicas en la presente invención, se entiende un porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la mejor alineación; este porcentaje es puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen aleatoriamente y en toda su longitud. La mejor alineación o alineación óptima es la alineación correspondiente al porcentaje más alto de identidad entre las dos secuencias a comparar, que se calcula como se define a continuación. Las comparaciones de secuencias entre dos ácidos nucleicos o dos secuencias proteicas usualmente se realizan comparando estas secuencias después de su alineación óptima, siendo dicha comparación realizada para un segmento o para una "ventana de comparación", para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencias. Las alineaciones óptimas de secuencias para la comparación se pueden llevar a cabo manualmente o mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) (Ad. App. Math. 2:482), mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) (J. Mol. Biol. 48:443), mediante el método de investigación de similitud de Pearson y Lipman (1988) (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:2444), mediante programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias proteicas se determina comparando estas dos secuencias alineadas en un modo óptimo con una "ventana de comparación" en la que la región de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia proteica a comparar puede comprender sumas o restas con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones para las cuales el nucleótido o el aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la "ventana de comparación" y multiplicando el resultado obtenido por 100, para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

15 La etapa (3) de expandir la población de células Tr1 específicas de antígenos de acuerdo con la presente invención, usando células alimentadoras, ofrece las siguientes ventajas:

- el sistema de expansión de células alimentadoras es capaz de mantener el crecimiento exponencial de la población de células Tr1 específicas de antígenos durante por lo menos dos o tres meses *in vitro*,
- las células alimentadoras carecen de moléculas MHC de clase I y II para evitar una respuesta alogénica,
- las células alimentadoras están libres de micoplasma,
- 20 - las células alimentadoras son capaces de crecer bien usando medio libre de suero,
- no se requiere que las células alimentadoras sean irradiadas,
- las células alimentadoras no permiten la expansión de virus mamíferos, y
- la población de células Tr1 específicas de antígenos expandida está muy bien caracterizada para propósitos de inyección.

25 La presente invención se describe en más detalle en las siguientes figuras y ejemplos.

#### LEYENDAS DE LAS FIGURAS

**Figura 1: las células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>CD49b<sup>+</sup> proliferan en respuesta a antígenos de alimentos y no a antígenos de memoria.**

30 A) Células T CD4<sup>+</sup> purificadas (barras grises), células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>CD49b<sup>+</sup> (barras blancas) y células T de memoria CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> se estimularon con toxoide tetánico (10 µg/mL), PPD (20 µg/mL) o anti-CD3+antiCD28 mAb (10 µg/mL) en presencia de monocitos purificados autólogos. La proliferación se analizó por incorporación de timidina en el día 5. B) la misma población que en A se estimuló con ovalbúmina (OVA, 20 µg/mL), Caseína (20 µg/mL) o una mezcla de proteínas de soja (Soja) a 50 µg/mL). Los resultados representan la respuesta proliferativa media de 10 pacientes distintos.

35 **Figura 2: las células T CD4<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>CD49b<sup>+</sup> proliferan frente al antígeno del alimento, no al antígeno de vacuna.**

Se marcaron células T CD4<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> purificadas o CD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> con CFSE y se estimularon con el antígeno diferente como se indicó, o bien antígeno de vacuna (PPD, derivado de proteína purificado):

tuberculina, TT: toxoide tetánico) o antígeno de alimento (OVA: ovalbúmina, Caseína o proteína de Soja). Después de 8 días, las células se analizaron por citofluorometría, y el porcentaje de células divididas se analizó por la disminución de expresión de CFSE. El porcentaje de células CFSE<sup>bajo</sup> se indica en cada cuadrante.

5 **Figura 3: las células T CD4<sup>+</sup> proliferativas específicas de antígeno de alimentos tienen un fenotipo de perfil Tr1 citocina**

Se marcaron células T CD4<sup>+</sup> con CFSE y se estimularon con el antígeno de vacuna indicado (PPD, TT) o con el antígeno de alimento (OVA, Soja, Caseína). Las células T CFSE<sup>bajo</sup> CD4<sup>+</sup> se purificaron y re-estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 mAb, y después de 48 h, los sobrenadantes se analizaron por ELISA para medir las cantidades de las citocinas indicadas. Las células T CD4<sup>+</sup> proliferativas específicas del antígeno de alimento exhibieron un fenotipo Tr1 con un nivel de secreción de IL-10<sup>alto</sup> IL-4<sup>-</sup> IFN-γ<sup>+/-</sup>, IL-5<sup>+/-</sup>, IL-2<sup>-</sup>, mientras que las células T específicas de antígeno de memoria exhibieron un fenotipo Th1 con gran secreción de IFN-γ.

10 **Figura 4: las células T CD4<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>CD49b<sup>+</sup> proliferan a autoantígenos y las células específicas de autoantígenos exhibieron un fenotipo de citocina Tr1.**

Se marcaron células T CD4<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> purificadas o CD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> con CFSE y se estimularon con un autoantígeno (MBP: proteína básica de mielina) o insulina, como se indica. Después de 8 días, las células se analizaron por citofluorometría, y el porcentaje de células divididas se analizó por disminución de expresión de CFSE. El porcentaje de células CFSE<sup>bajo</sup> se indica en cada cuadrante. Las células T CFSE<sup>bajo</sup> se purificaron y re-estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 mAb, y después de 48 horas, los sobrenadantes se analizaron por ELISA para medir las cantidades de las citocinas indicadas. Las células T CD4<sup>+</sup> específicas de autoantígenos proliferativas exhibieron un fenotipo Tr1 con niveles de secreción de IL-10<sup>alto</sup> IL-4<sup>-</sup> IFN-γ<sup>+/-</sup>, IL-5<sup>+/-</sup>, IL-2<sup>-</sup>.

15 **Figura 5: se pueden observar células Tr1 en pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias o alérgicas al antígeno ensayado**

Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> purificadas o CD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> de un paciente que padecía esclerosis múltiple (MS) o alergia a la caseína según se indica, se marcaron con CFSE y se estimularon con autoantígeno (MBP: proteína básica de mielina) o caseína, o derivado de proteína purificado de tuberculosis micobacteriana (PPD) como control positivo según se indica. Después de 8 días, las células se analizaron por citofluorometría, y el porcentaje de células divididas se analizó por disminución de la expresión de CFSE. El porcentaje de células CFSE<sup>bajo</sup> se indica en cada cuadrante. Las células T CFSE<sup>bajo</sup> se purificaron y re-estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 mAb, y después de 48 horas, los sobrenadantes se analizaron por ELISA para medir las cantidades de las citocinas indicadas.

20 **Figura 6: Las células Tr1 específicas de antígenos de alimentos no proliferaron en respuesta a IL-2 sola, pero proliferaron vigorosamente en respuesta a IL-2 e IL-4.**

Se marcaron células T CD4<sup>+</sup> con CFSE, se estimularon con los antígenos indicados y se purificaron como en la Figura 3. Las células purificadas luego se expandieron en presencia de IL-2 sola (1 µg/mL) o IL-2 e IL-4 (1 µ/mL y 500 ng/mL respectivamente). El número de células bajo condiciones diferentes se midió luego y se trazó contra el número de días después del inicio. Las células T de antígeno de memoria proliferaron en respuesta a IL-2 y la combinación de IL-2 e IL-4, mientras que las células Tr1 específicas de antígenos de alimentos proliferaron solamente contra la combinación de las citocinas IL-2 e IL-4.

25 **Figura 7: las células Tr1 específicas de antígenos de alimentos IL-2 e IL-4 expandidas mantienen su perfil de citocinas después de la expansión**

La población de células T específicas de antígenos diferente según lo obtenido en la Figura 5 se estimuló con CD3 y CD28 mAb, y se determinó su perfil de citocina por ELISA en sobrenadantes recogidos 48 horas después de la estimulación. Las células T específicas de PPD y TT mantuvieron su perfil de citocina Th1 después de la expansión con IL-2 sola, mientras que la adición de IL-4 indujo la secreción de IL-4 en estas células, según lo esperado. En contraste, las células Tr1 específicas de antígenos mantuvieron su perfil de citocinas incluso después de la expansión en presencia de IL-2 e IL-4.

30 **Figura 8: Análisis de expresión de la proteína humana en la línea celular S2.**

Análisis citométrico de flujo de dos colores de cadenas pesada y ligera de OKT3 y expresión de CD80 y CD58 en células parentales (S2) o células de la fábrica de células (*cell factory* o CF).

35 **Figura 9: Dibujo de CF modificada que interactúa con una célula CD4 +Tr1**

Se transfectaron células S2 con anti-CD3 mAb unido a membrana para unir el complejo TCR/CD3, CD80 y CD58 con el fin de añadir algunas señales co-estimuladoras a través de la interacción con moléculas CD28 y CD2 respectivamente, e IL-2 y IL-4 para inducir el crecimiento celular.

**Figura 10: Proliferación de células T inducida por la línea celular CF.**

La proliferación de PBL policlonales, líneas celulares Tr1 y células T CD4+ (LI y L2), o clones Tr1 (C1 y C2) estimulados con la fábrica de células se midió con incorporación de [3H]timidina entre 3 y 4 cultivos. Se estimularon células T con células CF según se indica, en ausencia de citocinas exógenas. A las 72 horas, las células se pulsaron con [3H] timidina y se incubaron durante 18 horas más, antes de cosecharse. Los valores de los recuentos por minuto se muestran como el error estándar de la media de cultivos triplicados.

**Figura 11: Crecimiento a largo plazo de células Tr1 humanas policlonales, primarias estimuladas con fábrica de células.**

Se estimularon células Tr1 con microesferas CD3/28 más IL-2 e IL-4 exógenas, células CF' que expresaban OKT3, CD80 y CD58 pero no IL-2 e IL-4 en presencia de IL-2 e IL-4 exógenas, o con el sistema de fábrica de células completo, sin ninguna adición exógena. Las células T se estimularon con células CF en los días 0, 10 y 20 de cultivo.

**Figura 12: Pureza de células T después del co-cultivo con la línea celular CF.**

La pureza de las células T y después de la estimulación con la línea celular CF se evaluó con tinción para expresión de CD3, CD4 durante los primeros siete días de cultivo. No se usó selección del tamaño/sedimento celular en este experimento, como para representar todas las células del cultivo. Las células viables se indican por selección de yoduro de propidio para excluir las células muertas. Los resultados son representativos de >10 experimentos diferentes, cada uno con un donante distinto.

**Figura 13: Destino de la línea celular CF después del co-cultivo con células T**

El destino de las células estimuladoras CF se evaluó tiñendo para expresión de CD4 y OKT3H durante los primeros siete días de cultivo. No se usó selección del tamaño/sedimento celular en este experimento como para representar todas las células del cultivo. Las células viables se indican por selección de yoduro de propidio para excluir las células muertas. Los resultados son representativos de >10 experimentos diferentes, cada uno con un donante distinto.

**Figura 14: Representación esquemática del protocolo experimental utilizado.****Figura 15: Aislamiento de clones Tr1 específicos de OVA.**

Se estimularon PBL teñidos con CFSE con OVA, y se tiñeron con CD4 CD49b y CD18. Se seleccionaron células CD4<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>, y las células CFSE se clasificaron. Las células clasificadas se clonaron para generar los clones 1 y 2, la población en volumen se estimuló con OVA y se tiñó con IL-10 y IFN- $\gamma$ , revelando un fenotipo Tr1.

**Figura 16: Análisis de proliferación a largo plazo de clones Tr1**

Se estimularon luego dos clones con la fábrica de células irradiadas. Los números de células totales se representan en un trazado semi-logarítmico del número de células frente a los días en cultivo.

**Figura 17: Perfil de citocina de los clones T 1 y 2 específicos de OVA después de la expansión en la fábrica de células durante 70 días.**

Se midieron las citocinas en los sobrenadantes de los clones estimulados con OVA y monocitos irradiados autólogos. La supresión específica de antígenos también se examinó por un ensayo trans-pocillos. Los PBL autólogos se estimularon con anti-CD3 mAb en el pocillo inferior, ninguna célula, las células T CD4 control y los dos clones se añadieron a la cesta superior y se estimularon con anti-CD3 y monocitos irradiados autólogos para células CD4 u OVA y monocitos irradiados autólogos para los dos clones diferentes Tr1. Todo el protocolo es representativo de diez experimentos, cada uno de distintos donantes.

**EJEMPLOS****EJEMPLO 1: OBTENCIÓN *IN VITRO* DE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS DE ANTÍGENOS DE ALIMENTOS O AUTOANTÍGENOS DE UNA POBLACIÓN DE PBMC POR ESTIMULACIÓN CON EL ANTÍGENO DE ALIMENTOS O EL AUTOANTÍGENO****1.1 Material y métodos****Purificación celular y citometría de flujo**

Se recuperaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana de capas leucocitarias de donantes sanos después de la centrifugación en gradiente de ficoll. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se purificaron de la PBMC después de la eliminación de células CD11b<sup>+</sup> (OKM1-95), CD20<sup>+</sup> (1F5C9) y CD8<sup>+</sup> (G42-8) por selección negativa usando Dynabeads recubiertas con anti-ratón de cabra (Dyna, Oslo, Noruega). Los monocitos se purificaron después del cultivo de PBMC 1 hora a 37°C en RPMI enriquecido con 20% FCS. Más de 90% de las células adherentes

recuperadas fueron monocitos CD14<sup>+</sup>. Se separaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en células T CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> o CD49b<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> después de teñir las células con anticuerpos fluorescentes y clasificar en FACS vantage SE, Beckton Dickinson, Le pont de Claix, Francia). Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la citometría de flujo: FITC, APC o CD4 antihumano de ratón marcado con PC5 (RPA-T4), CD3 antihumano de ratón marcado con PC5 (UCHT1), CD49b antihumano de ratón marcado con PE (12F1-H6), CD14 antihumano de ratón marcado con FITC (M5-E2), CD18 antihumano de ratón marcado con PE o PC5 (6.7), CD25 antihumano de ratón marcado con PE (M-A251), HLA-DR antihumano de ratón marcado con PE (G46-6), CD69 antihumano de ratón marcado con PE (FN50), CD45RO antihumano marcado con FITC (UCHL-1). Todos los anticuerpos se adquirieron de BD-Pharmingen (Le Pont de Claix, Francia).

## 10 Cultivo celular

Para detección de linfocitos T específicos de antígeno CD4<sup>+</sup>, las PBMC (10 millones de células por ml) se tiñeron con 0,2 µM CFSE o 2,5 µM PKH26 (Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante 5 minutos a 37°C en PBS 1X. Después de dos lavados en PBS 1X, las poblaciones celulares se incubaron a 2 millones/mL en RPMI enriquecido con suero humano al 5% AB en presencia o ausencia de 200 µg/mL de ovalbúmina de pollo, 200 µg/mL de caseína bovina, 200 µg/mL de insulina humana (Sigma, L'Isle d'Abeau, Francia), 50 µg/mL de toxoide tetánico (Lederie, Pearl River, Nueva York) y 2µg/mL de derivado de proteína purificado (PPD) de tuberculosis micobacteriana (Staten serum Institute, Dinamarca) o 50 µg/mL de MBP (Sigma, L'Isle d'Abeau, Francia). Después de 9 días de cultivo, las células se tiñeron con CD4 antihumano de ratón marcado con PC5 y se analizaron por citometría de flujo. Las células T CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> o CD49b<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> también se clasificaron, se tiñeron con 0,2 µM CFSE o 2,5 µM PKH26 y se cultivaron a 2 millones/mL en presencia de 4,10<sup>5</sup> monocitos autólogos y en presencia de antígenos.

## Clasificación y expansión de células específicas de antígenos

Después de 10 días de cultivo, las células T específicas de antígenos CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>lo</sup> o CD4<sup>+</sup>PKH26<sup>lo</sup> se clasificaron en un FACS vantage SE (Beckton Dickinson) y se expandieron con PBMC irradiadas autólogas en presencia de antígenos, en medio X-vivo 15 (Biowhittaker, Emerainville, Francia) enriquecido con 10 ng/mL de IL4 y 5 ng/mL de IL2.

## Detección de citocinas

La producción de citocinas se detectó por ELISA, que se realizó en sobrenadantes de poblaciones celulares humanas (2 millones/mL) cultivadas 48 horas en RPMI enriquecido con 10% FCS (Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia), y se estimuló con 10 µg/mL de anti-CD3 recubierto (UCHT1) y 1 µg/mL de anti-CD28 soluble (CD28.2). Los anticuerpos utilizados fueron anticuerpos de captura anti-IL10 (JES3-9D7), anti-IL4 (8D4), anti-IL2 (17H12), anti-IL5 (39D10) y anti-IFNγ (A35), y anticuerpos de detección anti-IL10 (JES3-12D8), anti-IL4 (MP4-25D2), anti-IL2 (B33-2), anti-IL5 (5A10) y anti-IFNγ (B27) marcados con NEP seguidos de adición de anticuerpo anti-NIP marcado con peroxidasa y ABTS. IL10, IL4 y IFNγ fueron de R&D systems (Minneapolis, MN), IL2 fue de Chiron corp (Emmeryville,CA). Todos los anticuerpos fueron de BD pharmingen.

## 35 Medición de proliferación

Para evaluar la proliferación, las poblaciones de células T (1 millón de células por ml) se estimularon *in vitro* con PBMC irradiadas autólogas y antígenos específicos en RPMI enriquecido con 10% FCS a 37°C en presencia de citocinas indicadas. La proliferación de células T se evaluó por la numeración de células vivas.

## Métodos para aislar células Tr1 específicas de antígenos

40 Los inventores diseñaron métodos para aislar poblaciones y clones de células Tr1 específicas de antígenos.

El primer método depende de la incorporación de CFSE o cualquier tinte similar (PHK). Las células se marcan con CFSE y se estimulan con antígeno de alimento (intervalo de 0,1 µg/mL a 5 mg/mL), después de 9 o 10 días, las células se clasifican por citofluorometría y se mantienen con microesferas CD3+CD28 e IL-2+IL-4. Con el fin de eliminar cualquier otra célula que podría no haber proliferado significativamente bajo estas condiciones de cultivo, 45 las células podrían también clonarse a una célula por pocillo, y los diferentes clones analizarse para especificidad y secreción de citocinas.

El segundo método depende de la expresión de superficie celular de los marcadores de activación o proliferación. Las PBMC se estimulan con antígenos de alimentos o autoantígenos, y las células estimuladas con antígenos se purifican con anticuerpos dirigidos contra anti-CD69, anti-CD25 o cualquier marcador de activación o proliferación. 50 Las células purificadas se mantienen luego con estímulos CD3+CD28 e IL-2+ IL-4. Alternativamente, las células pueden mantenerse con células alimentadoras y estímulos CD3/CD28, en presencia de IL-2 e IL-4. Las células purificadas podrían también clonarse a una célula por pocillo, por clasificación FACS o dilución limitante.

El tercer método se basa en el enriquecimiento de la población proliferativa después de la estimulación con antígenos de alimentos o autoantígenos. Las PBMC se estimulan con ovalbúmina (o cualquier otro antígeno de alimento o autoantígeno) y después de una semana, las células se vuelven a estimular con el mismo antígeno en

presencia de IL-2 e IL-4. Esa combinación fue óptima, pero podría utilizarse cualquier combinación o periodo de tiempo. La población enriquecida luego se clonó por dilución limitante (pero podría utilizarse cualquier otra técnica de clonación). Los clones luego se multiplicaron por estimulación con células estimuladoras anti-CD3, CD28, e IL-2 e IL-4. Los clones proliferativos se analizaron luego para especificidad y secreción de citocinas, usando ovalbúmina presentada por PBMC irradiadas autólogas.

## 1.2 Resultados

### Las células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> proliferan en respuesta a antígenos de alimentos y no antígenos de vacunas.

Cuando los inventores purificaron células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>, observaron que estas células no proliferaban en respuesta a antígenos de memoria como toxoide tetánico de PPD, en contraste con la población recíproca (Fig 1A). También ensayaron la capacidad de las células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> de proliferar en respuesta a antígenos de alimentos. Como se indicó previamente, se observó solamente una respuesta proliferativa muy mínima sobre el fondo cuando la población de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> total se estimuló con antígenos de alimentos (Ovalbúmina, caseína, proteína de soja o inmunoglobulinas bovinas). No obstante, observaron una respuesta proliferativa vigorosa en las poblaciones de células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> purificadas, mientras que no se observó proliferación en la población de memoria recíproca (Fig 1B).

Por lo tanto, utilizaron una técnica más sensible con incorporación de CFSE, y observaron que las células Tr1 no proliferaban en respuesta a antígenos de memoria, pero exhibían una respuesta proliferativa significativa a antígenos de alimentos, como ovalbúmina, caseína o proteínas de soja. En cambio, la población recíproca de células T CD4<sup>+</sup> no demostró ninguna respuesta proliferativa a antígenos de alimentos, sino que proliferó vigorosamente en respuesta a antígenos de memoria (TT y PPD) (Fig 2).

### Las células T CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> específicas de antígenos de alimentos tienen un perfil de citocina Tr1.

Usando la técnica de incorporación de CFSE (Figura 3), los inventores aislaron por FACS, las células proliferativas CFSE<sup>bajo</sup> y analizaron su perfil de citocina por estímulo policlonal (anti-CD3+CD28 mAbs). Estos experimentos demostraron que las células específicas OVA, Caseína y soja poseen un perfil de citocina Tr1 que segrega altos niveles de IL-10, cierto IFN- $\gamma$ , cierta IL-5 y ninguna IL-2 e IL-4 como se describió previamente (Groux et al. Nature 1997). En contraste, las células específicas de TT o PPD exhibieron un fenotipo Tr1 que segrega principalmente IFN- $\gamma$ , según lo esperado.

### Las células Tr1 son también específicas para autoantígenos

Usando la técnica CFSE, los inventores también analizaron la respuesta proliferativa de las diferentes poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> a autoantígenos como MBP (proteína básica de mielina) o insulina. De modo similar a los antígenos de los alimentos, se observó una respuesta proliferativa mínima o no se observó ninguna respuesta proliferativa en la población CD4<sup>+</sup> en volumen (según se reportó) o en la población de memoria CD49b<sup>+</sup> (CD45RO<sup>+</sup>). Sorprendentemente, se observó una respuesta de proliferación vigorosa cuando las células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> purificadas se estimularon con insulina o MBP. Asimismo, estas células específicas de insulina o MBP exhibieron un perfil de citocina Tr1 con alta secreción de IL-10 (Fig 4).

### Se pueden aislar células Tr1 en pacientes que padecen autoinmunidad o alergia al antígeno ensayado.

Ya que el antígeno de alimentos y el autoantígeno han estado implicados en enfermedades alérgicas o autoinmunitarias respectivamente, los inventores analizaron la presencia de células T proliferativas en la población de células T purificadas CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> de pacientes que padecen MS (con enfermedad autoinmunitaria dirigida contra el componente de mielina como MBP) o pacientes con alergia alimentaria a caseína. Como se muestra en la Figura 5, se observó que, como se esperaba, la estimulación con MBP o caseína induce la proliferación celular en la CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> purificada, en un paciente que padece esclerosis múltiple o alergia a la caseína, respectivamente. La re-estimulación de las células proliferativas demostró que estas células exhibieron un perfil de citocina Th1 en el caso de las células de un paciente que padece MS estimulada con MBP, y un perfil de citocina Th2 en respuesta a caseína en el caso del paciente alérgico. No obstante, inesperadamente, también observaron una proliferación en la población de células Tr1 CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup> como en un control normal que demostró que las células Tr1 específicas de autoantígenos también podían observarse en pacientes que padecen autoinmunidad o alergia al antígeno ensayado (Fig 5).

### Se requiere la combinación de IL-2 e IL-4 para mantener la proliferación de células Tr1 específicas de Ag

Si bien las células Tr1 (células CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD18<sup>brillante</sup>) proliferaron en respuesta a antígenos de alimentos o autoantígenos, esa proliferación no pudo mantenerse por la adición de IL-2 sola (Fig 6) en contraste con la proliferación de células T específicas de TT o PPD (Fig 6). Sorprendentemente, los inventores hallaron que la adición combinada de IL-2 e IL-4 fue capaz de mantener la respuesta proliferativa de las células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos (Fig 7).

**EJEMPLO 2: EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN OBTENIDA DE CÉLULAS TR1 ESPECÍFICAS DE ANTÍGENOS USANDO CÉLULAS ALIMENTADORAS**

**2.1 Protocolo experimental**

**Anticuerpos marcados**

5 Para clasificación de microesferas:

Microesferas utilizadas:

- « MagCelect Ferrofluid, Estreptavidina » (R&D) « Microesferas anti-rata de oveja » (Dako) Para CD80: CD80 antihumano de ratón biotinilado (B7-1), clon L307.4 (BD Biosciences Pharmingen)

Para OKT3: cadena ligera Ig Kappa anti-ratón de rata purificado, clon 187.1 (BD Biosciences Pharmingen)

10 Para clasificación FACS y marcadores de control usuales

Para CD80: CD80-PE antihumano de ratón (ficoeritrina) o FITC (isotiocianato de fluoresceína), clon L307.4 (BD Biosciences Pharmingen)

Para CD58: CD58-PE antihumano de ratón o PECy5 (ficoeritrina-cianina 5)

(LFA-3) Clon 1C3 (BD Biosciences Pharmingen)

15 Para OKT3:

*Cadena pesada:* IgG2a anti-ratón biotinilado, clon R19-15 + Estreptavidina-FITC o Estreptavidina-PE o Estreptavidina-PECy5 (BD Biosciences Pharmingen)

*Cadena ligera:* cadena ligera Ig Kappa anti-ratón de rata, clon 187.1 (BD Biosciences Pharmingen) + FITC-anti-rata de conejo (Dako)

20 **Cebadores de ampliación**

OKT3-L FWD:

5'- ATGCGGATCC ATGGATTTTCAAGTGCAG - 3' (SEQ ID N° 9)

OKT3-L REV:

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

25 cebador OKT3H1 cadena pesada variable (571pb):

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)

30 cebador OKT3H2 cadena pesada CH1-CH3 (850pb).

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)

35 cebador pdgf receptor del factor de crecimiento 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)

5 LFA3 FWD:

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

LFA3 REV:

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

IL-4 FWD:

10 5'- ATGCGGATCCATGGGTCTCACCTCCCAACT - 3' (SEQ ID N° 21)

IL-4 REV:

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

### Clonación y construcción de la fábrica de células

15 Se clonaron CD80 humano, IL-2, IL-4 y CD58 de linfocitos T de sangre periférica (PBL) obtenidos de un donante sano en el vector pAC (Invitrogen), usando un promotor de actina de insecto (*Chung y Keller*, Mol Cell Biol. Dic. 1990; 10(12):6172-80; *Chung y Keller*, Mol Cell Biol. Enero 1990; 10(1):206-16) y se transfectaron por electroporación (electroporador Biorad, EE. UU.) en células S2 de la línea celular S2 depositada el 25 de marzo de 2005 en CNCM con el número 1-3407. De modo similar, las cadenas pesada y ligera de OKT3 (*Kung et al*, *Science*. Oct. 1979 19;206(4416):347) se clonaron a partir de células de hibridoma OKT3 (ATCC CRL 8001; Manassas, Virginia, EE. UU.) en el vector pAC y se transfectaron en células S2 antes de FACS. Para obtener anti-CD3 mAb unido a membrana, el extremo 3' de la cadena ligera se eliminó y se reemplazó con la parte transmembrana de las células CF del gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), es decir, células que expresan anticuerpo monoclonal hCD80, hCD58 y anti-CD3 (mAb) y CF, es decir, células que expresan anticuerpo monoclonal hCD80, hCD58, hIL-2 hIL-4 y anti-CD3 (mAb) se aislaron por clasificación celular activada por fluorescencia, FACS, usando los anticuerpos anteriormente descritos.. No se usó ningún marcador de selección, y las células establemente transfectadas se seleccionaron por tinción FACS. Las células clasificadas se clonaron, y para cada tanda de transfección y selección, se seleccionó el clon más eficiente para la estimulación de células Tr1.

### Preparación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y cultivo de células S2

30 Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica nueva por centrifugación de Ficoll hypaque, y se purificaron las células T CD4<sup>+</sup> por selección negativa, usando anticuerpo anti-CD8 (Becton Dickinson). Todos los cultivos se mantuvieron en X-vivo sin adición de suero (BioWhittaker, Walkersville, MD). Se añadió IL-2 humana (Chiron Therapeutics, Emeryville, CA) a 20 IU/mL donde correspondía, se usó hIL-4 a 1 µg/mL (para comparar la ventaja biológica obtenida cuando las células alimentadoras expresan las interleucinas con los resultados obtenidos cuando se añaden interleucinas recombinantes al medio de cultivo). Las células S2 se mantuvieron en medio SFM sin suero (Gibco).

### Citometría de flujo y clasificación FACS

Las células se tiñeron con anticuerpos a 4°C y se analizaron en un FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) o se clasificaron con el sistema FACStar.

## 2.2 Resultados

### 40 Construcción de aAPC

Para ensayar la hipótesis de que las células Tr1 tienen requerimientos de co-estimulación diferentes para crecimiento a largo plazo, los inventores diseñaron un sistema basado en células que podrían manipularse genéticamente para expresar diferentes moléculas co-estimuladoras y citocinas además de los estímulos clásicos de CD3/CD28. Eligieron células S2 porque no expresan proteínas HLA humanas que promoverían respuestas alogénicas, y que no podrían contaminarse con virus humanos (Fig. 8). Además, la introducción eventual de células alimentadoras irradiadas en el escenario clínico puede evitarse, ya que estas células que crecen a 27°C se destruyen fácilmente a 37°C y se propagan en medio libre de suero. Los inventores transfectaron y luego clonaron células S2 que expresan CD80 humano, CD58 humano y las dos cadenas de un anti-hCD3 mAb para permitir la estimulación de células Tr1 humanas (CF') (Fig. 8). De modo similar, generaron la línea CF (Fig. 8, 9) transfectando células CF' con cDNA de IL-4 e IL-2 humanas. Los cultivos se iniciaron añadiendo células CF a células T CD4<sup>+</sup>

humanas recién preparadas por selección negativa (véase Protocolo experimental).

### La línea celular CF activa eficientemente las células T CD4+ policlonales humanas y las células Tr1

Se ensayó la capacidad de la fábrica celular de estimular la activación inicial y proliferación de células T CD4+ primarias como también líneas celulares Tr1 o clones de células Tr1. Las distintas células T purificadas se estimularon con la fábrica de células en una relación 1/1. Los inventores hallaron que el índice inicial de crecimiento de las células T estimuladas con la fábrica de células fue equivalente, según lo juzgado por la incorporación de [3H]timidina (Fig. 10) con una ligera potenciación de respuesta proliferativa de las células Tr1 frente a las otras células T CD4<sup>+</sup>. Los inventores confirmaron esta observación marcando células T nuevas con carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) y rastreando la división celular durante los primeros cinco días de cultivo (no se muestran los datos). También descubrieron que el sistema basado en células fue más eficiente que las microesferas CD3/28 para la inducción de proliferación y división celular de células T CD4+ (no se muestran los datos). No se observó proliferación cuando la fábrica de células, o las células T CD4+ se incubaron por separado (Fig. 10 y datos no mostrados). Por lo tanto, los requerimientos para las tandas iniciales de proliferación de células T CD4+ fueron incluso más satisfactorios con la fábrica de células, en comparación con la estimulación de CD3/CD28 provista en el contexto de microesferas de poliestireno.

### La línea celular CF permite la expansión a largo plazo de células Tr1 humanas

Luego, los inventores determinaron si la fábrica de células fue suficiente para mantener la propagación a largo plazo de las células Tr1 (Fig. 11). Las células Tr1 se estimularon con CF que segregan hIL-2 y IL-4, con CF' que no segregan citocina pero con la adición de citocinas exógenas y microesferas CD3/28 con citocinas exógenas. Las células estimuladas con microesferas CD3/28 no pudieron proliferar después de la segunda estimulación, en concordancia con los estudios previos. De modo similar, las células Tr1 estimuladas con CF' en el contexto de IL-2 e IL-4 añadidas exógenamente ingresaron en una fase de meseta de la curva del crecimiento al cabo de dos o tres semanas de cultivo, y no ocurrió ningún crecimiento neto de células adicional después de la re-estimulación. En contraste, cuando los cultivos de células Tr1 se estimularon con la fábrica de células, permanecieron en crecimiento exponencial incluso después de una tercera estimulación. Este aumento de proliferación a largo plazo fue reproducible, ya que el incremento promedio en el número total de células T fue 810 veces más alto en cultivos estimulados con la fábrica de células que en cultivos estimulados con microesferas CD3/28 en seis experimentos independientes.

Los análisis fenotípicos de los cultivos demostraron un enriquecimiento progresivo para las células T CD3 +CD4+ después de la estimulación con la fábrica de células (Fig. 12). Las células S2 desaparecieron rápidamente del cultivo celular, según lo evidenciado por una incapacidad de detectar las células que expresan anti-CD3 mAb por citometría de flujo después de siete días (Fig. 13); este hallazgo fue confirmado en experimentos a gran escala y también por RT-PCR para genes drosófila (no se muestran los datos). Por lo tanto, el cultivo mixto de células T y fábrica de células produce una población de células T puras al cabo de una semana.

### Propagación eficiente de células Tr1 específicas de antígenos por la fábrica de células

La inmunoterapia con células Tr1 probablemente requerirá células con funciones reguladores específicas de antígenos. Para determinar si la fábrica de células podría usarse para expandir Tr1 específicas de antígenos, los inventores las utilizaron para cultivar clones Tr1 específicos de OVA durante 10 semanas (Fig. 14). Un ejemplo de dos clones diferentes se muestra mediante el experimento realizado con cientos de clones distintos de células T específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos. Se marcaron los PBL de un individuo normal con CFSE para seguir la división celular, y las células se estimularon con ovalbúmina (20 fig/mL) durante 7 días. Las células se tiñeron luego con CD4, CD 18 y CD49b para seleccionar células Tr1 que sobre-expresan estos marcadores, y las células específicas de OVA se clasificaron de acuerdo con la disminución en el marcado CFSE debido a la división celular específica de antígenos (Fig. 15). Para controlar su fenotipo, se estimuló una población clasificada en volumen con OVA, y se analizó la producción de citocinas por tinción intracitoplásmica, que reveló una población típica de Tr1 (Fig. 15). Después de la clonación, las células se estimularon con la fábrica de células (Fig. 16). Todas las células fueron re-estimuladas con la fábrica de células en intervalos de 10 días. No se proporcionó ninguna estimulación OVA específica durante el cultivo. Se obtuvieron las curvas de crecimiento exponencial de ambos clones durante varios meses. La célula Tr1 específica de antígeno produjo  $1,5 \cdot 10^9$  células después de un mes y medio de cultivo, una cantidad de células suficiente para inmunoterapia. La capacidad proliferativa sustancial de las células Tr1 que permanece después de 30 días de cultivo indica que estas Tr1 podrían tener potencial sustancial de injerto a largo plazo después de la transferencia adoptiva.

Para determinar si la especificidad del antígeno de las poblaciones expandidas se mantuvo durante el cultivo, las células se estimularon con OVA (Fig. 17). Después de un mes y medio de cultivo, las células se estimularon con OVA y APC autólogas, y se analizó la secreción de citocinas. Se observó un perfil Tr1 típico para los dos clones diferentes analizados.

Para examinar la función efectora de las células Tr1 cultivadas, se ensayó la función supresora específica de antígenos en un ensayo transpocillos típico (Fig. 17 y datos no mostrados). Ambos clones exhibieron un efecto

supresor de Tr1 típico sobre las células circunstantes. La supresión se debió a la secreción de 2 IL-10 y TGF- $\beta$ , como se demuestra por el uso de anticuerpos bloqueantes (no se muestran). No se obtuvo supresión en ausencia de estimulación con OVA (no se muestran los datos). Se obtuvieron resultados similares con diferentes donantes y diferentes clones Tr1 (no se muestran los datos).

5

**LISTADO DE SECUENCIAS**

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

<120> Obtención de células Tr1 específicas de antígenos de los alimentos o de autoantígenos a partir de una población de leucocitos o PBMC

5 <130> D23177

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 708

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica OKT3-L

<400> 1

```

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatatcc      60
agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag      120
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag      180
tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct      240
gctcaattca ggggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cggcatggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccatt cacgttcggc      360
tcggggacaa agttggaaat aaaccgggct gatactgcac caactgtatc catcttcca      420
ccatccagtg agcagttaac atctggaggc gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc      480
taccocaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc      540
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc      600
acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag      660
acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtggttag      708
    
```

15

<210> 2

<211> 1560

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica OKT3-H

<400> 2

ES 2 368 152 T3

atggaaaggc	actggatcct	tctactcctg	ttgtcagtaa	ctgcaggtgt	ccactcccag	60
gtccagctgc	agcagctctg	ggctgaactg	gcaagacctg	gggcctcagt	gaagatgtcc	120
tgcaaggctt	ctggctacac	ctttactagg	tacacgatgc	actgggtaaa	acagaggcct	180
ggacagggtc	tggaatggat	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	catcgggtcta	tccactggcc	cctgtgtgtg	gagatacaac	tggctcctcg	480
gtgactctag	gatgcctggg	caagggttat	ttccctgagc	cagtgcacct	gacctggaac	540
tctggatccc	tgtccagtg	tgtgcacacc	ttcccagctg	tectgcagtc	tgacctctac	600
accctcagca	gctcagtgac	tgtaacctcg	agcacctggc	ccagccagtc	catcacctgc	660
aatgtggccc	acccggcaag	cagcaccaag	gtggacaaga	aaattgagcc	cagagggccc	720
acaatcaagc	cctgtcctcc	atgcaaatgc	ccagcaccta	acctcttggg	tggaccatcc	780
gtcttcatct	tccctccaaa	gatcaaggat	gtactcatga	tctccctgag	ccccatagtc	840
acatgtgtgg	tgggtgatgt	gagcgaggat	gaccagatg	tccagatcag	ctggtttgtg	900
aacaacgtgg	aagtacacac	agctcagaca	caaaccata	gagaggatta	caacagtact	960

ctccgggtgg	tcagtgcctt	ccccatccag	caccaggact	ggatgagtgg	caaggagttc	1020
aaatgcaagg	tcaacaacaa	agacctccca	gcgcccatcg	agagaacctt	ctcaaaacc	1080
aaagggtcag	taagagctcc	acaggtatat	gtcttgcttc	caccagaaga	agagatgact	1140
aagaaacagg	tactcttgac	ctgcatggtc	acagacttca	tgctgaaga	catttacgtg	1200
gagtggacca	acaacgggaa	aacagagcta	aactacaaga	acactgaacc	agtcctggac	1260
tctgatggtt	cttacttcat	gtacagcaag	ctgagagtgg	aaaagaagaa	ctgggtggaa	1320
agaaatagct	actcctgttc	agtgggtccac	gagggctctg	acaatcacca	cacgactaag	1380
agcttctccc	ggactccggg	taaagaattc	gctgtgggcc	aggacacgca	ggaggtcatc	1440
gtgggtgccac	actccttgcc	ctttaagggtg	gtgggtgatct	cagccatcct	ggcctgggtg	1500
gtgctcacca	tcatctccct	tatcatcctc	atcatgcttt	ggcagaagaa	gccacgttag	1560

<210> 3  
 <211> 867  
 5 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD80

<400> 3						
atggggccaca	cacggaggca	gggaacatca	ccatccaagt	gtccatacct	caattttcttt	60
cagctcttgg	tgctggctgg	tctttctcac	ttctgttcag	gtgttatcca	cgtgaccaag	120
gaagtgaaag	aagtggcaac	gctgtectgt	ggtcacaatg	tttctgttga	agagctggca	180
caaactcgca	tctactggca	aaaggagaag	aaaatggtgc	tgactatgat	gtctggggac	240
atgaatatat	ggcccagta	caagaaccgg	accatctttg	atataactaa	taacctctcc	300
attgtgatcc	tggctctgcg	cccactctgac	gagggcacat	acgagtgtgt	tgttctgaag	360
tatgaaaaag	acgctttcaa	gcggaacac	ctggctgaag	tgacgttatc	agtcaaagct	420
gacttcccta	cacctagtat	atctgacttt	gaaattccaa	cttctaatat	tagaaggata	480
atgtgtcaa	cctctggagg	ttttccagag	cctcacctct	cctggttgga	aaatggagaa	540
gaattaaatg	ccatcaacac	aacagtttcc	caagatcctg	aaactgagct	ctatgctgtt	600
agcagcaaac	tggattccaa	tatgacaacc	aaccacagct	tcatgtgtct	catcaagtat	660
ggacatttaa	gagtgaatca	gaccttcaac	tggaatacaa	ccaagcaaga	gcattttcct	720
gataacctgc	tcccactctg	ggccattacc	ttaatctcag	taaatggaat	ttttgtgata	780
tgctgcctga	cctactgctt	tgcccgaaga	tgcagagaga	gaaggaggaa	tgagagattg	840
agaagggaaa	gtgtacgccc	tgtataa				867

10  
 <210> 4  
 <211> 990  
 <212> DNA  
 <213> homo sapiens

ES 2 368 152 T3

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD86

<400> 4

atggatcccc	agtgcaactat	gggactgagt	aacatttctct	ttgtgatggc	cttcctgctc	60
tctggtgctg	ctcctctgaa	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	acaagggcct	gtatcaatgt	atcatccatc	acaaaaagcc	cacaggaatg	360
attcgcatcc	accagatgaa	ttctgaactg	tcagtgcctg	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	ccctgatggt	acgagcaata	tgaccatctt	ctgtattctg	660
gaaactgaca	agacgcggct	tttatcttca	cctttctcta	tagagcttga	ggaccctcag	720
cctccccag	accacattcc	ttggattaca	gctgtacttc	caacagttat	tatatgtgtg	780
atggttttct	gtctaattct	atggaaatgg	aagaagaaga	agcggcctcg	caactcttat	840
aaatgtggaa	ccaacacaat	ggagagggaa	gagagtgaac	agaccaagaa	aagagaaaaa	900
atccatatac	ctgaaagatc	tgatgaagcc	cagcgtgttt	ttaaagttc	gaagacatct	960
tcatgcgaca	aaagtgatac	atggttttaa				990

5

<210> 5

<211> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica IL2

<400> 5

atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcatt	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
gcacctactt	caagttctac	aaagaaaaca	cagctacaac	tgagcattt	actgctggat	120
ttacagatga	ttttgaatgg	aattaataat	tacaagaatc	ccaaactcac	caggatgctc	180
acatttaagt	tttacctgcc	caagaaggcc	acagaactga	aacatcttca	gtgtctagaa	240
gaagaactca	aacctctgga	ggaagtgcta	aatttagctc	aaagcaaaaa	ctttcactta	300
agaccaggg	acttaatcag	caatatcaac	gtaatagttc	tggaactaaa	gggatctgaa	360
acaacattca	tgtgtgaata	tgctgatgag	acagcaacca	ttgtagaatt	tctgaacaga	420
tggattacct	tttgtcaaag	catcatctca	acactgactt	ga		462

<210> 6

15 <211> 753

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD58 (LFA3)

20 <400> 6

ES 2 368 152 T3

```

atgggtgctg ggagcgacgc ggggcgggcc ctgggggtcc tcagcgtggt ctgcctgctg      60
cactgctttg gttcatcag ctgtttttcc caacaaatat atgggtggtg gtatgggaat      120
gtaactttcc atgtaccaag caatgtgcct ttaaaagagg tcctatggaa aaaacaaaag      180
gataaagttg cagaactgga aaattctgaa ttcagagctt tctcatcttt taaaaatagg      240
gtttatttag aactgtgtgc aggtagcctc actatctaca acttaacatc atcagatgaa      300
gatgagtatg aaatggaatc gccaaatatt actgatacca tgaagtctct tctttatgtg      360
cttgagtctc ttccatctcc cacactaact tgtgcattga ctaatggaag cattgaagtc      420
caatgcatga taccagagca ttacaacagc catcgaggac ttataatgta ctcatgggat      480
tgtcctatgg agcaatgtaa acgtaactca accagtatat attttaagat ggaaaatgat      540
cttccacaaa aaatacagtg tactcttagc aatccattat ttaatacaac atcatcaatc      600
attttgacaa cctgtatccc aagcagcggg cattcaagac acagatatgc acttataccc      660
ataccattag cagtaattac aacatgtatt gtgctgtata tgaatggtat tctgaaatgt      720
gacagaaaac cagacagaac caactccaat tga                                     753

```

<210> 7  
 <211> 462  
 <212> DNA  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica IL4

```

<400> 7
atgggtctca cctcccaact gcttcccctt ctgttcttcc tgctagcatg tgccggcaac      60
tttgtccacg gacacaagtg cgatatacacc ttacaggaga tcatcaaac tttgaacagc      120
ctcacagagc agaagactct gtgcaccgag ttgaccgtaa cagacatctt tgctgectcc      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 ggaaggcta      420
aagacgatca tgagagagaa atattcaaag tgttcgagct ga                                     462

```

10  
 <210> 8  
 <211> 441  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica IL13

```

<400> 8
atgcatccgc tctcaatcc tctcctggtg gcactgggccc tcatggcgct tttgttgacc      60
acggtcattg ctctcacttg ccttggcggc tttgectccc caggccctgt gctcctctct      120
acagccctca gggagctcat tgaggagctg gtcaacatca cccagaacca gaaggctccg      180
ctctgcaatg gcagatggt atggagcatc aacctgacag ctggcatgta ctgtgcagcc      240
ctggaatccc tgatcaacgt gtcaggctgc agtgccatcg agaagacca gaggatgctg      300
agcggattct gcccgcacaa ggtctcagct gggcagtttt ccagcttgca tgtccgagac      360
accaaaatcg aggtggccca gtttgtaaag gacctgctct tacatttaaa gaaacttttt      420
cgcgaggggac agttcaactg a                                     441

```

20 <210> 9  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 9		
	atgCGgatcc atggatttc aagtgcag	28	
5	<210> 10		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> Cebador sintético		
	<400> 10		
	atgCGaattc ctaacactca ttctgttg	29	
	<210> 11		
	<211> 37		
15	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 11		
20	atgCCcgcgG ggtaccact gaaaactctg actcaac	37	
	<210> 12		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 12		
	actGgacagg gatccagagt tc	22	
	<210> 13		
30	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sintético		
35	<400> 13		
	gaactctgga tccctgtcca gtg	23	
	<210> 14		
	<211> 35		
	<212> DNA		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 14		
	atGCGaattc ttaccCGga gtCCgGgaga agctc	35	

	<210> 15	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 15	
	atgcgaattc gctgtgggcc aggacacgca g	31
10	<210> 16	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
15	<400> 16	
	atgcggggccc aagcttctaa cgtggcttct tctgccaag	40
20	<210> 17	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 17	
	atgcggatcc atgtacagga tgcaactct	30
25	<210> 18	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 18	
	atgcgaattc tcaagtcagt gttgagatga	30
35	<210> 19	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 19	
40	atgctgatc catggtgct gggagcgacg c	31
	<210> 20	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 20	
	atgctaagct ttcaattgga gttggtctg t	31
5	<210> 21	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador sintético	
	<400> 21	
	atgcggatcc atgggtctca cctcccaact	30
	<210> 22	
	<211> 30	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 22	
20	atgcaagctt tcagctcgaa cacttgaat	30
	<210> 23	
	<211> 386	
	<212> PRT	
	<213> Gallus sp.	
25	<220>	
	<223> Ovoalbúmina de huevo de gallina	
	<400> 23	

ES 2 368 152 T3

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

ES 2 368 152 T3

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

5 <213> Bos taurus

<220>  
 <223> Alfa Si-Caseína bovina

<400> 24

ES 2 368 152 T3

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  
 85 90 95  
 Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln  
 100 105 110  
 Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro  
 115 120 125  
 Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His Ala  
 130 135 140  
 Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala Pro  
 180 185 190  
 Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu Lys  
 195 200 205  
 Thr Thr Met Pro Leu Trp  
 210

5 <210> 25  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220>  
 <223> Beta-caseína bovina

<400> 25

ES 2 368 152 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para la obtención de una población de células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos proveniente de una población de leucocitos o de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), comprendiendo dicho método:

- 5           1) estimular la población de PBMC o leucocitos con el antígeno de alimentos o el autoantígeno,  
               2) recuperar la población de células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos de la población de células estimuladas,  
               3) expandir la población de células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos recuperada en la etapa (2) en un medio de cultivo Mp,

10       donde dicha etapa de expansión comprende:

a) cultivar a una temperatura T1 en un medio de cultivo Mf, células alimentadoras capaces de expresar los factores del grupo (A) que comprenden:

- 15           - un anticuerpo anti-CD3 modificado, donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en el reemplazo del dominio intracitoplásmico anti-CD3 de la cadena pesada anti-CD3 con un dominio transmembrana, estando dicho anticuerpo anti-CD3 modificado anclado a la membrana celular de las células alimentadoras y siendo susceptible a interactuar con el complejo de proteínas CD3/TCR de las células T,  
               - la proteína CD80 o CD86, preferiblemente la proteína CD80, anclada a la membrana celular de las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con la proteína CD28 de las células T, y  
 20           - la proteína CD58 anclada a la membrana celular de las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con la proteína CD2 de las células Tr1,  
               - IL-2 segregada por las células alimentadoras, que es susceptible a interactuar con el receptor de IL-2 de las células Tr1, y  
 25           - una interleucina seleccionada entre IL-4 o interleucina 13 (IL-13), preferiblemente IL-4, siendo dicha interleucina segregada por las células alimentadoras y siendo susceptible a interactuar con el receptor de IL-4 de las células Tr1, de modo que T1 permita la proliferación de dichas células alimentadoras,

b) poner en contacto las células alimentadoras obtenidas en la etapa (a) depuradas o no de su medio de cultivo Mf, con la población de células Tr1 específicas de antígenos contenida en el medio de cultivo Mp, donde dicho medio de cultivo Mp no contiene inicialmente dicho grupo (A) de factores con el fin de obtener una mezcla que contenga la población de células Tr1 específicas de antígenos, las células alimentadoras y el medio de cultivo Mp,

c) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (b) que contiene los factores del grupo (A) que son expresados por las células alimentadoras en el medio de cultivo Mp, donde dicha etapa (c) de cultivar se lleva a cabo a una temperatura T2 que es por lo menos aproximadamente 35°C, de modo tal que:

- 35           - la población de células Tr1 específicas de antígenos prolifera, y  
               - las células alimentadoras no proliferan,

y donde la población de células Tr1 específicas de antígenos se expande,

d) recuperar la población de células Tr1 específicas de antígenos así expandida.

40       2. El método según la reivindicación 1, en el que la población de células Tr1 específicas de antígenos de alimentos o autoantígenos se obtiene a partir de una población de PBMC.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la población de PBMC o leucocitos se vuelve a estimular por lo menos una vez con el mismo antígeno después de la etapa (1), en presencia de interleucina-2 (IL-2) y por lo menos una interleucina seleccionada entre interleucina 4 (IL-4) o interleucina 13 (IL-13).

45       4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antígeno de alimentos o el autoantígeno es un antígeno recombinante o sintetizado.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno de alimentos se selecciona entre ovalbúmina, caseína, proteína de soja, sus fragmentos, sus variantes o sus mezclas.

6. El método según la reivindicación 5, en el que el antígeno de alimentos se selecciona entre ovalbúmina de huevo

de pollo de la secuencia SEQ ID N°23, alfa S1-caseína bovina de la secuencia SEQ ID N°24, beta-caseína bovina de la secuencia SEQ ID N°25, secuencias que tienen por lo menos 70% de identidad con una de las secuencias SEQ ID N°23, SEQ ID N°24 y SEQ ID N°25.

- 5 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el autoantígeno se selecciona entre insulina, proteína básica de mielina, sus fragmentos, sus variantes o sus mezclas.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la población de PBMC estimulada en la etapa (1) contiene entre  $0,01,10^6$  y  $100,10^6$  células/mL, preferiblemente entre  $10^6$  y  $2,10^6$  células/mL.
- 10 9. El método según la reivindicación 8, en el que el antígeno de alimentos o el autoantígeno utilizado para estimulación de la población de PBMC en la etapa (1) está en forma soluble de 0,1 µg/mL a 5 mg/mL, preferiblemente de 1 a 2000 µg/mL.
- 15 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la población de PBMC o leucocitos se incuba, antes de la estimulación de la etapa (1), con un marcador fluorescente de división celular que permite determinar, por citofluorometría, que cuando la intensidad de fluorescencia de la población celular estimulada es por lo menos inferior a la intensidad de fluorescencia de la población de PBMC o leucocitos, esa división celular ha ocurrido en dicha población de células estimuladas, y que dicha población de células estimuladas que es recuperada en la etapa (2) comprende la población de células Tr1 específicas de antígenos.
11. El método según la reivindicación 10, en el que el marcador fluorescente de división celular es el marcador de carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE), el marcador diacetato de ácido carboxílico Oregon green 488 (Carboxi-DFFDA SE) o el marcador PKH26.
- 20 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la población de células Tr1 específicas de antígenos se recupera en la etapa (2) por citofluorometría, usando anticuerpos marcados fluorescentes dirigidos contra proteínas presentes en la superficie de las células de dicha población de células Tr1 específicas de antígenos.
- 25 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la población de células Tr1 específicas de antígenos se recupera en la etapa (2) por una técnica de clonación, tal como ventajosamente dilución limitante.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la población de PBMC o leucocitos es una población humana.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las células alimentadoras mueren durante la etapa (c).
- 30 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que en la etapa (d) se eliminan los fragmentos de membrana celular de las células alimentadoras que resultan de la muerte de dichas células.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que las células alimentadoras son células recombinantes y contienen ácidos nucleicos heterólogos que codifican los factores del grupo (A).
- 35 18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que las células alimentadoras no tienen ninguna molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I y/o II en su superficie.
19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que en la etapa (b) las células alimentadoras son depuradas de su medio de cultivo Mf.
20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que las células alimentadoras son células alimentadoras de insectos, siendo T1 inferior a T2.
- 40 21. El método según la reivindicación 20, en el que las células alimentadoras son de la línea celular de drosófila S2 depositada el 25 de marzo de 2005 en National Collection of Micro-organisms Cultures (CNCM) con el número 1-3407.
22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el medio de cultivo Mp es un medio de cultivo libre de suero.
- 45 23. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el medio de cultivo Mf es un medio de cultivo libre de suero.
24. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el dominio transmembrana que reemplaza al dominio intracitoplásmico de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 es el dominio transmembrana del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
- 50 25. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que los factores del grupo (A) son de origen humano.

- 5 26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 modificado está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°1, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°1, y donde la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 modificado está codificada por ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°2, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°2.
27. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que la proteína CD80 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°3, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°3.
- 10 28. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en el que la proteína CD86 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°4, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°4.
29. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que la proteína CD5 8 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°6, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°6.
- 15 30. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que la IL-2 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°5, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°5.
- 20 31. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en el que la IL-4 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°7, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°7.
32. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el que la IL-13 está codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia SEQ ID N°8, o cualquier ácido nucleico que tenga por lo menos 70% de identidad con SED ID N°8.
- 25 33. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en el que la población de células Tr1 específicas de antígenos así expandida se recupera en la etapa (d) después de haber cultivado la población de células Tr1 específicas de antígenos en la etapa (c) durante por lo menos 12 horas, ventajosamente 24 horas.

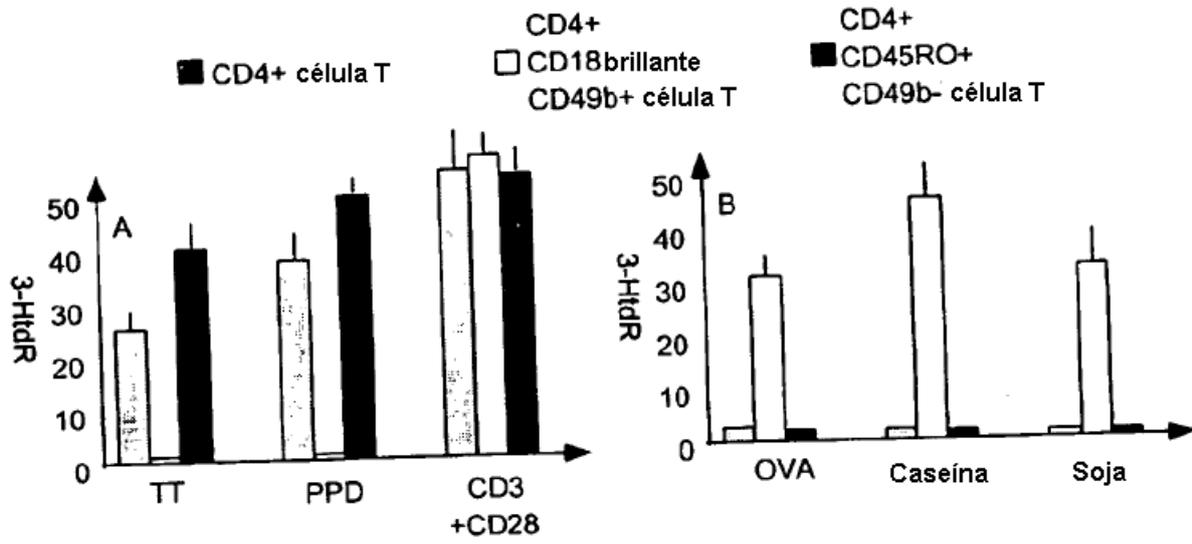


Figura 1

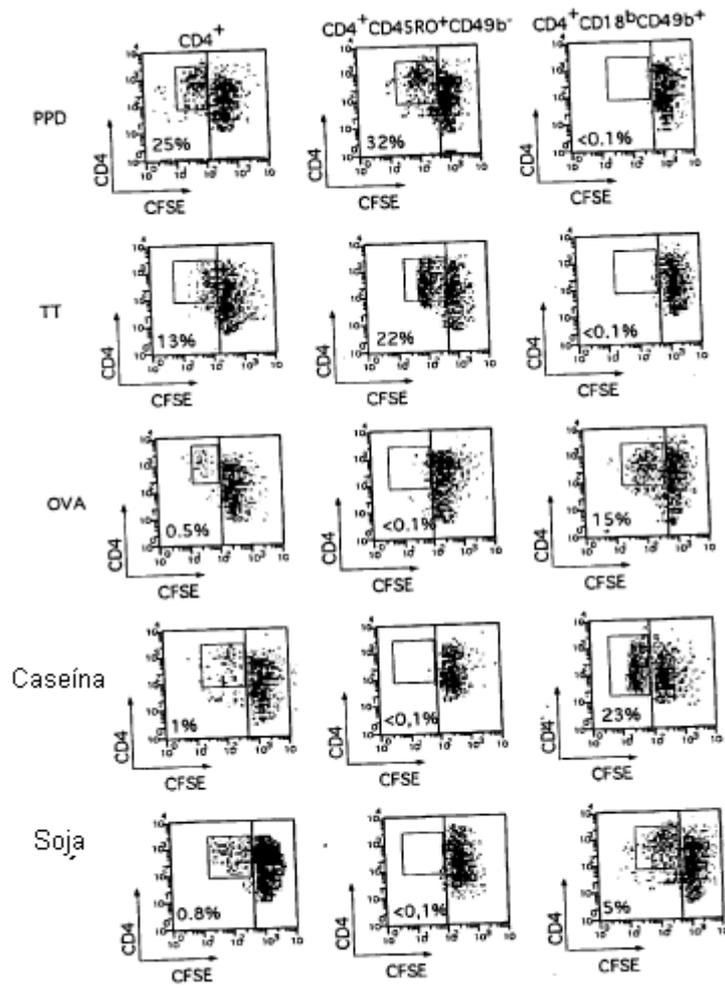


Figura 2

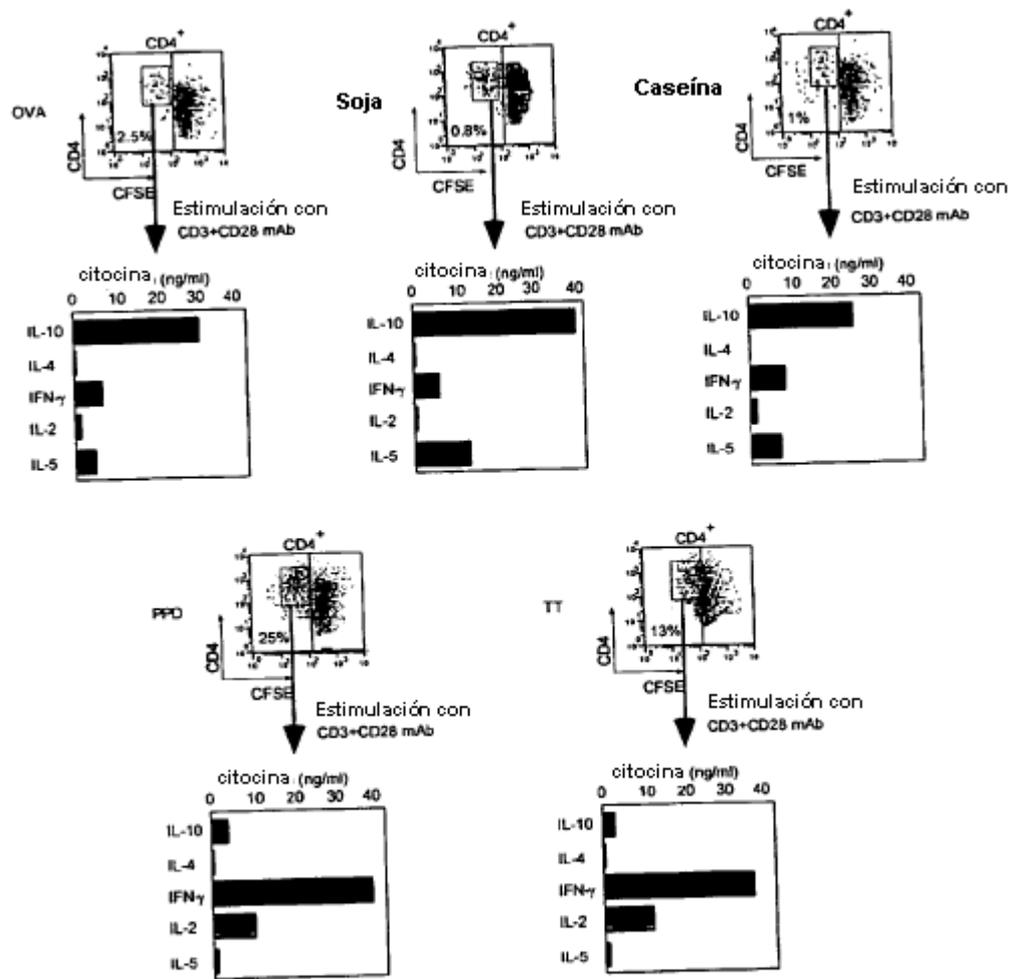


Figura 3

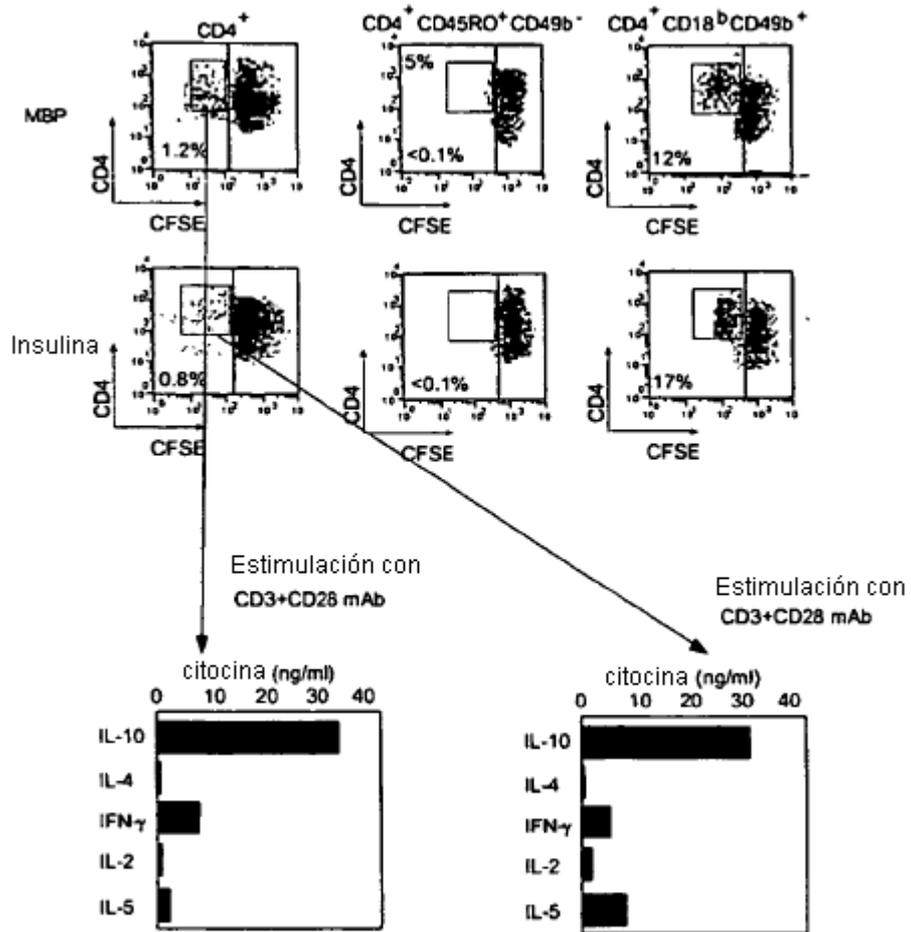


Figura 4

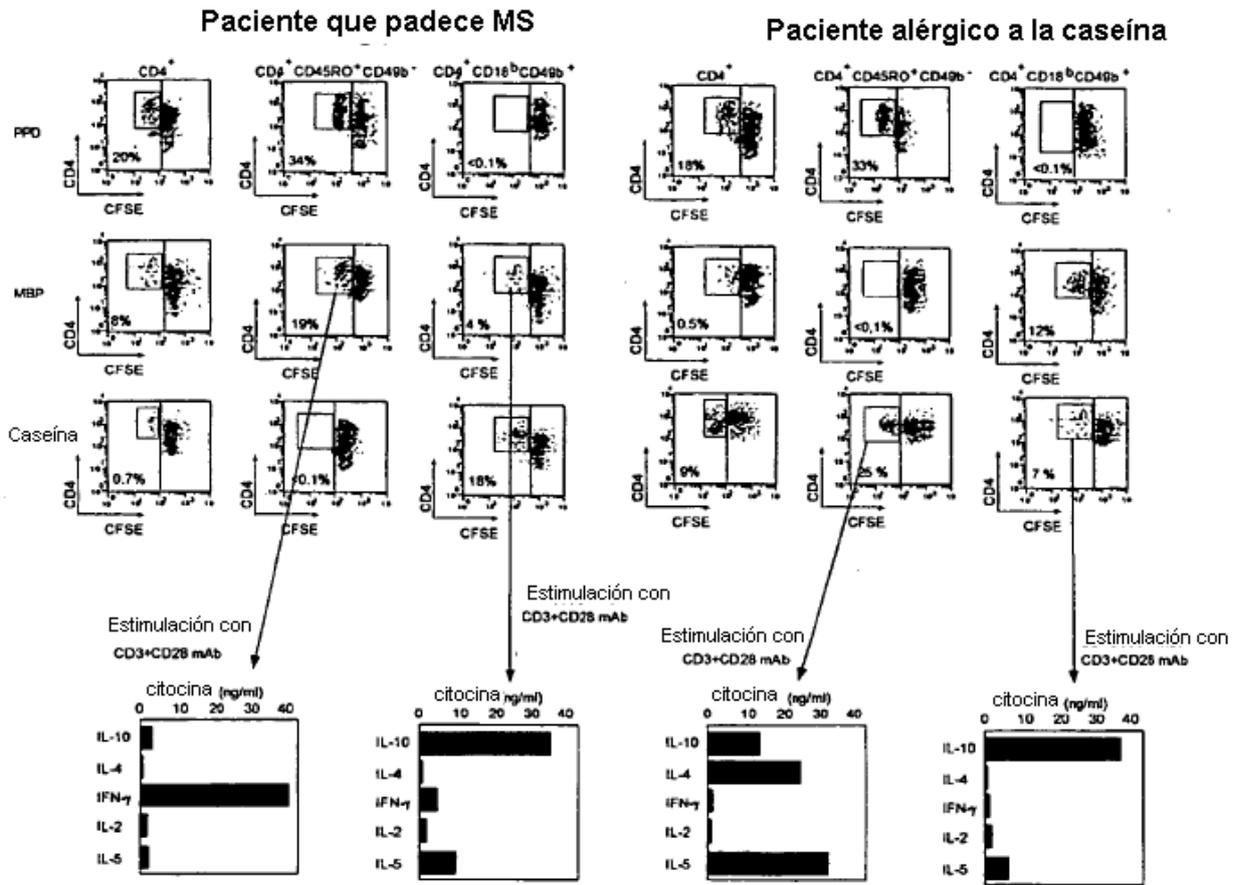


Figura 5

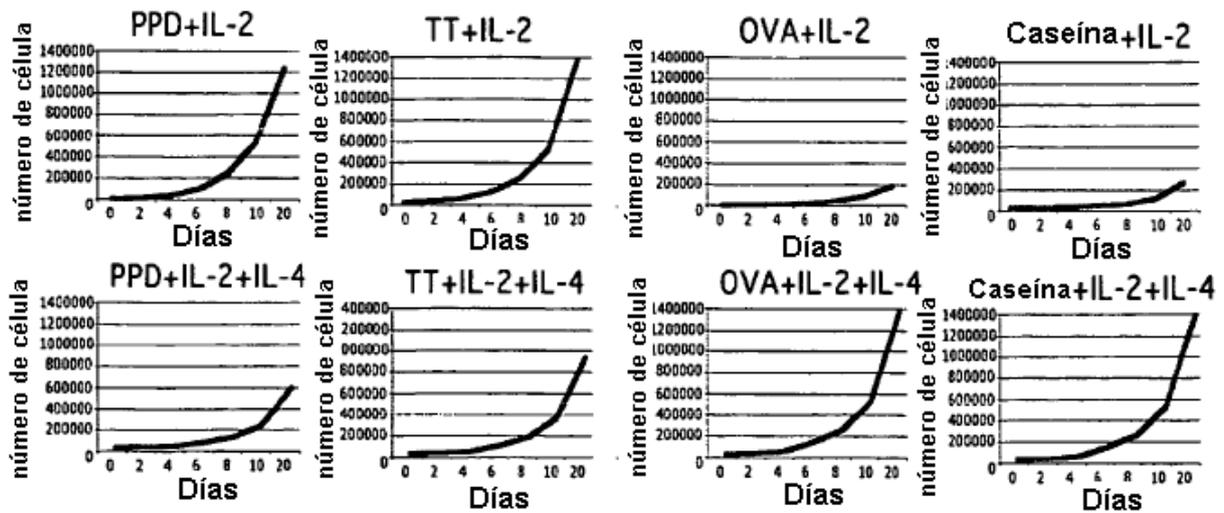


Figura 6

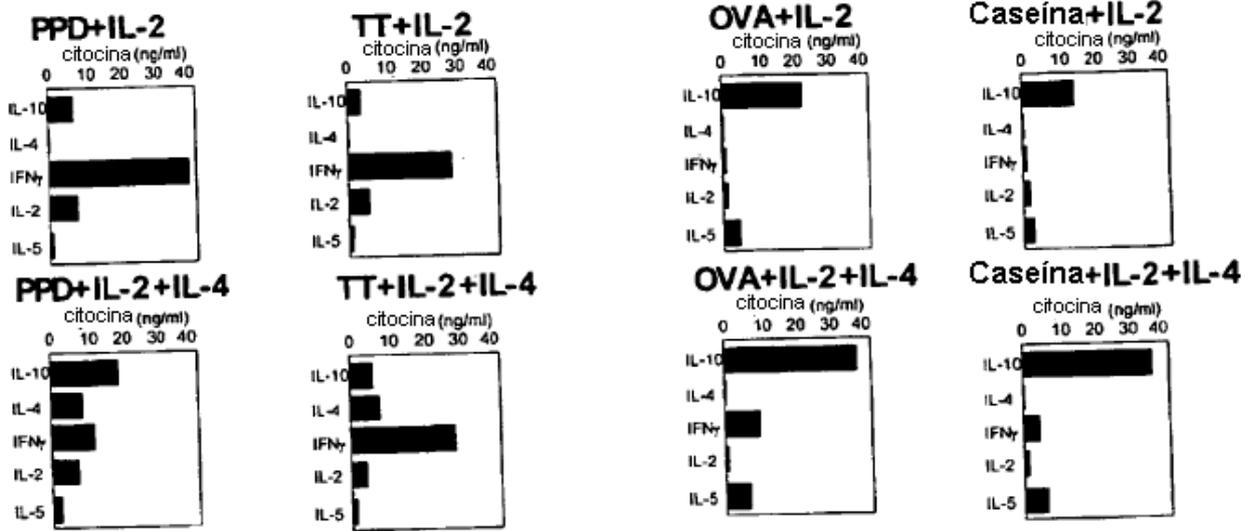


Figura 7

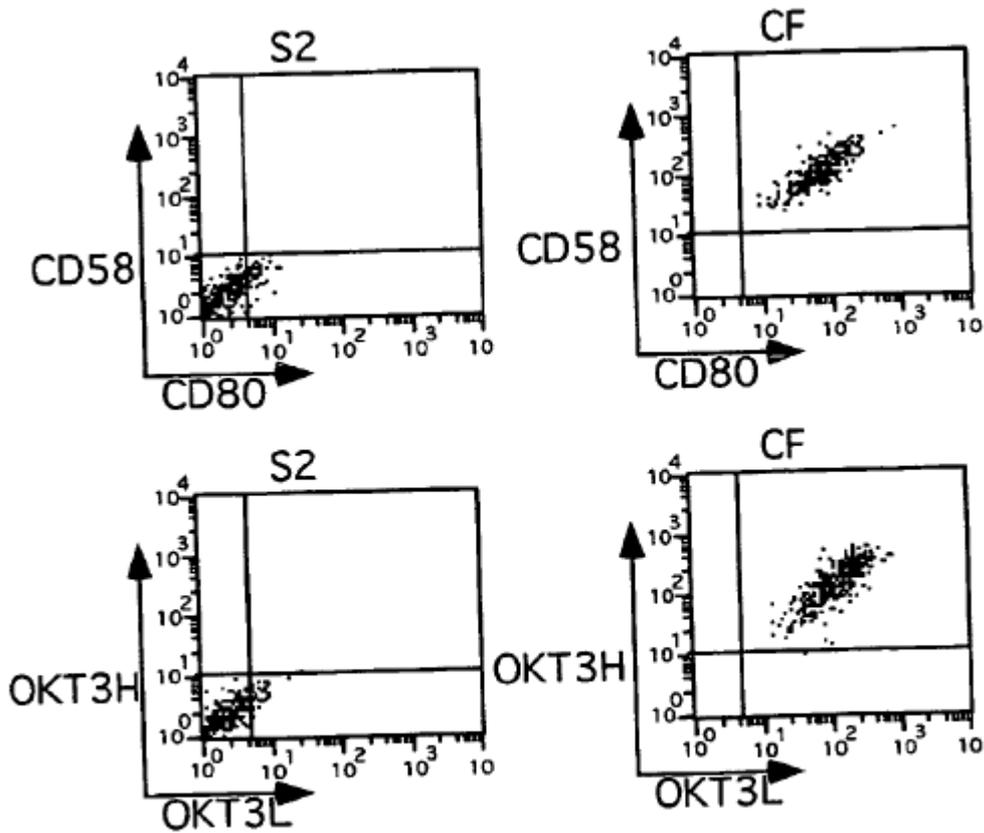


Figura 8

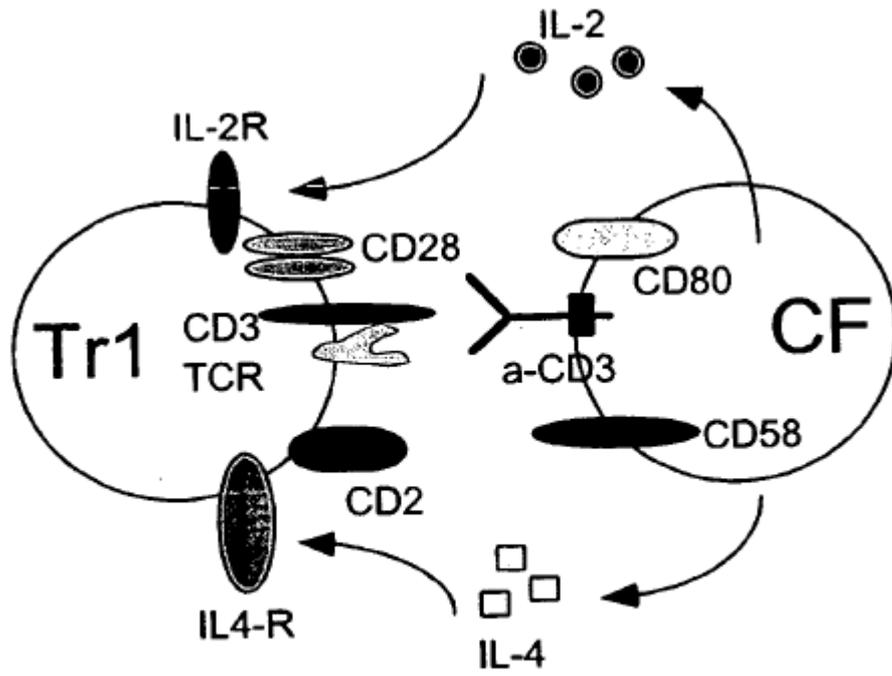


Figura 9

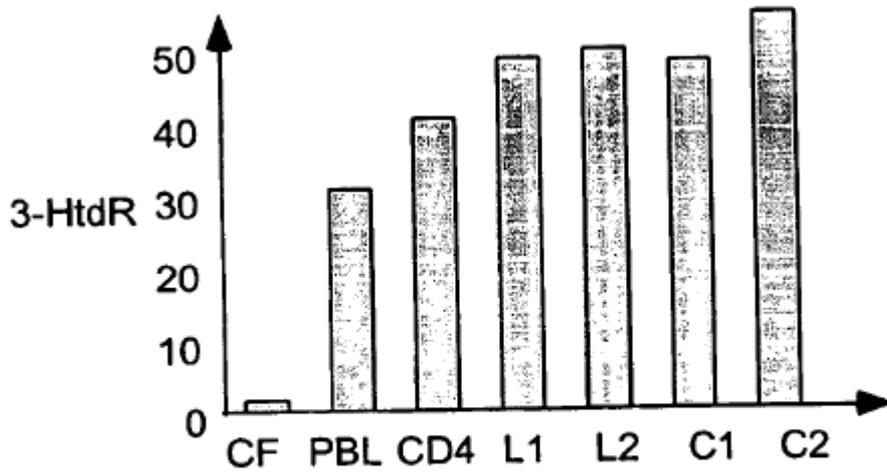


Figura 10

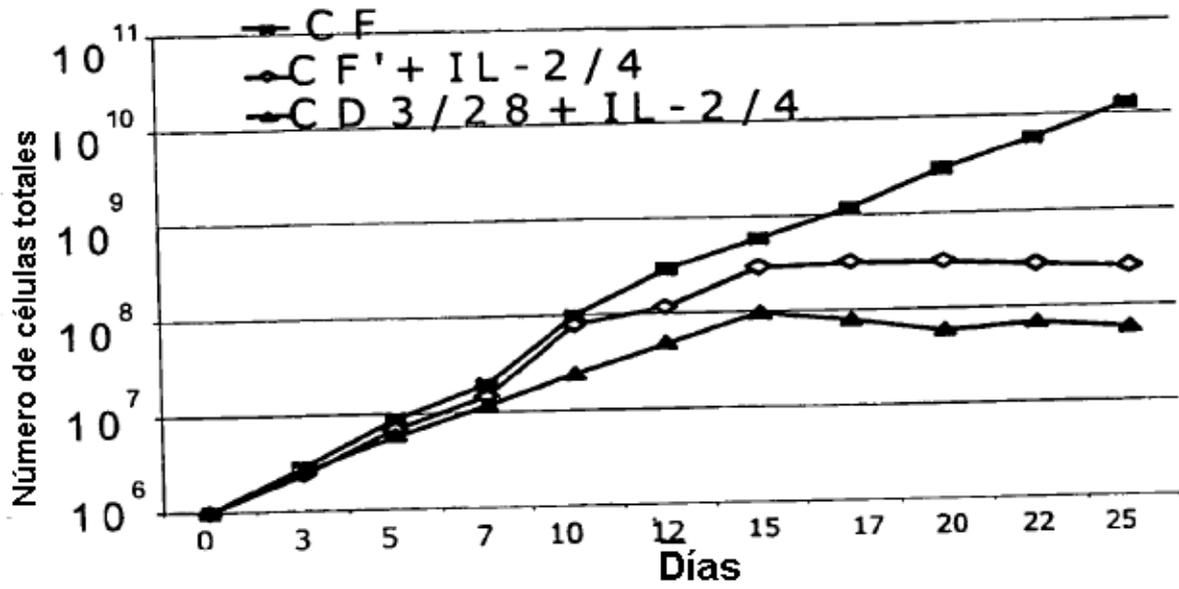


Figura 11

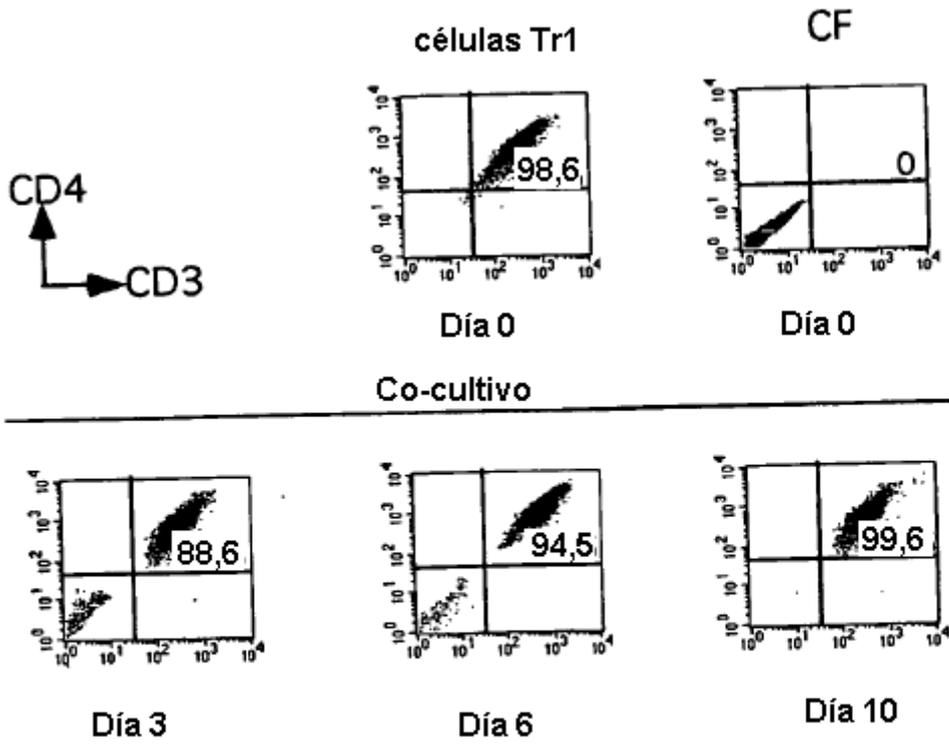


Figura 12

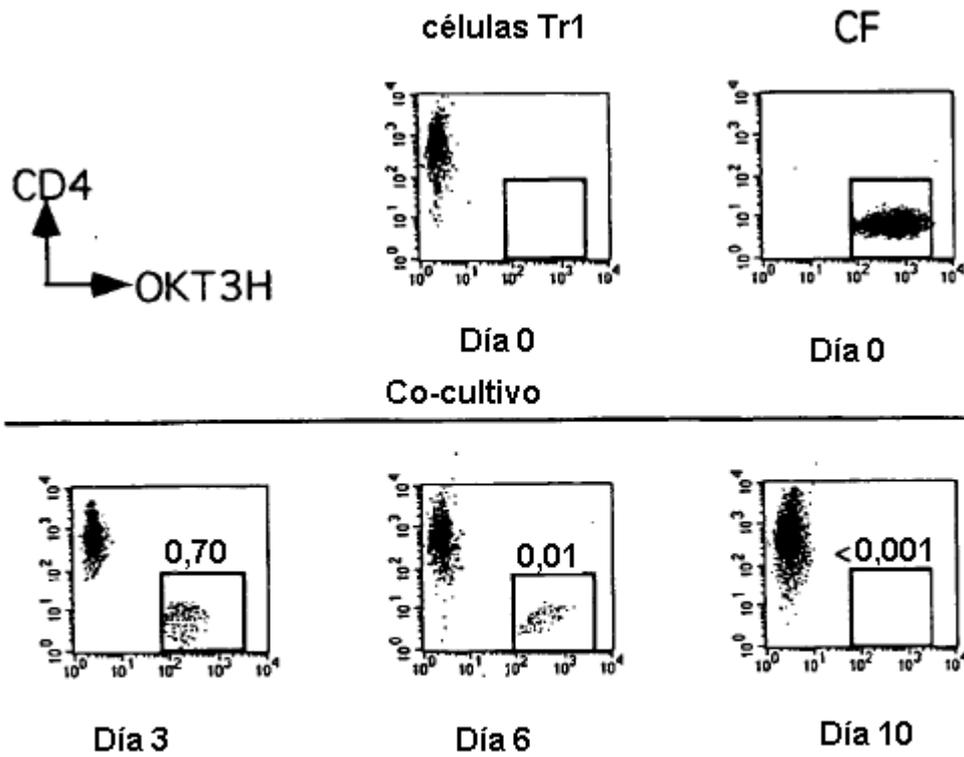


Figura 13

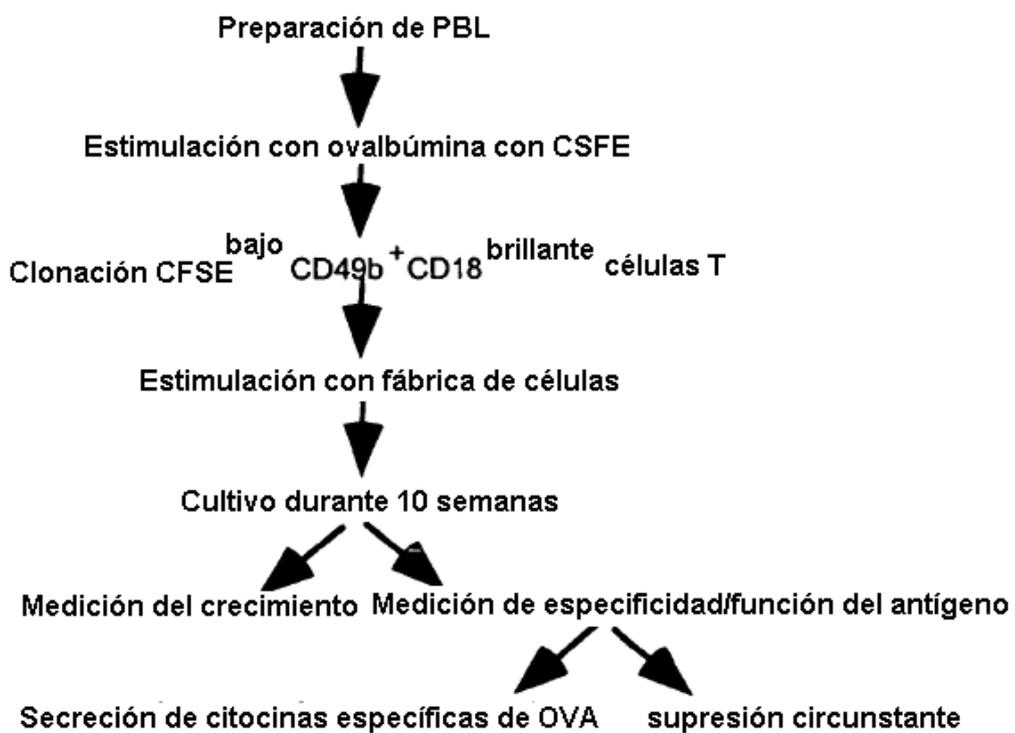


Figura 14

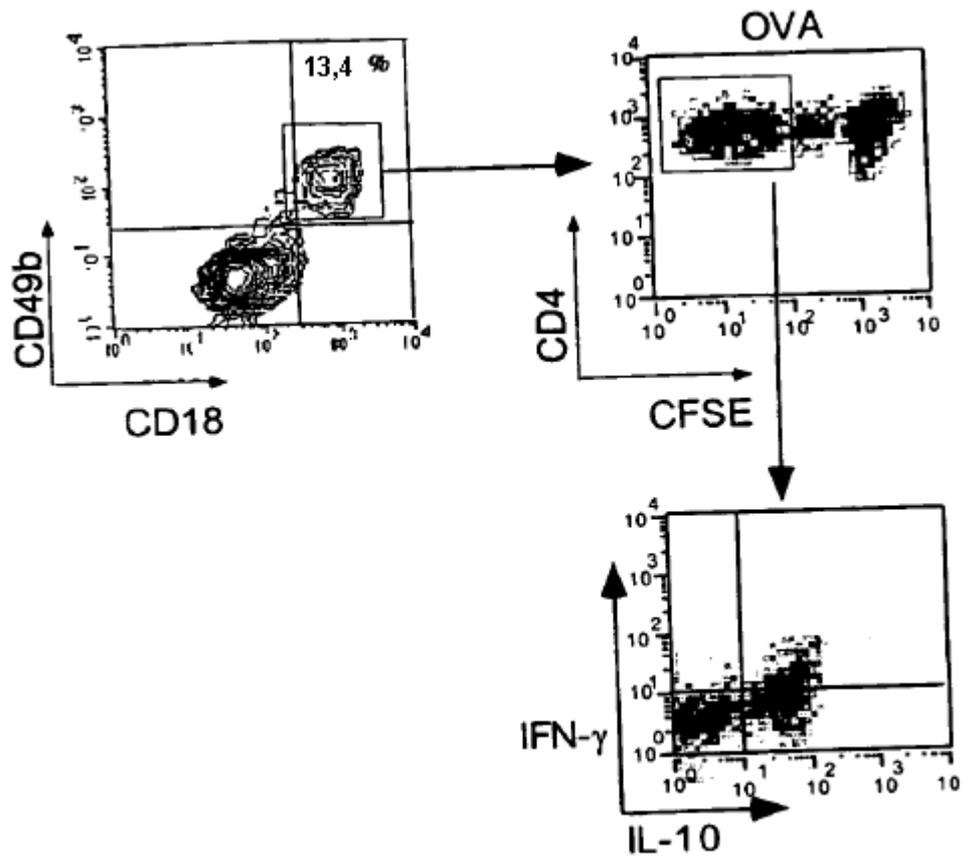


Figura 15

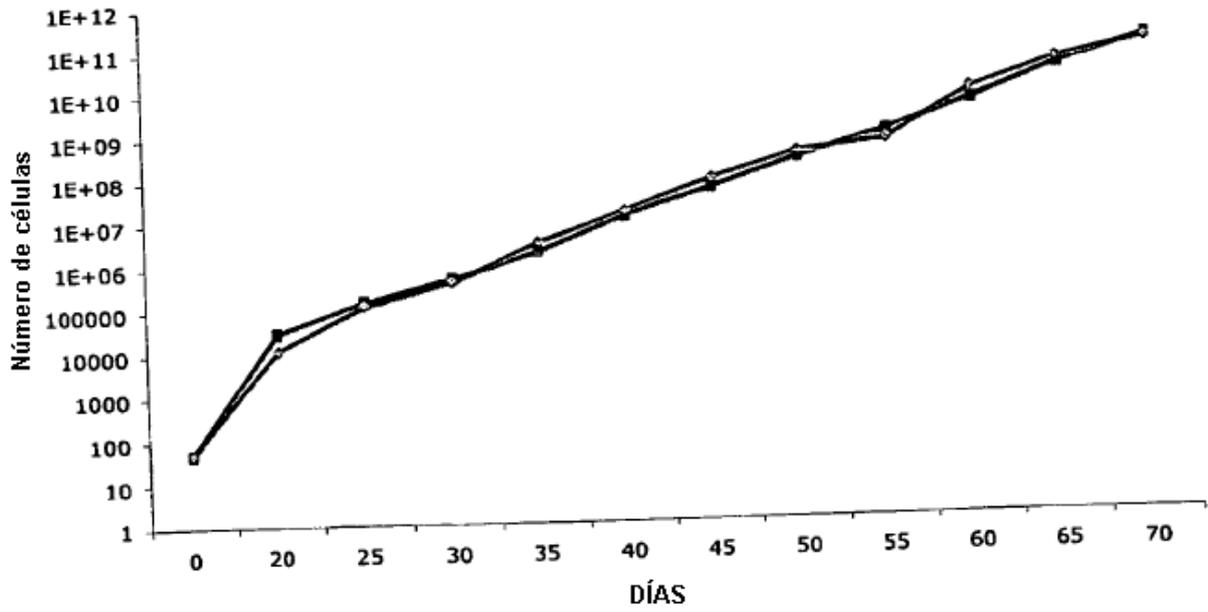


Figura 16

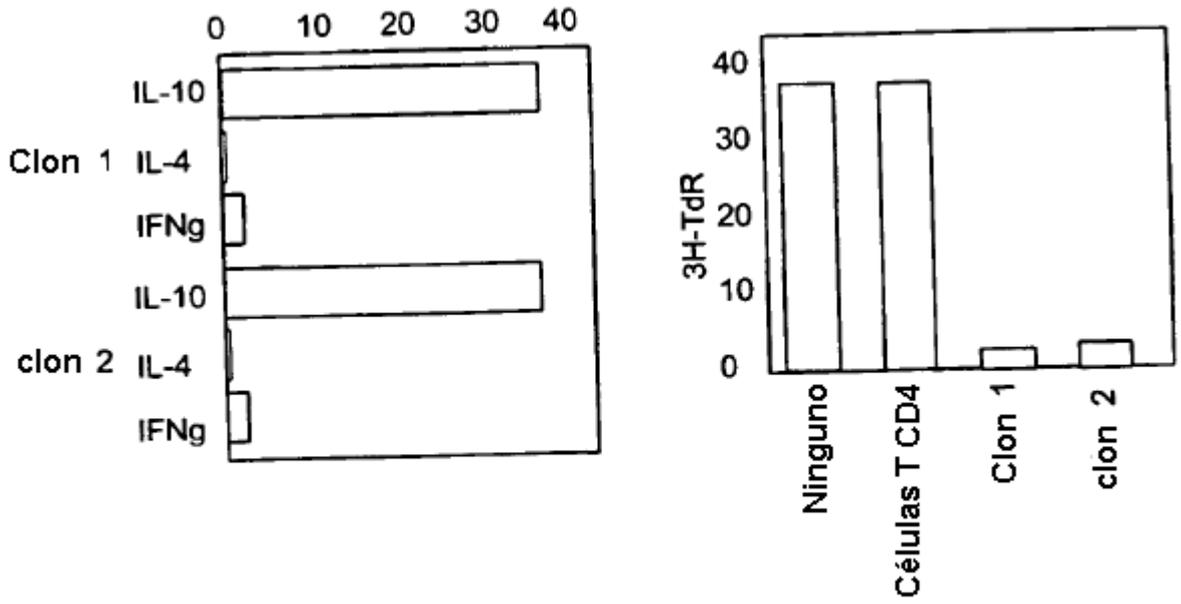


Figura 17