

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 502**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06743329 .2**

96 Fecha de presentación: **18.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1869166**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Producción in vitro de una población de células usando células nodrizas**

30 Prioridad:
15.04.2005 EP 05290836

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2012

73 Titular/es:
**TXCELL (50.0%)
LES CARDOULINES HT1 ALLÉE DE LA
NERTIÈRE
06560 VALBONNE, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)**

72 Inventor/es:
**GROUX, HERVÉ;
COTTREZ, FRANÇOISE;
BASTIAN, HERVÉ y
BRUN, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:
LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 389 502 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

Producción *in vitro* de una población de células usando células nodrizas

La invención se relaciona con un método para la expansión *in vitro* de una población de células P' a partir de una población de células P, dicha expansión requiere la presencia de al menos dos factores que se expresan por las células nodrizas de insecto, en donde a) las células nodrizas proliferan a una temperatura T1, b) las células nodrizas están en contacto con la población de células P, c) la mezcla celular obtenida en la etapa (b) se cultiva a una temperatura T2 la cual se selecciona de manera que la población de células P proliferen y las células nodrizas no proliferen, el al menos un factor se expresa por las células nodrizas, y d) la población de células P' así obtenida se recupera. Ventajosamente, la producción consiste en una expansión, las células nodrizas son células nodrizas de insecto y la población de células P que prolifera es una población de linfocitos T, preferentemente una población de linfocitos Tr1.

La terapia celular es un grupo de nuevas técnicas basadas en particular en reemplazar células afectadas o disfuncionales con sanas, que están en funcionamiento. Además, la terapia celular tiene aplicaciones en inmunoterapia involucrando linfocitos. Estas nuevas técnicas se aplican a una amplia variedad de enfermedades humanas, incluyendo muchos tipos de cáncer, enfermedades neurológicas tales como el Parkinson y la enfermedad de Lou Gehrig, lesiones de la médula espinal, y diabetes, las enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

Las células son componentes básicos del cuerpo humano y mantienen muchas de las claves de cómo funciona el cuerpo. Las células tienen un rol tanto estructural como funcional en el cuerpo, ejecutando una variedad casi infinita de acciones para mantener los tejidos y órganos del cuerpo. Existen cientos, quizás miles de tipos distintos de células especializadas en el cuerpo de un adulto. Todas estas células desempeñan funciones muy específicas para el tejido u órgano que componen. Estas células maduras se diferencian, o se dedican a ejecutar sus tareas especiales.

Los trasplantes de médula ósea son un ejemplo de terapia celular en los cuales las células madre en un donante de médula ósea se usan para reemplazar las células sanguíneas de las víctimas de leucemia y otros tipos de cáncer. La terapia celular también se usa en experimentos para injertar nuevas células de la piel para tratar a víctimas de quemaduras graves, y para crecer de nuevo la córnea para los débiles visuales. En todos esos usos, el objetivo es que las células sanas se integren dentro del cuerpo y comiencen a funcionar como las células propias del paciente. Además, numerosos estudios están actualmente en proceso para cebar y expandir linfocitos T para usarlos como tratamiento inmunoterapéutico para el cáncer y enfermedades infecciosas, entre otros.

Sin embargo, hay varios retos científicos que deben superarse en el campo de la terapia celular. Uno de los retos consiste en proporcionar sistemas de expansión/diferenciación para inducir a una población de células a que proliferen rápidamente durante largo tiempo y en cantidad suficiente. Por ejemplo, en ensayos clínicos de inmunoterapia de células T, se usan miles de millones de células. Con el fin de producir estas cantidades de células, se requiere normalmente la expansión de células de 1000 a 4000 veces. Además, para un potencial de trasplante óptimo y posibles beneficios terapéuticos, es importante garantizar que las células, después de la expansión *in vitro*, sean funcionales, no envejezcan y que no estén contaminadas en el momento de la administración a un paciente

Una posibilidad para obtener una población celular de interés es su identificación en una muestra biológica, basado en la determinación de la presencia de marcadores específicos para la población celular en cuestión, y entonces proceder a su enriquecimiento eliminando las células que no expresan marcadores específicos. Sin embargo, dicho método no proporciona una cantidad suficiente de células para la terapia o con fines de investigación. Así pues, existe la necesidad de un sistema de producción de células en donde dichas células pueden diferenciarse y/o expandirse, tal como un sistema de expansión celular capaz de mantener un crecimiento exponencial de una población celular por al menos dos o tres meses *in vitro*, y tener una población celular muy bien caracterizada para los propósitos de inyección, en contraste con una población de células mixta enriquecida con las células requeridas pero contaminadas con células que pueden tener efectos adversos.

En el campo de la inmunoterapia, los métodos de clonación y expansión de células T han mostrado tener ciertos inconvenientes, entre ellos la apoptosis y cultivos a largo plazo (se requieren varios meses) para obtener una cantidad suficiente de células procedentes de un único clon. Se ha demostrado previamente que las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 pueden usarse como células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) para apoyar el crecimiento a largo plazo de células T CD4+ (ver la patente norteamericana publicada el 5 de marzo de 2002 con el número US 6,352,694). Sin embargo, las perlas o placas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 no pueden apoyar el crecimiento a largo plazo de las células T CD8+ purificadas, y se incluyen otras limitaciones, como son el elevado costo de las perlas, el proceso de trabajo intenso involucrado para remover las perlas del medio de cultivo antes de la infusión, y el hecho de que el sistema basado en las perlas se restringe por la necesidad de la aprobación del control de calidad de GM (Buena Fabricación) antes del comienzo de cada aplicación.

La solicitud de patente norteamericana publicada el 7 de agosto de 2003 con el número US 2003/0147869 describe el uso de aAPC manipuladas por los inventores para imitar células dendríticas en su capacidad para estimular el crecimiento rápido de CTL. Según esta solicitud de patente, la línea celular eritromieloide K562 se usa porque (1) es de origen humano; (2) carece de moléculas MHC de clase I y II para evitar la respuesta alogénica; (3) crece bien usando medio libre de suero; (4) se ha usado ampliamente en la bibliografía (más de 5700 referencias); (5) se ha caracterizado citogenéticamente; y (6) ha sido aprobada en la primera fase de ensayos clínicos.

Ciertamente, las células eucariotas se prefieren usualmente en lugar de células procariotas, puesto que la expresión de proteínas eucariotas en células eucariotas puede provocar la glicosilación parcial o completa y/o la formación de enlaces disulfuro intra o intercatenarios de una proteína recombinante.

Un inconveniente importante relacionado con el uso de tales aAPC es que es necesario proceder a su irradiación antes de contactar con la población celular a expandir, para frenar su crecimiento. Esta irradiación requiere estimular repetidamente la población celular a expandir, y llevar a la consiguiente introducción de aAPC irradiada en el entorno clínico. Además, la irradiación de aAPC puede causar mutaciones genéticas, que pueden conducir a la producción de factores no deseables. Tales mutaciones no pueden ser controladas y no es posible estar totalmente seguros de que la proliferación ha detenido la proliferación de todas las aAPC.

Otro inconveniente correlacionado con el uso de células eucariotas aAPC es que estas pueden permitir la proliferación de los virus eucariotas presentes en la población celular a expandir.

Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que es posible producir una población de células P' a partir de una población celular P usando un sistema de células nodrizas de insecto que difiere del actual sistema aAPC. Dicho sistema de células nodrizas de insecto consiste en células nodrizas que expresan factor (es) que permiten la producción de dicha población celular P', en donde la temperatura de cultivo de las células nodrizas (T_1) es diferente del de la población celular P (T_2) de la cual se produce la población celular P'. Las células nodrizas se cultivan primeramente a una temperatura T_1 en un medio de cultivo Mf. Cuando las células nodrizas se ponen en contacto con la población celular P, se pueden remover o no de su medio de cultivo Mf. El medio de cultivo Mp inicialmente no contiene los dos factores mínimos. La mezcla de células nodrizas obtenida, la población celular P y el medio de cultivo Mp se cultivan entonces a una temperatura T_2 . Los al menos dos factores se expresan por las células nodrizas y por lo tanto están contenidos en el medio de cultivo Mp. La población celular P prolifera, pero no las células nodrizas. La población celular P' que se produce de este modo se recupera finalmente.

Este nuevo método, gracias a los cambios de temperatura, evita la irradiación de las células nodrizas de insecto. Dicho sistema de células nodrizas de insecto permite la expansión y/o diferenciación de una población celular P para obtener una población de células P' expandidas y/o diferenciadas.

Preferentemente, se proporciona un método para la expansión *in vitro* de una población P' de células T de mamíferos a partir de población P de células T de mamíferos en un medio de cultivo Mp, de acuerdo con la reivindicación 1.

La proporción [células nodrizas: población de células P] es indiferente cuando se adicionan las células nodrizas a la población de células P (etapa (b)). Ventajosamente, esta proporción puede ser entre [1:3] y [3:1], más ventajosamente [1:1].

La población de células P puede ser de cualquier origen de organismo vivos tales como peces, o preferentemente de origen mamífero, como seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, y especies transgénicas de los mismos. Por ejemplo, los mamíferos dentro del alcance de la invención incluyen a animales de interés agrícola, tales como ganado y aves.

Las células nodrizas pueden ser de cualquier tipo, siempre que no proliferen a la temperatura de cultivo de la población de células P (T_2).

El experto que tiene amplia experiencia del cultivo celular, conoce las condiciones específicas a usar, en particular las temperaturas de cultivo T_1 y T_2 de cada población de células nodrizas y población celular P a partir de la cual se produce la población celular P'. El medio de cultivo Mf y Mp pueden ser de cualquier clase, siempre que sean adecuados para dicha célula nodriza y dichos tipos de poblaciones celulares, y serán fácilmente seleccionados por la persona experta (el medio de Schneider...).

El término "producción" abarca la expansión y/o diferenciación y/o estimulación de una población celular P. En una modalidad particular, la producción de la población celular F a partir de la población celular P consiste en una expansión. En la presente solicitud, los términos "expansión", "proliferación" y "crecimiento" se pueden emplear de manera intercambiable y se refieren al número creciente de células en una población celular. Las expresiones "sistema de expansión celular", "sistema de expansión de célula nodriza" y "fábrica celular" se refieren

indistintamente a un dispositivo que incluye las células nodrizas de la presente invención. Preferentemente la población celular P prolifera exponencialmente.

5 Los métodos de monitoreo de la expansión de las poblaciones celulares son bien conocidos por un experto en la materia tales como, por ejemplo, la inspección al microscopio, por el uso de un contador electrónico de partículas, o indirectamente por la medición de la incorporación de timidina-3H en el ADN celular. Puede usarse también el método de cambio de un pigmento soluble en agua de color amarillo el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazolio (MTT), al producto violeta insoluble (MTT-formazan por la succinato dehidrogenasa presente en la mitocondria celular (Amersham Biosciences Corp., Estados Unidos, etc.), o el CFSE (succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína).

15 Se considera que la etapa (b) se pone en contacto las células nodrizas de la población celular P, y la etapa (c) cultivar la mezcla a la temperatura T_2 , generalmente son etapas simultáneas: antes de poner en contacto, las células nodrizas y la población celular P se cultivan por separado, respectivamente, unas a la temperatura T_1 en el medio de cultivo M_f y las otras a la temperatura T_2 en el medio de cultivo M_p . Después, las células nodrizas "solas", o el medio de cultivo M_f que contiene las células nodrizas se pone (n) en contacto con la población celular P que está presente en el medio de cultivo M_p y que se mantiene a la temperatura T_2 . En consecuencia, las células nodrizas pasan inmediatamente de la temperatura T_2 a la temperatura T_2 y dejan de proliferar, a diferencia de la población celular P, a partir de la cual se produce la población celular P' gracias a los al menos dos factores que se expresan por las células nodrizas.

25 Es posible mantener durante largo tiempo el crecimiento exponencial *in vitro* de la población celular a partir de la cual se produce la población celular P', tal como al menos dos o tres meses, volviendo a poner en contacto periódicamente las células nodrizas con la población celular P, por ejemplo, cada semana.

Más ventajosamente, las células nodrizas mueren durante la etapa (c) debido a la temperatura T_2 la cual no es más apropiada para el cultivo de las células nodrizas. Más ventajosamente, la membrana celular y los fragmentos de ADN de las células nodrizas resultantes de la muerte de dichas células se eliminan en la etapa (d).

30 Después de un tiempo suficiente de cultivar la población celular P en la etapa (c) tal como preferentemente varias horas, el medio de cultivo obtenido M_p se compone por una mezcla de dicha población celular obtenida P', células nodrizas viables y opcionalmente los fragmentos de la membrana celular de las células nodrizas y la población celular P' tiene que recuperarse en la etapa (d). Esa recuperación puede hacerse al separar la población celular P' de las células nodrizas viables y opcionalmente de dichos fragmentos de membrana celular usando cualquier método apropiado de separación conocido por el experto en la materia, tal como, por ejemplo, la citometría de flujo usando un ligando marcado específicamente capaz de unirse en la superficie de las células nodrizas o una proteína de la superficie celular de la población celular P'. También se pueden emplear otros métodos como los métodos de lavado y/o centrifugado, tales como la centrifugación en gradiente de densidad usando un medio de separación como Ficoll[®], tal centrifugación es un método adecuado para eliminar los fragmentos de la membrana celular.

45 En una modalidad particularmente ventajosa, el método para la producción *in vitro* de una población de células T de mamífero de acuerdo con la invención comprende la etapa (d) en donde los fragmentos de la membrana celular y el ADN o los fragmentos de ADN de las células nodrizas se eliminan mediante un proceso que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- opcionalmente, una etapa de lavado con una solución de albúmina,
- una etapa de separación en una solución de gradiente de densidad, en donde el índice de densidad está comprendido entre aproximadamente 1,120 y aproximadamente 1,146, preferentemente entre 1,120 y aproximadamente 1,146.

50 El experto conoce que el índice puede variar entre 10^4 a 10^{-3} , que son variaciones mínimas que no afectan los resultados obtenidos.

55 La etapa de lavado en una solución de albúmina permite separar bien y despegar las células unas de otras (por ejemplo, la población de células T o la población de células nodrizas de células T), que permite obtener mejores rendimientos de purificación de la población de células T, tras la etapa de separación en la solución en gradiente de densidad.

La albúmina puede obtenerse del LFB (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, 3 av des Tropiques-BP305-Les ULIS-91958 Courtaboeuf Cedex Francia).

60 La etapa de lavado en una solución de albúmina podría ser como sigue:

- La población de células T y las células nodrizas se cuentan después de haber sido recuperadas en un medio de cultivo.
- Se realiza una etapa de centrifugación, por ejemplo, a 300g durante 5 minutos y entonces se elimina el sobrenadante.
- 5 - Se resuspenden las células a una concentración comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 millones por mililitro, en una solución de albúmina al 4%.
- Las células que se encuentran en la solución de albúmina se colocan bajo agitación durante al menos aproximadamente 30 minutos, a temperatura ambiente.

10 El experto en la materia es consciente de cómo realizar la etapa de lavado en una solución de albúmina, y la adaptará para obtener una solución de células en donde dichas células están bien separadas unas de otras. La etapa de separación en una solución en gradiente de densidad: existe una técnica de separación de los linfocitos T, que actualmente se usa en inmunología, para aislar células T de glóbulos rojos y granulocitos. Este es el Ficoll, que funciona de acuerdo a las diferencias de densidad de los diferentes tipos celulares. El Ficoll tiene una densidad de 1,077. Este método funciona en la presente etapa de separación, pero ofrece rendimientos de purificación de
15 células T a partir de células nodrizas que son decepcionantes.

El método de separación usado en la etapa de separación de la presente invención ya existe, el cual se basa también en la densidad, pero el cual se usa para separar diferentes organelos celulares o componentes citoplasmáticos, así como virus y bacterias.

20 La presente invención usa otro gradiente de densidad, por ejemplo, el Nicodenz® puede ser usado, el cual está en forma de polvo. Cuando se prepara la disolución (por ejemplo, en un tampón Tris, es posible modificar la densidad, lo cual no es posible usando el Ficoll, que está a una densidad de 1,077.

25 La etapa de separación en una solución por gradiente de densidad podría consistir en lo siguiente:

- Después de 30 min de agitación, se vierten 20ml de Nycodenz (densidad entre 1,120 y 1,146) a 4°C en un tubo 50ml.
- Verter la solución Tr1-Albúmina usando una Pipeta P1000 (ml/ml), lo más suavemente posible, con la parte superior de la solución de Nycodenz.
- 30 - Este tubo se centrifuga después a 4°C a 530g durante 25 minutos y sin interrupción (durante la centrifugación el Tr1, debido a su densidad, se concentrará en la interfase entre el Nycodenz y el medio que contiene el Tr1 (a esto llamamos un "anillo"), las células S2 que presentan mayor densidad caerán en la parte inferior del tubo.
- El "anillo" se recupera delicadamente usando una pipeta P1000, lentamente.
- 35 - el anillo se lava después en un nuevo tubo de 50ml con albúmina al 4%.
- el tubo es entonces centrifugado a 4°C a 530g durante 10 minutos (con interrupción), (para lavar las células y deshacerse del residual de Nycodenz).
- Las células Tr1 pueden ahora suspenderse en su medio de cultivo.

40 Debe señalarse que la eliminación de los fragmentos de membrana celular de las células nodrizas no es obligatorio, pero se recomienda tanto más cuando la población celular P' se obtiene para fines de terapia celular. De cualquier otra forma, existe un riesgo que dicha población celular P' esté contaminada.

Ventajosamente, los al menos dos factores se seleccionan del grupo que comprende factores anclados a la membrana celular de las células nodrizas o factores secretados por dichas células nodrizas. Más ventajosamente, dichos al menos dos factores interactúan con las proteínas de la superficie celular de la población celular P. Por supuesto, dichos al menos dos factores también pueden interactuar con las proteínas de la superficie celular de la población celular P' que se obtienen durante la etapa (c).

50 Cuando las células nodrizas se cultivan en la etapa (a), expresan dichos al menos dos factores en su superficie de la membrana celular y en el medio de cultivo Mf. En la etapa (b) de poner en contacto el "factor de membrana" ya está anclado a la membrana de las células nodrizas, pero el "factor secretado" puede eliminarse si las células nodrizas se aclaran previamente de su medio de cultivo Mf. De todos modos, tanto el "factor de membrana" como el "factor secretado" se expresan por las células nodrizas en la etapa (c), aunque las células nodrizas no proliferen más, y hasta la muerte de dichas células nodrizas. Es posible incluso que el "factor de membrana" anclado a los fragmentos de membrana celular de las células nodrizas muertas sigan desempeñando un papel en la producción de la población celular P'.

60 La población celular P a partir de la cual se produce la población celular P' tiene proteínas de superficie celular que están implicadas en las señales celulares que permiten la producción de dicha población celular P'. Tales proteínas de la superficie celular se activan mediante ligandos específicos, o factores, que se proporcionan en la presente invención por células nodrizas: para obtener la población celular P', las células nodrizas expresan al menos dos

factores permitiendo la producción de la población celular P'. El experto en la materia conoce qué factores concretos se tienen que expresar en las células nodrizas de manera que estos factores interactúen con una proteína de la superficie celular de la población celular P.

5 Dichos al menos dos factores, que se expresan por las células nodrizas y que son necesarios para la producción de dicha población celular P', pueden ser de cualquier tipo, como, por ejemplo, pero sin limitación alguna, un factor de crecimiento, un factor de diferenciación, en particular cuando la población celular P tiene que diferenciarse, una molécula co-estimuladora o una interleuquina.

10 Los términos y expresiones "proteína", "polipéptido", "péptido" empleados en la presente solicitud se refieren indistintamente a una molécula formada por la unión de una cadena larga de elementos más pequeños, los aminoácidos. Un "complejo de proteínas" se refiere en la presente a la unión de al menos dos cadenas largas de aminoácidos.

15 Preferentemente, las células nodrizas son células recombinantes y contienen (un) ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s) que codifica(n) para dichos al menos dos factores.

Las expresiones "célula recombinante" o "célula nodriza recombinante" se refieren a la introducción en dichas células de (un) ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s) que codifica(n) para dichos al menos dos factores. Dicha introducción abarca una variedad de técnicas útiles para la introducción de ácidos nucleicos en células nodrizas incluida la electroporación, precipitación de fosfato de calcio, tratamiento-DEAE-dextrano, lipofección, microinyección e infección con vectores virales. Dichos métodos adecuados se conocen por el experto, y pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y otros (Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2da Edición., Cold Spring Harbor Laboratory (1989) prensa). El ácido nucleico a introducir puede ser, por ejemplo, ADN que comprende gen (es) que codifica(n) el (los) factor(es) susceptible(s) de interactuar con a) proteína(s) de la superficie celular de la línea celular que se produce, fragmento de ADN genómico, la cadena sentido de ARN o un vector de expresión recombinante que contienen un ADNc que codifica dicho(s) gen(es). El ácido nucleico heterólogo puede codificar el factor de longitud completa o alternativamente puede codificar un fragmento peptídico de este que sea suficiente para permitir la producción de la población celular de conformidad con la presente invención, cuando se introduce en células nodrizas. El ácido nucleico puede codificar un ligando natural (proteína co-estimuladora) de la proteína de superficie celular de la línea celular que se produce, o un fragmento de este, o una forma modificada del ligando o fragmento de este. La invención tiene por objeto incluir el uso de fragmentos, mutantes, o variantes (por ejemplo, formas modificadas) del factor que mantienen la capacidad de intensificar la producción de la línea celular. Una "variante" de un factor significa una proteína que comparte una homología significativa con el ligando natural y es capaz de efectuar una producción de una línea celular. Los términos biológicamente activo o forma biológicamente activa de una proteína incluyen formas de factores que son capaces de efectuar una producción de una línea celular. Un experto en la materia puede seleccionar dichas variantes del factor basado en su capacidad para aumentar la producción celular con la introducción de un ácido nucleico que codifica el factor en las células nodrizas. La capacidad de una variante específica del factor para aumentar la proliferación de células T puede ser fácilmente determinada, por ejemplo, comparando las células nodrizas recombinantes con células nodrizas no recombinantes por medio de cualquier ensayo o método conocido. Además, será apreciado por los expertos en la materia que los cambios en la secuencia primaria de aminoácidos del factor probablemente pueden tolerarse sin alterar significativamente la capacidad de la proteína para permitir la producción de la línea celular. Por consiguiente, las variantes del factor que tienen sustituciones de aminoácidos, supresiones y/o adiciones comparado con la secuencia de aminoácidos que se presenta de manera natural de un factor nativo comparable, aunque todavía conservan la actividad funcional de la forma natural del factor como se describe en la presente son también abarcados por la invención. Estas variantes pueden contener, por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos en las que los residuos de aminoácidos se reemplazan por residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, e incluyen las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); las cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); las cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), las cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leuquina, isoleuquina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), las cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleuquina) y las cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

El ácido nucleico está en una forma adecuada para la expresión del(de los) factor(es) en el que contiene todas las secuencias codificadoras y reguladoras que se requieren para la transcripción y traducción de un gen, que puede contener promotores, cebadores y señales de poliadenilación, y opcionalmente secuencias necesarias para transportar el factor a la superficie de las células nodrizas, incluyendo secuencias señal N-terminal. Las secuencias reguladoras pueden seleccionarse además para proporcionar una transcripción constitutiva o inducible. La expresión del factor en la superficie de la célula nodriza se puede confirmar por la tinción inmunofluorescente de las células. Por ejemplo, las células se pueden teñir con un anticuerpo monoclonal reactivo marcado fluorescentemente contra la molécula co-estimuladora o con un receptor soluble marcado fluorescentemente que se une al factor. El experto, que conoce muy bien los factores a ser expresados por las células nodrizas, también conoce los anticuerpos

monoclonales apropiados que reconocen los factores expresados por las células nodrizas. Alternativamente, las proteínas de ligandos solubles marcados las cuales se unen a los factores pueden usarse para detectar su expresión en la superficie de la célula nodriza. Las técnicas y dispositivos empleados para detectar las células teñidas por inmunofluorescencia se conocen bien por un experto; preferentemente se usa un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

Cuando un ácido nucleico que codifica un factor está unido operativamente a elementos regulatorios este típicamente es portado en un vector, incluyendo, por ejemplo, plásmidos y virus. Así, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un factor de la presente invención unido operativamente a elementos de control regulatorios, se refiere también en la presente como un "vector de expresión". Los vectores de expresión se seleccionan en relación al tipo de célula nodriza a transformar. Por ejemplo, cuando las células nodrizas son células nodrizas de insectos de drosophila de vectores constitutivos de drosophila disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas se incluyen las series pAc (Smith y otros, (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y las series pVL (Lucklow, V. A., y Summers, M. D., (1989) Virology 170:31-39).

Cualquier célula nodriza de insecto apropiada puede usarse en la presente invención, siempre que cumpla las condiciones mencionadas anteriormente. Pueden ser, por ejemplo, células nodrizas de insecto de Sf9 (entre otras depositadas en ATCC con el número CRL 1711 o en DSMZ con el número ACC 125, y comercializadas por BD Biosciences Pharmingen, Estados Unidos), Sf21 (entre otras depositadas en DSMZ con el número ACC 119, y también comercializadas por BD Biosciences Pharmingen, Estados Unidos) o la línea celular S2. Preferentemente, las células nodrizas de insecto son de la línea celular de Drosophila S2. La línea celular de Drosophila S2 es bien conocida por un experto en la materia, y ha sido descrita en el estado anterior de la materia. La línea celular de Drosophila S2 está disponible comercialmente (Invitrogen, Francia, etc...) y se depositó, particularmente, en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con el número ACC130, y es descrita en Schneider, J Embryol Exp Morphol, 27:1972, 353; también se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC con el número CRL 1963. Preferentemente, las células nodrizas de insecto son de la línea celular de Drosophila S2 depositada el 25 de marzo de 2005 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur, París) bajo el número I-3407.

Más preferentemente, la población celular P es una población celular de mamífero. Ventajosamente, las células nodrizas, que pueden usarse cuando dicha población celular P es una población de células de mamífero, pueden ser células nodrizas de insectos o células nodrizas de plantas.

Más preferentemente, cuando la población celular de mamífero P es una población de células T, las células nodrizas son de insecto, T, es inferior a T₂, T₂ es al menos de aproximadamente 35°C.

La expresión "al menos aproximadamente 35°C" significa que la temperatura puede variar en 0,1°C por debajo de 35°C (de 34,9°C a 35°C). El experto es consciente de todos modos de dichas variaciones mínimas de temperatura.

Una gran ventaja que proporciona el uso de células nodrizas de insecto cuando se produce una población celular de mamífero P', es que (1) las células nodrizas y las células de mamífero no proliferan a la misma temperatura (T₁ es inferior a T₂, T₂ es al menos de aproximadamente 35°C), y (2) los virus de mamíferos no proliferan en células nodrizas de insecto, evitando así la posible contaminación viral de la población celular de mamífero P/P' a partir de las células nodrizas.

Más preferentemente, el medio de cultivo Mp es un medio de cultivo libre de suero. Se prefieren medios exentos de contaminantes biológicos, tales como los medio de cultivo libres de suero comercialmente disponibles (XVIVO-15 de BioWhittaker, Walkersville, MD; medio AIM V de Invitrogen, etc...).

Más preferentemente, el medio de cultivo Mf es un medio de cultivo libre de suero. Se prefieren medios exentos de contaminantes biológicos, tales como, por ejemplo, los medios de cultivo libres de suero bien conocidos y comercialmente disponibles (medio de Schneider sin suero comercializado por BioWhittaker, Walkersville, MD GIBCO® medios de cultivo de células de insectos libres de suero tales como SFM comercializado por Invitrogen, o medios libres de suero Insectagro® comercializado por Krackeler Scientific Inc., Estados Unidos, etc...), para evitar posteriores contaminaciones de la población celular P.

La presente invención abarca poblaciones de células P de cualquier tipo, como, por ejemplo, células del sistema inmune, células de la piel, células hepáticas, células de médula ósea, células madre, células de los islotes, fibroblastos, etc... Entre las células del sistema inmune están las "células T", que son reconocidas en la materia y se pretende incluir timocitos, los linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, los linfocitos T en reposo, o los linfocitos T activados. La célula T puede ser una célula T auxiliar (Th), por ejemplo, una célula T auxiliar 1 (Th1) o una célula T auxiliar 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T CD4+, célula T CD8+, célula T CD4+CD8+, T CD4-CD8-, o cualquier otro subconjunto de células T tales como, por ejemplo, una célula CD4+CD25+ reguladora o una célula T (Tr1) reguladora.

El experto conoce muy bien los métodos para aislar células T y subtipos específicos. Las células T pueden obtenerse de diversas fuentes, incluyendo leucocitos de sangre periférica, médula ósea, nódulos de tejidos linfáticos, tejido del bazo, y tumores.

5 Preferentemente, los leucocitos de sangre periférica se obtienen de un individuo por leucoféresis. Para aislar células T de leucocitos de sangre periférica, puede ser necesario lisar los glóbulos rojos y separar los leucocitos de sangre periférica de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación, por ejemplo, un gradiente de PERCOLL™.

10 Los linfocitos T citotóxicos (CTL), pueden ser usados en un tratamiento inmunoterapéutico para el cáncer y las enfermedades infecciosas. Análogamente, las células dendríticas han demostrado que ofrecen un gran potencial en el tratamiento del cáncer. La terapia con células madre está emergiendo como una nueva forma potencialmente revolucionaria para tratar las enfermedades y lesiones con amplio rango de beneficios médicos. Su objetivo es reparar partes del cuerpo dañadas o afectadas con nuevas células sanas proporcionadas por los trasplantes de células madre. Los trasplantes de médula ósea usados para tratar pacientes con leucemia son una forma actual de
15 terapia de células madre.

El método instantáneo de producción *in vitro* permite obtener dichas células en una cantidad suficiente para la investigación o aplicaciones de terapia celular.

20 Ventajosamente, la población celular de mamífero P se selecciona del grupo que comprende una población de células T, una población de células dendríticas, una población de células madre indiferenciadas, una población de células madre prediferenciadas, una población de células madre diferenciadas, una población de células de la piel y una población de células de islote pancreático. En una modalidad preferente, la población celular de mamíferos P es una población de células T.

25 Preferentemente, la población de linfocitos T es una población de células T CD4+, CD8+, CD4+CD8+, o CD4-CD8-. Más preferentemente, la población de linfocitos reguladores T CD4+ es TH1, TH2, CD4+CD25+, o una población celular Tr1 reguladora. En otra modalidad preferente la población de células T CD8+ es una población TIL (linfocitos infiltrantes de tumores).

30 Más preferentemente, cuando la población celular de mamífero P es una población de células T, las células nodrizas no tienen ninguna molécula intrínseca de clase I y/o II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Esto significa que estas células no expresan naturalmente moléculas MHC, a menos que hayan sido genéticamente transformadas. La ausencia de estas moléculas intrínsecas MHC clase I y/o II en la superficie de
35 las células nodrizas es crucial para evitar una respuesta alogénica entre las células nodrizas y la población celular de mamífero P. Como resultado, las células nodrizas de la presente invención pueden usarse para expandir una población celular P a partir de cualquier donante en un corto período de tiempo.

40 La expansión *in vitro* de una población de células T de acuerdo con la presente invención, ofrece las siguientes ventajas:

- El sistema de expansión de células nodrizas es capaz de mantener un crecimiento exponencial de la población de células T por lo menos dos o tres meses *in vitro*.
- Las células nodrizas carecen de moléculas MHC de clase I y II para evitar respuesta alogénica,
- 45 - Las células nodrizas están libres de micoplasmas,
- Las células nodrizas son capaces de crecer bien usando medio libre de suero.
- Las células nodrizas no requieren ser irradiadas,
- Las células nodrizas no permiten la expansión de virus eucariotas, y
- La población de células T expandida está muy bien caracterizada con fines de inyección.
- 50 -

Preferentemente, las células nodrizas se retiran del medio de cultivo Mf en la etapa (b).

Más preferentemente, las células nodrizas expresan al menos dos factores, preferentemente de 3 a 10 factores. Como se describió anteriormente, la selección de los al menos dos factores depende de las proteínas de la
55 superficie celular de la población celular P con la que los factores tienen que interactuar. El experto conoce qué factores tienen que ser expresados por las células nodrizas para la producción de una población celular P' a partir de una población celular P.

60 Por ejemplo, cuando el presente método de producción *in vitro* se usa para expandir una población de células T, se requiere la estimulación del complejo TCR/CD3 (TCR para el receptor de células T y CD para el antígeno de diferenciación celular) para la emisión de una primera señal de activación en una célula T (ver US 2003/0147869 y US 6,352,694). Un anticuerpo monoclonal anti-CD3 puede usarse para activar una población de células T a través del complejo TCR/CD3, ventajosamente un anticuerpo anti-CD3 modificado, en donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en la sustitución del dominio intracitoplasmático con un dominio transmembrana, de manera que

dicho anticuerpo anti-CD3 modificado se ancla a la membrana celular de las células nodrizas e interactúa con la proteína del complejo TCR/CD3 de las células T.

Además, un número de proteínas sobre la superficie de células T, indistintamente denominada "moléculas co-estimuladoras" o "co-estimuladores", se ha implicado en la regulación de la transición de los linfocitos T en reposo a la transformación blastoide y la proliferación y diferenciación posterior. Así, además de la señal primaria de activación emitida 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 ruta de transducción de señales que es distinta de las inducidas por el complejo TCR.

El factor que interactúa con la proteína CD28 presente en la superficie de células T y que se expresa por las células nodrizas, puede ser un anticuerpo monoclonal anti-CD28 o un fragmento del mismo capaz de enlazarse a la molécula CD28; en tal caso, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD28 puede contemplarse agregando un dominio transmembrana para que pueda anclarse a la superficie celular de las células nodrizas. Preferentemente, el ligando natural para CD28 se emplea en lugar del anticuerpo monoclonal anti-CD28, es decir, por ejemplo, un miembro de la familia de las proteínas B7, tales como las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86).

Otro factor que interactúa con una proteína de superficie celular de las células T y que permite así la expansión de dichas células T es la proteína interleuquina-2 (IL-2), secretada por las células nodrizas.

Así, más preferentemente, cuando la población de células T prolifera, las células nodrizas son células nodrizas recombinantes que expresan factores que interactúan con las siguientes proteínas de la superficie celular de la población de células T:

- el complejo de proteínas TCR/CD3,
- la proteína CD28, y
- opcionalmente, el receptor de la interleuquina-2 (IL-2).

Ventajosamente, los factores comprenden o consisten en:

- el anticuerpo anti-CD3 modificado, en donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en la sustitución del dominio intracitoplasmático anti-CD3 de la cadena pesada anti-CD3 con un dominio transmembrana, dicho anticuerpo anti-CD3 modificado está anclado a la membrana celular de las células nodrizas y es susceptible de interactuar con la proteína del complejo TCR/CD3 de las células T, o una variante de esta,
- las proteínas CD80 y CD86, preferentemente la proteína CD80, anclada a la membrana celular de las células nodrizas, que es susceptible de interactuar con la proteína CD28 de las células T, o una variante de esta, y
- opcionalmente, la IL-2 secretada por las células nodrizas, que es susceptible de interactuar con el receptor de IL-2 de las células T, o una variante de esta.

Ventajosamente, el dominio transmembrana que reemplaza el dominio intracitoplasmático de la cadena pesada de anticuerpos anti-CD3 es el dominio transmembrana del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Entre las poblaciones de células T que son bien conocidas por el experto, se están acumulando pruebas novedosas de una subpoblación de células T funcionalmente distinta, denominadas células reguladoras Tr1 o células Tr1 que ejercen importantes funciones reguladoras en diversas enfermedades inmuno-inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn (H. Groux y otros, Nature 1997. 389. 737-742), inflamación de la piel (Foussat y otros 2003, J. Immunol. 5026-171, 50/18), aterosclerosis (Mallat y otros, Circulation 2003, 108, 1232-1237) o esclerosis múltiple (Barrat y otros 2002, 195. 603-616). La publicación internacional de patente WO 2005/000344 (6 de enero de 2005) describe un método para la identificación de linfocitos Tr1 en una muestra biológica, basado en la determinación de la presencia simultánea del grupo molecular CD4, CD18 y/o CD11a, CD49b y, cuando proceda, por la demostración de la sobre-expresión de genes que codifican las proteínas CD4, PSGL-1, PECAM-1 y alfaV/beta3. Hoy es posible identificar tales células Tr1 gracias a los marcadores mencionados anteriormente.

Por ejemplo, las células Tr1 se pueden detectar y/o purificar mediante ELISA, citometría de flujo, cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos dirigidos contra dichos marcadores, por ejemplo con:

- APC-conjugado anti-CD4 (RPA-T4)-Becton Dickinson
- PC5-conjugado anti-CD3 (UCHT -1) - Caltag
- PE-conjugado anti-CD18 (6, 7) - Becton Dickinson
- FITC-conjugado anti-CD49b (AK- 7)-Becton Dickinson

El enriquecimiento de células de linfocitos CD3+CD4+CD18brillanteCD49b, puede realizarse con perlas magnéticas en dos etapas:

- reducción de la población total con perlas magnéticas anti-Ig humana de células unidas con anti-CD8, anti-CD 14, anti-CD56 y anti-CD 19 humanas.
- Selección de células CD49b+ unidas a un anticuerpo humano anti-CD49b con perlas magnéticas anti-Ig humana.

5 -
Es posible la purificación posterior con citometría de flujo o perlas con anticuerpos CD3, CD18 y CD49b.

Los ensayos ELISA se pueden usar también para medir la expresión IL-4, IL-10 e IFN-alfa.

10 Así, en una modalidad preferente, la población de células T es una población celular Tr1.

Los inventores han descubierto que es necesario activar la proteína CD2 y los receptores IL-2 e IL-4 presentes en la superficie de las células Tr1, además de la estimulación del complejo CD3/TCR y de la proteína CD28 requeridos para la expansión de la población de linfocitos T, para expandir la población de linfocitos reguladores Tr1.

15 Preferentemente, los factores interactúan con las proteínas de la superficie celular de la población de células como se describió anteriormente (complejo CD3/TCR, proteína CD28, y opcionalmente el receptor IL-2), y con las siguientes proteínas adicionales de superficie celular de la población celular Tr1 a partir de la cual la línea celular Tr1 prolifera:

- 20 - la proteína CD2,
- el receptor de interleuquina 2 (IL-2), y
- el receptor de interleuquina 4 (IL-4).

25 Más preferentemente, los factores comprenden y/o consisten en aquellos descritos anteriormente (anticuerpo anti-CD3 modificado, y la proteína CD86 o CD80, preferentemente la proteína CD80) y los siguientes factores adicionales :

- 30 - la proteína CD58 anclada a la membrana celular de células nodrizas, que es susceptible de interactuar con la proteína CD2 de las células Tr1, o una variante de esta,
- la IL-2 secretada por las células nodrizas, que es susceptible de interactuar con el receptor IL-2 de las células TR1, o una variante de esta, y
- 35 - una interleuquina seleccionada del grupo que comprende la IL-4 e interleuquina 13 (IL-13), preferentemente IL-4, dicha interleuquina es secretada por las células nodrizas y es susceptible de interactuar con un receptor de IL-4 de las células Tr1, o una variante de esta.

40 Análogamente, una población de linfocitos T CD4+ se puede ser expandir por la interacción de factores expresados por las células nodrizas con el complejo TCR/CD3 usual, la proteína CD28 y el receptor IL-2 presentes en la superficie de linfocitos T CD4+. Tales factores se han descrito previamente (anticuerpo anti-CD3, la proteína CD86 o CD80 y IL-2).

45 Las células reguladoras CD4+CD25+ pueden proliferar mediante la interacción habitual con el complejo CD3/TCR, la proteína CD28 y el receptor IL-2, todas estas moléculas están presentes en la superficie de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+. Pueden usarse los factores de anticuerpos anti-CD3, y la proteína CD86 o CD80 e IL-2 (ver más abajo).

50 Una población de linfocitos CD4+ Th1 puede proliferar por la interacción de factores expresados por las células nodrizas con el complejo TCR/CD3 usual, la proteína CD28 y el receptor IL-2, más el receptor de la interleuquina 12 (IL-12) o el receptor de interferón (IFN) y el antígeno-1 de función asociada a linfocitos (LFA-1), todas estas moléculas se presentan en la superficie de los linfocitos CD4+ Th1. Se pueden usar los factores de anticuerpo anti-CD3, CD80 o proteína CD86 e IL-2 (ver más abajo), además de los factores que interactúan con el receptor de IL-12, o de IFN-gamma, que interactúan con un receptor IFN y la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), la cual interactúa con LFA-1.

55 Una población linfocitos T CD8+ puede proliferar por la interacción de factores expresados por las células nodrizas con el complejo TCR/CD3 usual, la proteína CD28 y el receptor IL-2, más CD40L (ligando CD40), todas estas moléculas se presentan en la superficie de linfocitos T CD8+. Se pueden usar los factores de anticuerpo anti-CD3, la proteína CD86 o CD80 e IL-2 (ver más abajo), además de los factores CD40, que interactúan con CD40L, o el anti-CD40L, que interactúa con CD40L.

60 Preferentemente, la población de linfocitos T es una población de células T CD4+, CD8+, CD4+CD8+, o CD4-CD8-. Más preferentemente, la población de linfocitos reguladores T CD4+ es TH1, TH2, CD4+CD25+, o una población celular Tr1 reguladora. En otra modalidad preferida la población de células T CD8+ es una población TIL (linfocitos infiltrantes de tumores).

65 En otra modalidad ventajosa, cuando la población celular T es una TIL (linfocitos infiltrantes de tumores), los factores

interactúan con las proteínas de la superficie celular de la población celular T como se describió anteriormente (complejo TCR/CD3, proteínas CD28, y opcionalmente el receptor IL-2), y con las siguientes proteínas de superficie celular adicionales de la población celular CD8:

- 5 - la proteína CD40.

Preferentemente, los factores comprenden los descritos anteriormente (anticuerpo anti-CD3 modificado, y la proteína CD86 o CD80, preferentemente proteína CD80) y los factores siguientes:

- 10 - la proteína CD40L o un anticuerpo anti-CD40 que interactúa con la molécula CD40 de células T CD8, o una variante de esta

En otra modalidad ventajosa, cuando la población de células T es una población TH1, los factores interactúan con las proteínas de la superficie celular de la población de células T como se describió anteriormente (complejo CD3/TCR, proteína CD28, y opcionalmente el receptor IL-2), y con las siguientes proteínas de superficie celular adicionales de la población celular TH1:

- 15 - la proteína receptora de IL-12,
20 - la proteína receptora de Interferón gamma
 - la proteína LFA-1.

Preferentemente, los factores comprenden los descritos anteriormente (anticuerpo anti-CD3 modificado, y la proteína CD86 o CD80, preferentemente proteína CD80) y los factores siguientes:

- 25 - La IL-12 secretada por las células nodrizas que interactúan con el receptor de IL-12 de células TH1, o una variante de esta,
 - El interferón gamma secretado por las células nodrizas que interactúan con el receptor de interferón gamma de las células TH1, o una variante de este,
30 - La molécula ICAM-1 anclada a la membrana celular de las células nodrizas que interactúan con la molécula LFA-1 de las células TH1, o una variante de esta.

En otra modalidad de la presente invención, una población de células madre puede proliferar por interacción del factor de células madre (SCF) y/o el ligando tirosina quinasa de hígado fetal (Flt3L) que se expresan por las células nodrizas, con el kit C y/o el receptor Flt3 respectivamente.

35 En otra modalidad de la presente invención, una población de fibroblastos puede proliferar por interacción del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que se expresa por las células nodrizas, con el receptor EGF.

40 En otra modalidad de la presente invención, una población de células dendríticas puede proliferar por interacción del factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), la IL-4 o IL-13 y opcionalmente el factor de necrosis tumoral (TNF), que se expresan por las células nodrizas, con las correspondientes moléculas interactivas presentes en la superficie de las células dendríticas.

45 En una modalidad específica, la población de células T es una población de células T antígeno específico.

El término "antígeno" en la expresión "población de células T antígeno específico" se refiere a un péptido inmunogénico. Los péptidos inmunogénicos son péptidos no patogénicos o proteínas capaces de unirse a moléculas MHCII de un individuo y que se reconocen por receptores de células T de dicho individuo. Por ejemplo, el antígeno es un antígeno anti-alergia alimentaria (ovoalbúmina, etc...) o un antígeno no patógeno bacteriano.

50 Para producir una población de linfocitos T antígeno específicos, los linfocitos T se ponen en contacto con un antígeno en una forma adecuada para disparar una señal primaria de activación de linfocitos T, es decir el antígeno es presentado a linfocitos T de manera que se dispara una señal en la célula T mediante el complejo TCR/CD3. Por ejemplo, el antígeno se puede presentar a la célula T en una forma soluble (antígeno acoplado a una molécula soluble MHC), o por una célula presentadora de antígeno en conducción con una molécula de MHC. Una célula presentadora de antígeno, tal como una célula B, macrófago, monocito, células dendríticas, célula de Langerhan u otra célula que puede presentar un antígeno de célula T, se puede incubar con la célula T en presencia del antígeno (por ejemplo, un antígeno soluble) de manera que la célula presentadora de antígeno presente el antígeno a la célula T. Alternativamente, una célula que expresa un antígeno de interés se puede incubar con la célula T. Por ejemplo, una célula tumoral que expresa antígenos tumor-asociados se puede incubar con una célula T juntas para inducir la respuesta tumor-específica. Análogamente, una célula infectada con un patógeno, por ejemplo un virus, que presenta antígenos del patógeno se puede incubar con una célula T. Tras la activación de una población de células T antígeno específica, la población de linfocitos T antígeno específica puede proliferar conforme al método de la invención. Lo mismo se aplica para cualquier subtipo de la población de linfocitos T, en particular para una población de linfocitos Tr1.

Así, en otra modalidad específica adicional, la población de células T antígeno específica es una población de células T Tr1 antígeno específica.

- 5 Los factores que se expresan por las células nodrizas pueden ser de cualquier origen. Preferentemente, son del mismo origen que las poblaciones celulares P de mamíferos a proliferar. Aún más ventajoso, las células de dicha población celular P de mamífero son células humanas. Más preferentemente, los dos factores como mínimo son de origen humano.
- 10 En una modalidad más ventajosa, la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 modificado está codificada por el ácido nucleico heterólogo de sec. con núm. de ident.: , o cualquier ácido nucleico que tenga al menos el 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.: 1, y la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 modificado está codificada por el ácido nucleico heterólogo de sec. con núm. de ident.: 2, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.: 2.
- 15 En una modalidad más ventajosa, la proteína CD80 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:3, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:3.
- 20 En otra modalidad, la proteína CD86 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:4, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:4.
- Con mayor preferencia, la IL-2 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:5, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:5.
- 25 Aún con mayor preferencia, la proteína CD58 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:6, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:6.
- 30 Con la máxima preferencia, la IL-4 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:7, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:7.
- En otra modalidad, la IL-13 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:8, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:8.
- 35 La expresión "molécula de ácido nucleico que tenga al menos 70 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: X" se refiere a cualquier secuencia que tenga al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % de identidad con dicha secuencia sec. con núm. de ident.: X.
- 40 Por porcentaje de identidad entre dos ácidos nucleicos (o secuencias de ácido nucleico) en la presente invención, se entiende un porcentaje de nucleótidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenidos tras la mejor alineación; este porcentaje es puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias están distribuidas aleatoriamente y a lo largo de sus longitudes. El mejor alineamiento o alineamiento óptimo es el alineamiento correspondiente al más alto porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar, que se calcula como en la presente en lo adelante. Las comparaciones entre dos secuencias de ácidos nucleicos se realizan normalmente
- 45 comparando estas secuencias después de su alineamiento óptimo, dicha comparación se ejecuta para un segmento o para una "ventana de comparación" para determinar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo manualmente o por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) (Ad. App. Math. 2:482), por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) (J. Mol. Biol. 48: 443), por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 2444), por medio de programas informáticos usando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).
- 50 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico se determina comparando las dos secuencias alineadas de forma óptima con una "ventana de comparación" en la que las regiones de las secuencias de ácido nucleico a comparar pueden incluir adiciones o supresiones relacionadas con las secuencias de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando las diversas posiciones de nucleótidos las cuales son idénticas entre las dos secuencias, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la "ventana de comparación" y multiplicando el resultado obtenido por
- 60 100, para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.
- En general, después de varias horas de cultivo de las poblaciones celulares P a proliferar tal como 12 horas, preferentemente después de 24 horas de cultivo, más preferentemente 48 horas, no existe ninguna célula nodriza viable en el medio de cultivo Mp. Ventajosamente, las células expandidas de la población celular P' se recuperan
- 65 cuando todas las células nodrizas mueren, lo que permite obtener primeramente una población celular expandida, y

en segundo lugar recuperar rápida y fácilmente las células expandidas de la población P' al eliminar los fragmentos de membrana de las células, por ejemplo, mediante métodos de lavado y/o de centrifugación en gradiente de densidad como se describe en la presente.

- 5 Así, en una modalidad preferente, las células T se recuperan en la etapa d) después de tener la población de células T en cultivo en la etapa c) durante al menos 12 horas, ventajosamente 24 horas.

La presente invención también abarca la modalidad particular en donde se usa un único medio de cultivo, y el método es como sigue:

10 a) cultivar a una temperatura T_1 en medio de cultivo las células nodrizas de insectos capaces de expresar dichos al menos dos factores, T_1 permitiendo la proliferación de dichas células nodrizas,

15 b) poner en contacto las células nodrizas obtenidas en la etapa a) contenidas en el medio de cultivo con la población de células P,

c) cultivar las mezclas obtenidas en la etapa b) que contienen al menos los dos factores que se expresan por las células nodrizas en el medio cultivo, donde dicha etapa c) de cultivo se efectúa a una temperatura T_2 , dicha temperatura T_2 se selecciona de manera que:

- 20 - la población celular P prolifera, y
- las células nodrizas no proliferen,

y en donde se produce la población celular P',

25 d) recuperar la población celular P' que se produce de ese modo.

(Las modalidades preferentes anteriores descritas aplican a ésta).

30 La presente invención se describe además en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración, y no se pretende limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los diversos escenarios son importantes en muchas situaciones prácticas, y están destinados a ser meramente ejemplificaciones para aquellos expertos en la materia. Por tanto, la invención se debe interpretar que abarca cualquier variación que resulte evidente como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente.

35 LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Análisis de la expresión de proteínas humanas en la línea celular S2.

Análisis de la citometría de flujo de 2 colores de las cadenas pesada y ligera OKT3 y expresión de CD80 y CD58 en células parentales (S2) o de fábrica celular (CF).

Figura 2: Dibujo de CF manipulado que interactúa con una célula Tr1 CD4+

40 Las células S2 se transfectaron con el mAb anti-CD3 unido a membrana para enganchar al complejo TCR/CD3, CD58 y CD80 y añadir algunas señales co-estimuladoras por interacción con las moléculas CD28 y CD2 respectivamente, e IL-2 e IL-4 para inducir el crecimiento celular.

Figura 3: Proliferación de células T inducida por la línea celular CF.

45 La proliferación de PBL policlonales, líneas celulares T Tr1 CD4+ (L1 y L2) o clones Tr1 (C1 y C2) estimulada con la fábrica celular se midió por incorporación de 3H timidina entre 3 y 4 días de cultivo. Las células T se estimularon con células CF como se indicó, en ausencia de las citoquinas exógenas. En 72 h, las células se pulsaron con 3H timidina e incubaron durante otras 18 h antes de la recogida. Se muestran los recuentos de los valores por minuto como medida s.e.m de los cultivos triplicados.

Figura 4: Crecimiento a largo plazo de células policlonales primarias humanas Tr1 estimuladas con la fábrica celular.

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

Figura 5: Pureza de las células T después del co-cultivo con la línea celular CF.

55 La pureza de las células T y después de la estimulación con la línea celular CF se valoró por tinción para la expresión de CD3, CD4 durante los primeros siete días de cultivo. No se usó la vía de tamaño celular/restos en el

experimento para representar todas las células en cultivo. Las células viables se indican por la vía de yoduro de propidio para excluir las células muertas. Los resultados son representativos de > 10 experimentos diferentes, cada uno con un donante diferente.

Figura 6: CF Destrucción de la línea celular CF después del co-cultivo con células T

5 La destrucción de las células estimuladoras CF se valoró usando tinción para expresión de CD4 y OKT3H durante los primeros siete días de cultivo. No se usó en el experimento la vía de tamaño de célula/restos para representar todas las células en cultivo. Las células viables se indican por la vía del yoduro de propidio para excluir las células muertas. Los resultados son representativos de > 10 experimentos diferentes, cada uno con un donante diferente.

Figura 7: Representación esquemática del protocolo experimental usado.

10 **Figura 8: Aislamiento de clones Tr1 OVA específicos.**

Las PBL teñidas con CFSE se estimularon con OVA, y se las teñidas con CD4 CD49b y CD18. Las células CD4⁺CD49b⁺CD18^{brillante} se cerraron y las células CFSE se clasificaron. Las células clasificadas se clonaron para generar el clon 1 y 2, el bulto de población se estimuló con OVA y se tiñó con IL-10 e IFN- γ revelando un fenotipo Tr1.

15 **Figura 9: Análisis de la proliferación a largo plazo de los clones Tr1**

Dos clones se estimularon con la fábrica celular irradiada. El número de células total se representa en un trazo semi-log de número de células vs. días en cultivo.

Figura 10: Perfil de citoquinas de los clones T 1 y 2 OVA específicos después de la expansión en la fábrica celular durante 70 días.

20 Las citoquina se midieron en las sobrenadante de los clones estimulados con OVA y monocitos autólogos irradiados. Se examinó también la supresión antígeno específica por un ensayo transwell. Los PBL autólogos se estimularon con el mAb anti-CD3 en el pocillo inferior, sin células, se añadieron células T CD4 control y dos clones en la cesta superior y se estimularon con anti-CD3 y monocitos autólogo irradiados, para células CD4 o OVA y monocitos autólogos irradiados para dos clones Tr1. Todo el protocolo es representativo de diez experimentos, cada uno de diferentes donantes.

Figura 11: Comparación de la eficiencia de las etapas de eliminación de las células T usando el método Nicodenz®, con relación al de Ficoll®.

Los resultados son como sigue:

	Células TR1 antes de las etapas de lavado	Después de Ficoll®	Después de Nicodenz®
% de recuperación de TR1	100	75	90
% de eliminación de las células nodrizas (S2)		90	95

Ejemplos

30 **1. Protocolo experimental**

Anticuerpos marcados

Para la clasificación de las perlas:

Perlas usadas:

- 35
- « MagCelect Ferrofluid, Estreptavidina » (I&D)
 - « Perlas de oveja anti-Rat » (Dako)

Para CD80: CD80 biotinilada de ratón anti-humano (B7-1), clon L307.4 (BD Biosciences Pharmingen)
 Para OKT3: cadena ligera Kappa de Ig de rata anti-ratón, clon 187. 1 (BD Biosciences Pharmingen)

Para clasificación FACS y marcadores de control habituales

40 Para CD80: CD80-PE de ratón anti-humano (ficoeritrina) o FITC (Isotiocianato de fluoresceína), clon L307.4 (BD Biosciences Pharmingen)

ES 2 389 502 T3

Para CD58: CD58-PE de ratón anti-humano o PECy5 (ficoeritrina- cianina 5) (LFA-3) Clon IC3) (*BD Biosciences Pharmingen*)

Para OKT3:

- 5
- *Cadena pesada*: IgG2a biotinilada anti-ratón, clon R19-15 + Estreptavidina-FITC o Estreptavidina-PE o Estreptavidina-PECy5 (*BD Biosciences Pharmingen*)
 - *Cadena ligera*: cadena ligera Kappa purificada de Ig de rata antiratón, clon 187.1 (*BD Biosciences Pharmingen*) + conejo- anti-rata-FITC (*Dako*)

Cebadores de amplificación

OKT3-L FWD :

10 5'- ATGCGGATCC ATGGATTTTCAAGTGCAG - 3' (sec. con núm. de ident.: 9)

OKT3-L REV :

5'- ATGCGAATTCCTAACACTCATTCTGTTG - 3' (sec. con núm. de ident.: 10)

cebador OKT3H1 cadena pesada variable (571pb) :

HSPAT1 FWD:

15 5'- ATG CCC GCG GGG TAC CCA CTG AAA ACT CTG ACT CAA C - 3' (sec. con núm. de ident.:11)

OKT3 H2/3 REV:

5'- ACT GGA CAG GGA TCC AGA GTT C - 3' (sec. con núm. de ident.: 12)

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

OKT3 H3/5 FWD:

20 5'- GAA CTC TGG ATC CCT GTC CAG TG - 3' (sec. con núm. de ident.: 13)

OKT3 H3/3 REV:

5'- ATG CGA ATT CTT TAC CCG GAG TCC GGG AGA AGC TC - 3' (sec. con núm. de ident.: 14)

cebador del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas pdgf, beta (151pb)

PDGFR 5 FWD:

25 5'- ATG CGA ATT CGC TGT GGG CCA GGA CAC GCA G - 3' (sec. con núm. de ident.: 15)

PDGFR 3 REV:

5'- ATG CGG GCC CAA GCT TCT AAC GTG GCT TCT TCT GCC AAA G-3' (sec. con núm. de ident.: 16)

IL-2 FWD:

5'- ATGCGGATCCATGTACAGGATGCAACTCCT - 3' (sec. con núm. de ident.: 17)

30 IL-2 REV:

5'- ATGCGAATTCTCAAGTCAGTGTGAGATGA - 3' (sec. con núm. de ident.: 18)

LFA3 FWD:

5'- ATGCTGGATCCATGGTTGCTGGGAGCGACGC - 3' (sec. con núm. de ident.: 19)

LFA3 REV:

35 5'- ATGCTAAGCTTTCAATTGGAGTTGGTTCTGT - 3' (sec. con núm. de ident.: 20)

IL-4 FWD:

5'- ATGCGGATCCATGGGTCTCACCTCCCAACT - 3' (sec. con núm. de ident.: 21)

IL-4 REV:

5'- ATGCAAGCTTTTCAGCTCGAACACTTTGAAT - 3' (sec. con núm. de ident.: 22)

Clonación y construcción de la fábrica celular Células humanas CD80, IL-2, IL-4 y CD58 de linfocitos T de sangre periférica (PBL) obtenidos de un donante sano se clonaron en el vector pAC (Invitrogen) usando un promotor de actina de insecto (Chung, Keller, Mol Cell Biol. 1990 dic; 10 (12): 80-6172; Chung y Mol Cell Biol., Keller 1990 enero; 10 (1): 206-16) y transfectado por electroporación (electroporador (Biorad, Estados Unidos) en las células S2 de la de la línea celular S2 depositada el 25 de marzo de 2005 en CNCM bajo el numero I-3407; las células CF', es decir, las células que expresan hCD80, hCD58 y anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAb) se aislaron mediante clasificador activado por fluorescencia FACS usando los anticuerpos descritos anteriormente. Análogamente, las cadenas pesada y ligera de OKT3 (Kung y otros Science. 1979 oct; 19: 206 (4416): 347) se clonaron a partir de las células de hibridoma OKT3 (ATCC CRL 8001, Manassas, Virginia, Estados Unidos) en el vector pAC y transfectadas en las células S2 antes de FACS. Para obtener el mAb anti-CD3 unido a membrana se remueve el extremo 3' terminal de la cadena pesada y se reemplaza por la parte transmembrana del gen del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). No se usó marcador de selección y las células establemente transfectadas se seleccionaron por tinción de FACS. Las células seleccionadas se clonaron para cada serie de transfección y selección, se seleccionó el clon más eficiente para la estimulación de las células Tr1.

Preparación de linfocitos CD4⁺ y cultivo celular S2. Los linfocitos de sangre periférica fresca se obtuvieron mediante centrifugación Ficoll hypaque, y las células T CD4⁺ se purificaron mediante selección negativa usando anticuerpos anti-CD8 (Becton Dickinson). Todos los cultivo se mantuvieron in vivo sin adición de suero (BioWhittaker, Walkersville, MD). Se adicionó IL-2 humana (Chiron Therapeutics, Emeryville, CA) a 20 UI/ml cuando se indica, se usó hIL-4 en 1 µg/ml (para comparar la ventaja biológica obtenida cuando las células nodrizas expresan las interleuquinas con los resultados obtenidos cuando se adicionan interleuquinas recombinantes en el medio de cultivo). Las células S2 se mantuvieron en medio Schneider sin suero (BioWhittaker, Walkersville, MD).

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

25 2. Resultados

Construcción de aAPC. Para probar la hipótesis de que las células Tr1 tienen distintas necesidades de co-estimulación para el crecimiento a largo plazo, los inventores diseñaron un sistema basado en células que puede ser manipulado genéticamente para expresar diferentes moléculas co-estimuladoras y citoquinas además de los estímulos clásicos CD3/CD28. Ellos seleccionan las células S2 porque no expresan las proteínas HLA humanas que podrían promover respuestas alogénicas, y no podrían estar contaminadas por virus humanos (Fig. 1). Además, la introducción final de las células nodrizas irradiadas en pruebas clínicas puede evitarse porque estas células que crecen a 27°C mueren fácilmente a 37°C y se propagan en medio libre de suero. Los inventores transfectaron y luego clonaron células S2 que expresan CD80 humana, CD58 humana y las dos cadenas del AcM anti-hCD3 para permitir la estimulación de las células Tr1 humanas (CF') (Fig. 1). Análogamente, ellos generaron la línea CF (Fig. 1, 2) por transfección de células CF' con el ADNc de IL-4 e IL-2 humanas. Los cultivos se iniciaron agregando células CF a células T humanas frescas CD4⁺ preparadas por selección negativa (ver el Protocolo Experimental).

Eficiencia de la línea celular CF activa células T policlonales humanas CD4⁺ y células Tr1. La fábrica celular se ensayó para su capacidad de estimular la activación inicial y la proliferación de células T primarias CD4⁺ así como las líneas celulares Tr1 o clones celulares de Tr1. Las distintas células T purificadas se estimularon con la fábrica celular en una proporción 1/1. Los inventores encontraron que la tasa inicial de crecimiento de las células T estimuladas con la fábrica celular fue equivalente, a juzgar por la incorporación de 3H timidina (Fig. 3) con un ligero mejoramiento de la respuesta proliferativa de las células Tr1 sobre las células T CD4⁺r. Los inventores confirmaron esta observación por el marcaje de células T frescas con el succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) y rastreo de la división celular durante los primeros cinco días de cultivo (datos no mostrados). Ellos también encontraron que el sistema basado en las células fue más eficiente que las perlas de CD3/28 por inducción de la proliferación y la división celular de las células T CD4⁺ (datos no mostrados). No se observó proliferación cuando la fábrica celular, o las células T CD4⁺ se incubaron por separado (Fig. 3 y datos no mostrados). Así, los requerimientos para rondas iniciales de proliferación de las células T CD4⁺ fueron aún más satisfactorios con la fábrica celular en comparación a la estimulación CD3/CD28 proporcionada en el contexto de las perlas de poliestireno.

Línea celular CF permite expansión a largo plazo de las células humanas Tr1. Seguidamente, los inventores determinaron si la fábrica celular era suficiente para mantener la propagación a largo plazo de las células Tr1 (Fig. 4). Las células Tr1 se estimularon con CF que segregan hIL-2 y IL-4, con CF' que no segregan citoquina solo con adición de citoquinas exógenas y, perlas CD3/28 con citoquinas exógenas. Las células estimuladas con perlas CD3/28 no proliferan después de la segunda estimulación, de acuerdo con estudios anteriores. Análogamente, las células Tr1 estimuladas con CF' en IL-2 e IL-4 añadidas exógenamente entraron en una fase de meseta de la curvas de crecimiento a las dos semanas de cultivo, y no ocurrió ningún crecimiento neto adicional de células después de la re-estimulación. En cambio, cuando los cultivos celulares de Tr1 se estimularon con la fábrica celular, permanecieron en crecimiento exponencial incluso después de una tercera estimulación. Este aumento de la

proliferación a largo plazo fue reproducible, ya que el aumento promedio en el número total de las células T fue 810 veces superior en cultivos de células estimulados con la fábrica celular que en los cultivos estimulados con perlas CD3/28 en seis experimentos independientes.

5 El análisis fenotípico de los cultivos mostró un enriquecimiento gradual de células T CD3+CD4 después de la estimulación con la fábrica celular (Fig. 5). Las células S2 desaparecieron rápidamente del cultivo de células, como se evidencia por la incapacidad de detectar las células que expresan los AcM anti-CD3 por citometría de flujo después de siete días (Fig. 6); este hallazgo se confirmó en experimentos a gran escala y también mediante RT-PCR de los genes de drosophila (datos no mostrados). Así, la mezcla de células T y el cultivo en la fábrica celular produce una población pura de células T en una semana.

Propagación eficiente por fábrica celular de células Tr1 antígeno específico. La inmunoterapia con las células Tr1 probablemente requerirá células con funciones reguladoras antígeno específicas. Para determinar si la fábrica celular se puede usar para expandir a Tr1 antígeno específica, los inventores las usaron para cultivar clones Tr1 OVA-específicos durante 10 semanas (Fig. 7). Un ejemplo de dos clones diferentes se muestra mediante el experimento que se ejecutó con cientos de clones diferentes. Los PBL procedentes de un individuo normal se marcaron con CFSE para continuar la división celular y las células se estimularon con ovoalbúmina (20 µg/ml) durante 7 días. Las células se tiñeron después con CD4, Cd18 y CD49b para seleccionar células Tr1 que sobreexpresan estos marcadores y células OVA-específicas se clasificaron según la disminución de la tinción CFSE debido a la división celular antígeno-específica (Fig. 8). Para controlar su fenotipo un volumen de población clasificada se estimuló con OVA y se analizó la producción de citoquina por tinción intracitoplásmática la cual reveló una población típica TR1 (Fig. 8). Después de la clonación, las células se estimularon con la fábrica celular (Fig. 9). Todas las células se re-estimularon con la fábrica celular a intervalos de 10 días. No se proporcionó estimulación con OVA durante el cultivo. Se obtuvieron las curvas de crecimiento exponencial de ambos clones durante varios meses. Una célula Tr1 antígeno específica produjo $1,5 \cdot 10^9$ células después de mes y medio de cultivo, un número suficiente para inmunoterapia. La capacidad proliferativa sustancial de las células Tr1 que permanece después de 30 días de cultivo sugiere que estas Tr1 podrían tener un potencial de trasplante sustancial a largo plazo después de la transferencia adoptiva.

30 Para determinar si la especificidad antigénica de las poblaciones expandidas se mantiene en cultivo, las células se estimularon con OVA (Fig. 10). Después de un mes y un medio de cultivo celular, las células se estimularon con OVA y APC autólogas y se analizó la secreción de citoquina se observó un perfil típico Tr1 para los dos diferentes clones analizados.

35 Al examinar las funciones efectoras de las células Tr1 cultivadas, se ensayó la función supresora antígeno-específica en un típico ensayo transwell (Fig. 10 y datos no mostrados). Ambos clones exhiben un efecto típico supresor Tr1 en las células espectadoras. La supresión se debió a la secreción de IL-10 y TGF-β como se muestra por el uso de anticuerpos de inmovilización (no mostrado). No se obtuvo la supresión en ausencia de estimulación con OVA (datos no mostrados). Resultados similares se obtuvieron con distintos donantes y diferentes clones TR1 (datos no mostrados).

3. Discusión

45 En comparación con las aAPC microesféricas u otro ensayo basado en la no estimulación celular, la fábrica celular permite una mejor formación de las sinapsis inmunológicas como resultado de la fluidez de la membrana de las APC. Además el presente sistema que emplea células S2 como andamio presenta varias ventajas para el uso en clínica: la falta de expresión MAC, son libres de micoplasma, no requieren de irradiación, no permiten la expansión de virus de mamíferos y se han adaptado para el crecimiento en medio libre de suero. Además, esta fábrica celular se puede usar "fuera de plataforma" para ampliar las poblaciones de células Tr1 de cualquier donante.

50 El sistema de fábrica celular es capaz de mantener el crecimiento exponencial de las células Tr1 por al menos dos o tres meses *in vitro*. Los inventores obtuvieron un número suficiente de células Tr1 a partir de un número de células de partida Tr1 antígeno específico sólo después de 30 a 45 días de cultivo. Esta eficiencia permite por primera vez la posibilidad de usar las células T bien caracterizadas para terapia celular. Por tanto, solo las células muy bien caracterizadas se inyectarán en contraste con la población celular heterogénea enriquecida con las células T requeridas pero contaminadas con células que tendrán solamente mínimos efectos adversos o ninguno. Alternativamente, este sistema de fábrica celular podría también usarse con un tetramero MHC clase II para enriquecer una población de una población antígeno-específica acelerando el tiempo de alcanzar el número de 10^9 células.

60 Una consecuencia de este sistema de cultivo celular es que las células Tr1 conservan una capacidad replicativa considerable después del cultivo con la fábrica celular, incluso después de alcanzar las cifras terapéuticas para la infusión clínica.

LISTADO DE SECUENCIA

<110>TXCELL INSERM
 GROUX Hervé
 COTTREZ Françoise
 5 BASTIAN Hervé
 <120> Producción in vitro de una población de células usando células nodrizas
 <130> D23094
 <140>EP05290836.5
 <141> 2005-04-15
 10 <160> 22
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210>1
 <211>708
 <212>ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223>Secuencia nucleica que codifica OKT3-L
 <400>1
 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatatcc 60
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcaccatga cctgcagtg cagctcaagt gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag 180
 tcaggcacct ccccaaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct 240
 gctcacttca ggggcagtg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cggcatggag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccatt cacgttcggc 360
 tcggggacaa agttggaaat aaaccgggct gatactgcac caactgtatc catcttccca 420
 ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 480
 taccctaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 540
 ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaa gacagcacct acagcatgag cagcacctc 600
 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 660
 acatcaactt caccatttgt caagagcttc aacaggaatg agtggttag 708
 20 <210>2
 <211>1560
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> Secuencia nucleica que codifica OKT3-H
 <400>2

ES 2 389 502 T3

atggaaaggc	actggatctt	tctactcctg	ttgtcagtaa	ctgcaggtgt	ccactcccag	60
gtccagctgc	agcagctctg	ggctgaactg	gcaagacctg	ggcctcagt	gaagatgtcc	120
tgcaaggctt	ctggctacac	ctttactagg	tacacgatgc	actgggtaaa	acagaggcct	180
ggacagggtc	tggaatggat	tggatacatt	aatcctagcc	gtggttatac	taattacaat	240
cagaagtcca	aggacaaggc	cacattgact	acagacaaat	cctccagcac	agcctacatg	300
caactgagca	gcctgacatc	tgaggactct	gcagtctatt	actgtgcaag	atattatgat	360
gatcattact	gccttgacta	ctggggccaa	ggcaccactc	tcacagtctc	ctcagccaaa	420
acaacagccc	catcggtcta	tccactggcc	cctgtgtgtg	gagatacaac	tggtcctctg	480
gtgactctag	gatgcctggt	caagggttat	ttccctgagc	cagtgcacct	gacctggaac	540
tctggatccc	tgtccagtgg	tgtgcacacc	ttcccagctg	tctgtcagtc	tgacctctac	600
accctcagca	gctcagtgc	tgtaacctcg	agcaacctggc	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	caaggagtct	1020
aaatgcaagg	tcaacaacaa	agacctccca	gcgcccatcg	agagaacat	ctcaaaaccc	1080
aaagggtcag	taagagctcc	acaggtatat	gtcttgcttc	caccagaaga	agagatgact	1140
aagaaacagg	tcactctgac	ctgcatggtc	acagacttca	tgctgaaga	catttactgt	1200
gagtggacca	acaacgggaa	aacagagcta	aaactacaaga	acactgaacc	agtcctggac	1260
tctgatgggt	cttacttcat	gtacagcaag	ctgagagtgg	aaaagaagaa	ctgggtggaa	1320
agaaatagct	actcctgttc	agtgtccac	gagggctg	acaatcacca	cacgactaag	1380
agcttctccc	ggactccggg	taaagaatc	gctgtgggcc	aggacacgca	ggaggtcatc	1440
gtgggtgccac	actccttgcc	ctttaagggt	gtggtgatct	cagccatcct	ggccttggtg	1500
gtgctcacca	tcactccct	tatcatctcc	atcatgcttt	ggcagaagaa	gccacgttag	1560

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

<220>
 <223> Secuencia nucleica que codifica CD80

10 <400>3

atggggccaca	cacggaggca	gggaacatca	ccatccaagt	gtccatacct	caatttcttt	60
cagctcttgg	tgetggtgg	tctttctcac	ttctgttcag	gtggtatcca	cgtgaccaag	120
gaagtgaaa	aaagtggcaac	gctgtcctgt	ggtcacaatg	tttctgttga	agagctggca	180
caaactcgca	tctactggca	aaaggagaag	aaaatggtgc	tgactatgat	gtctggggac	240
atgaatata	ggcccagagta	caagaaccgg	accatctttg	atatcactaa	taacctctcc	300
attgtgatcc	tggctctgcg	cccactctgac	gagggcacat	acgagtgtgt	tgttctgaag	360
tatgaaaaag	acgctttcaa	gcgggaacac	ctggctgaag	tgacgttatc	agtcaagct	420
gacttcccta	cacctagtat	atctgacttt	gaaattccaa	cttctaatat	tagaaggata	480
atthgtctca	cctctggagg	tttccagag	cctcacctct	cctggttgga	aaatggagaa	540
gaattaaatg	ccatcaaac	aacagtttcc	caagatcctg	aaactgagct	ctatgctggt	600
agcagcaaac	tggattccaa	tatgacaacc	aaccacagct	tcatgtgtct	catcaagtat	660
ggacatttaa	gagtgaaatca	gaccttcaac	tgggaatacaa	ccaagcaaga	gcattttcct	720
gataacctgc	tccccatcctg	ggccattacc	ttaatctcag	taaatggaat	ttttgtgata	780
tgctgcctga	cctactgctt	tgccccaaga	tgacagagaga	gaaggaggaa	tgagagattg	840
agaagggaaa	gtgtacgccc	tgtataa				867

15
 <210>4
 <211>990
 <212>ADN
 <213> homo sapiens

<220>
 <223> Secuencia nucleica que codifica CD86

<400>4

ES 2 389 502 T3

atggatcccc	agtgcactat	gggactgagt	aacattctct	ttgtgatggc	cttctgctc	60
tctgggtgctg	ctcctctgaa	gattcaagct	tatttcaatg	agactgcaga	cctgccatgc	120
caatttgcaa	actctcaaaa	ccaaagcctg	agtgagctag	tagtattttg	gcaggaccag	180
gaaaacttgg	ttctgaatga	ggtatactta	ggcaaagaga	aatttgacag	tgttcatcc	240
aagtatatgg	gccgcacaag	ttttgattcg	gacagttgga	ccctgagact	tcacaatctt	300
cagatcaagg	acaagggctt	gtatcaatgt	atcatccatc	acaaaaagcc	cacaggaatg	360
attcgcatcc	accagatgaa	ttctgaactg	tcagtgcttg	ctaacttcag	tcaacctgaa	420
atagtaccaa	tttctaatat	aacagaaaat	gtgtacataa	atttgacctg	ctcatctata	480
cacgggttacc	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	atggaatgg	aagaagaaga	agcgcctcgc	caactcttat	840
aaatgtggaa	ccaacacaat	ggagagggaa	gagagtgaac	agaccaagaa	aagagaaaaa	900
atccatatac	ctgaaagatc	tgatgaagcc	cagcgtgttt	ttaaaagtcc	gaagacatct	960
tcatgcgaca	aaagtgatac	atgtttttaa				990

5 <210>5
 <211>462
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Secuencia nucleica que codifica IL2

10 <400>5

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

15 <210>6
 <211>753
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Secuencia nucleica que codifica CD58 (LFA3)

<400>6

atggttgctg	ggagcgacgc	ggggcggggc	ctgggggtcc	tcagcgtggt	ctgcctgctg	60
cactgctttg	gtttcatcag	ctgtttttcc	caacaaatat	atggtggtgt	gtatgggaat	120
gtaactttcc	atgtaccaag	caatgtgcct	ttaaaagagg	tccatggaag	aaaacaaaag	180
gataaagtgt	cagaactgga	aaattctgaa	ttcagagctt	tctcatcttt	taaaaatagg	240
gtttatttag	acactgtgtc	aggtagcctc	actatctaca	acttaacatc	atcagatgaa	300
gatgagtatg	aaatggaatc	gccaaatatt	actgatacca	tgaagttcct	tctttatgtg	360
cttgagtctc	ttccatctcc	cacactaact	tgtgcattga	ctaattggaag	cattggaagtc	420
caatgcatga	taccagagca	ttacaacagc	catcgaggac	ttataatgta	ctcatgggat	480
tgctctatgg	agcaatgtaa	acgtaactca	accagtatat	attttaagat	ggaaaatgat	540
cttcacaaa	aaatacagtg	tactcttagc	aatccattat	ttaatacaac	atcatcaatc	600
attttgacaa	cctgtatccc	aagcagcggg	cattcaagac	acagatatgc	acttataccc	660
ataccattag	cagttaattac	aacatgtatt	gtgctgtata	tgaatgggat	tctgaaatgt	720
gacagaaaac	cagacagaac	caactccaat	tga			753

20 <210>7
 <211>462
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> Secuencia nucleica que codifica IL4

ES 2 389 502 T3

<400>7

atgggtctca	cctcccaact	gcttccccct	ctgttcttcc	tgctagcatg	tgccggcaac	60
tttgtccacg	gacacaagtg	cgatatacacc	ttacaggaga	tcatcaaaac	tttgaacagc	120
ctcacagagc	agaagactct	gtgcaccgag	ttgaccgtaa	cagacatctt	tgctgcctcc	180
aagaacacaa	ctgagaagga	aaccttctgc	agggtgcga	ctgtgctccg	gcagttctac	240
agccaccatg	agaaggacac	tcgctgcctg	gggtgcgactg	cacagcagtt	ccacaggcac	300
aagcagctga	tccgattcct	gaaacggctc	gacaggaacc	tctggggcct	ggcgggcttg	360
aattcctgtc	ctgtgaagga	agccaaccag	agtacgttgg	aaaacttctt	ggaaaggcta	420
aagacgatca	tgagagagaa	atatcaaaag	tgttcgagct	ga		462

<210>8

<211>441

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia nucleica que codifica IL13

<400>8

atgcatccgc	tcctcaatcc	tctcctggtg	gcactggggc	tcatggcgct	tttgttgacc	60
acggtcattg	ctctcacttg	ccttggcggc	tttgccctccc	caggccctgt	gcctccctct	120
acagccctca	gggagctcat	tgaggagctg	gtcaacatca	cccagaacca	gaaggctccg	180
ctctgcaatg	gcagcatggt	atggagcatc	aacctgacag	ctggcatgta	ctgtgcagcc	240
ctggaatccc	tgatcaacgt	gtcaggctgc	agtgccatcg	agaagacca	gaggatgctg	300
agcggattct	gccccacaaa	ggtctcagct	gggcagtttt	ccagcttgca	tgtccgagac	360
acaaaaatcg	aggtggccca	gtttgtaaag	gacctgctct	tacatttaa	gaaacttttt	420
cgcgagggac	agttcaactg	a				441

<210>9

<211>28

<212>ADN

<213> Secuencia Artifical

<220>

<223> Cebador sintético

<400>9

atgcggatcc atggatttc aagtcag 28

<210>10

<211>29

<212>ADN

<213> Secuencia Artifical

<220>

<223> Cebador sintético

<400>10

atgcgaattc ctaacactca ttctgttg 29

<210>11

<211>37

<212>ADN

<213> Secuencia Artifical

<220>

<223> Cebador sintético

<400>11

atgcccggg ggtaccact gaaaactctg actcaac 37

<210>12

<211>22

<212>ADN

<213> Secuencia Artifical

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400>12
 actggacagg gatccagagt tc 22
 5 <210>13
 <211>23
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 10 <400>13
 gaactctgga tccctgtcca gtg 23

 <210>14
 <211>35
 15 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 20 <400>14
 atgcgaattc ttaccggga gtccgggaga agctc 35

 <210>15
 <211>31
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400>15
 atgcgaattc gctgtgggcc aggacacgca g 31
 30 <210>16
 <211>40
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 35 <400>16
 atgcgggcc aagcttctaa cgtggcttct tctgcaaag 40

 <210>17
 <211>30
 <212>ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400>17
 atgcgatcc atgtacagga tgcaactcct 30
 45 <210>18
 <211>30
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 50

<400>18
 atgcgaattc tcaagtcagt gttgagatga 30

5
 <210>19
 <211>31
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

10
 <400>19
 atgctggatc catggttgc tggagccjacg c 31

<210>20
 <211>31
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Cebador sintético

<400>20
 atgctaagct ttcaattgga gttggtctg t 31

20
 <210>21
 <211>30
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

25
 <400>21
 atgcggatcc atgggtctca cctcccaact 30

<210>22
 <211>30
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Cebador sintético

<400>22
 atgcaagctt tcagctcgaa cacttgaat 30

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para la expansión in vitro de una población P' de células T de mamífero a partir de una población P de células T de mamífero en un medio de cultivo Mp, en donde dicha expansión requiere la presencia de al menos dos factores en dicho medio de cultivo, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:
- 5 a) cultivar las células nodrizas de insecto capaces de expresar o secretar los factores que comprenden:
- un anticuerpo anti-CD3 modificado, en donde la modificación del anticuerpo anti-CD3 consiste en la sustitución del dominio intracitoplasmático anti-CD3 de la cadena pesada anti-CD3 con un dominio transmembrana, dicho anticuerpo anti-CD3 modificado está anclado a la membrana celular de las células nodrizas y es susceptible de interactuar con la proteína del complejo TCR/CD3 de las células T, o una variante de esta,
 - una proteína CD80 o CD86, preferentemente una proteína CD80, anclada a la membrana celular de las células nodrizas, que es susceptible de interactuar con la proteína CD28 de las células T, o una variante de esta, y
 - opcionalmente, IL-2 la que cuando es secretada es susceptible de interactuar con el receptor IL-2 de las células T, o una variante de esta,
- 10 a una temperatura T1 en un medio de cultivo Mf, tal T1 permite la proliferación de dichas células nodrizas,
- b) poner en contacto las células nodrizas obtenidas en la etapa (a) removidas o no de su medio de cultivo Mf, con la población P de células T contenidas en el medio de cultivo Mp, en donde dicho medio de cultivo Mp no contiene inicialmente los al menos dos factores, para obtener una mezcla que contiene la población P de células T, células nodrizas y el medio de cultivo Mp,
- 20 c) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (b) que contiene al menos los dos factores que se expresan por las células nodrizas en el medio de cultivo Mp, donde dicha etapa (c) de cultivo se efectúa a una temperatura T2, dicha temperatura T2 se selecciona de manera que:
- la población P de células T prolifere, y
 - las células nodrizas no proliferen,
- 25 y en donde la población P de células T' se expande,
- d) recuperar la población P de células T' así expandida,
- en donde dicho método es capaz de mantener el crecimiento exponencial de la población P de células T' por al menos dos o tres meses.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en donde las células nodrizas mueren durante la etapa (c).
3. El método de la reivindicación 2, en donde en la etapa (d) se eliminan la membrana celular y los fragmentos de ADN de las células nodrizas que resultan de la muerte de dichas células.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la eliminación de la membrana celular y los fragmentos de ADN comprende las siguientes etapas:
- 35 - opcionalmente, una etapa de lavado con una solución de albúmina,
- una etapa de separación en una solución de gradiente de densidad, en donde el índice de densidad está comprendido entre aproximadamente 1,120 y aproximadamente 1,146.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células nodrizas son células recombinantes y contienen un ácido nucleico heterólogo que codifica dichos al menos dos factores.
- 40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células nodrizas son de la línea celular de Drosophila S2 depositada el 25 de marzo de 2005 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) bajo el número 1-3407.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde T1 es inferior a T2 y T2 es al menos aproximadamente 35°C.
- 45 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medio de cultivo Mp y/o el medio Mf es un medio de cultivo libre de suero.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones **1 a 8**, en donde en la etapa (b) las células nodrizas se remueven de su medio de cultivo Mf.
- 5 **10.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **1 a 9**, en donde el dominio transmembrana que reemplaza el dominio intracitoplasmático de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 es el dominio transmembrana del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
- 11.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **1 a 10**, en donde la población de células T es una población de células Tr1, y en donde las células nodrizas expresan además factores que interactúan con las siguientes proteínas de la superficie celular adicionales de la población de células Tr1:
- la proteína CD2,
 - 10 - el receptor de interleuquina 2 (IL-2), y
 - el receptor de interleuquina 4 (IL-4).
- 12.** El método de la reivindicación **11**, en donde dichos factores son:
- la proteína CD58 anclada a la membrana celular de células nodrizas, que es susceptible de interactuar con la proteína CD2 de las células Tr1, o una variante de esta, y
 - 15 - una interleuquina seleccionada del grupo que consiste de IL-4 e interleuquina 13 (IL-13), preferentemente IL-4, dicha interleuquina es secretada por las células nodrizas y es susceptible de interactuar con el receptor IL-4 de las células Tr1, o una variante de esta.
- 13.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **1 a 12**, en donde las células de dicha población P de células mamíferas son células humanas.
- 20 **14.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **1 a 13**, en donde los al menos dos factores son de origen humano.
- 15.** El método de la reivindicación **14**, en donde la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 modificado es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:1, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:1, y en donde la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 modificado es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:2, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:2.
- 25 **16.** El método de la reivindicación **14** o **15**, en donde la proteína CD80 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:3, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:3.
- 30 **17.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **14 a 16**, en donde la proteína CD86 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:4, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:4.
- 18.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **14 a 17**, en donde la IL-2 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:5, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:5 .
- 35 **19.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **14 a 18**, en donde la proteína CD58 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:6, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:6.
- 40 **20.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **14 a 19**, en donde la IL-4 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:7, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:7.
- 21.** El método de cualquiera de las reivindicaciones **14 a 20**, en donde la IL-13 es codificada por el ácido nucleico heterólogo de la secuencia sec. con núm. de ident.:8, o cualquier ácido nucleico que tenga al menos 70% de identidad con la sec. con núm. de ident.:8.

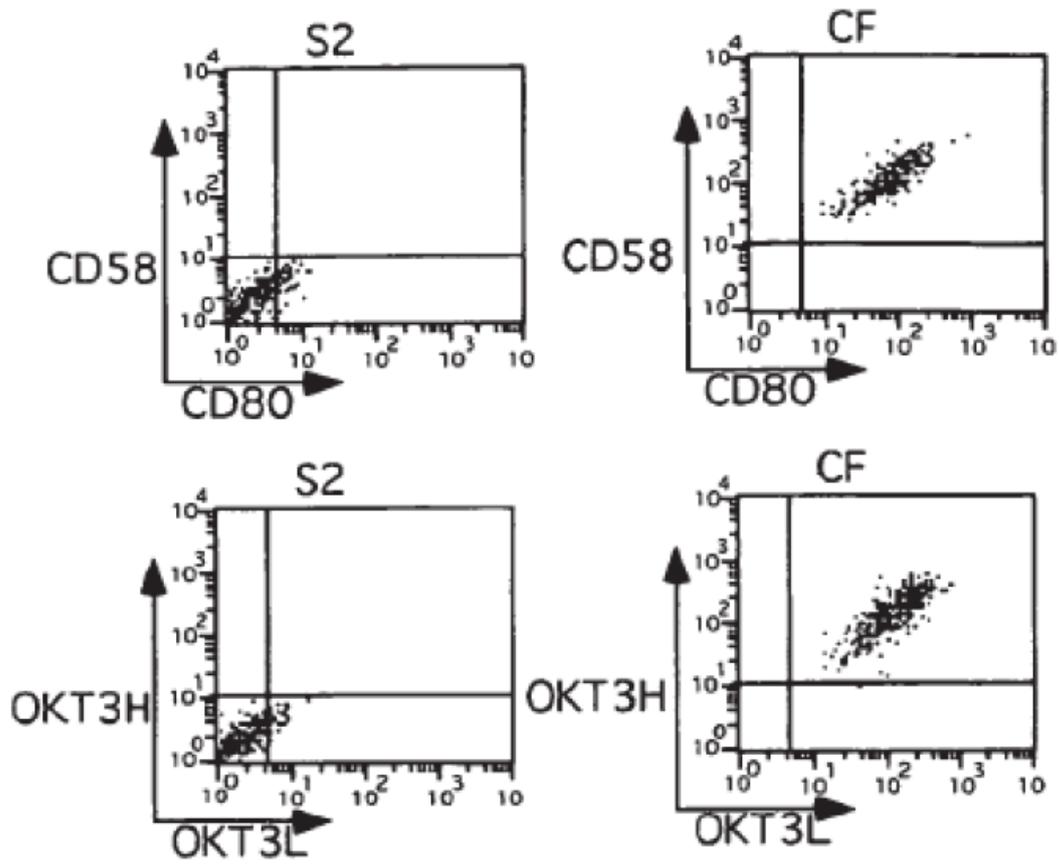


Figura 1

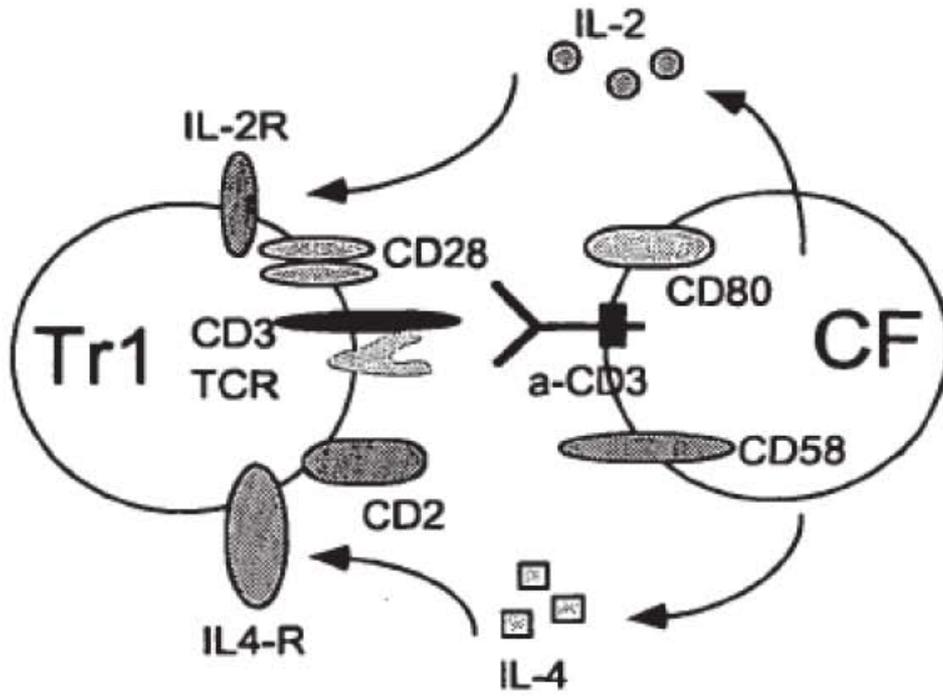


Figura 2

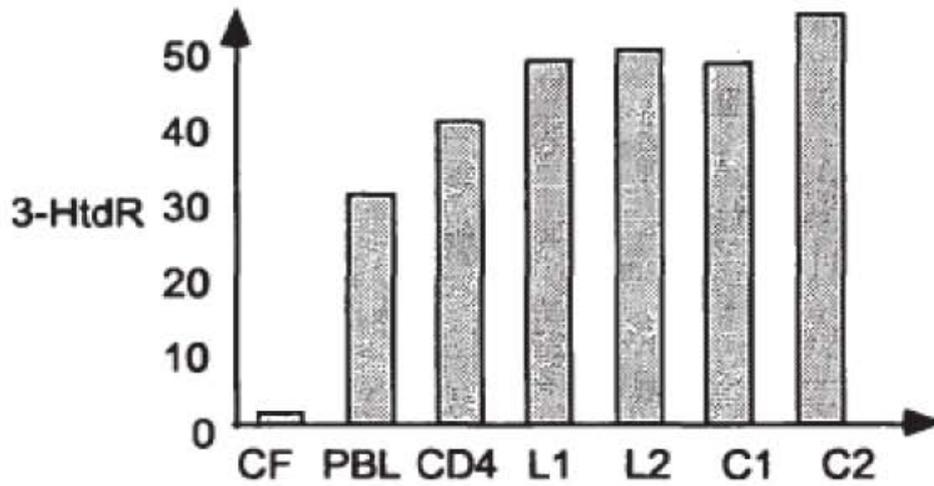


Figura 3

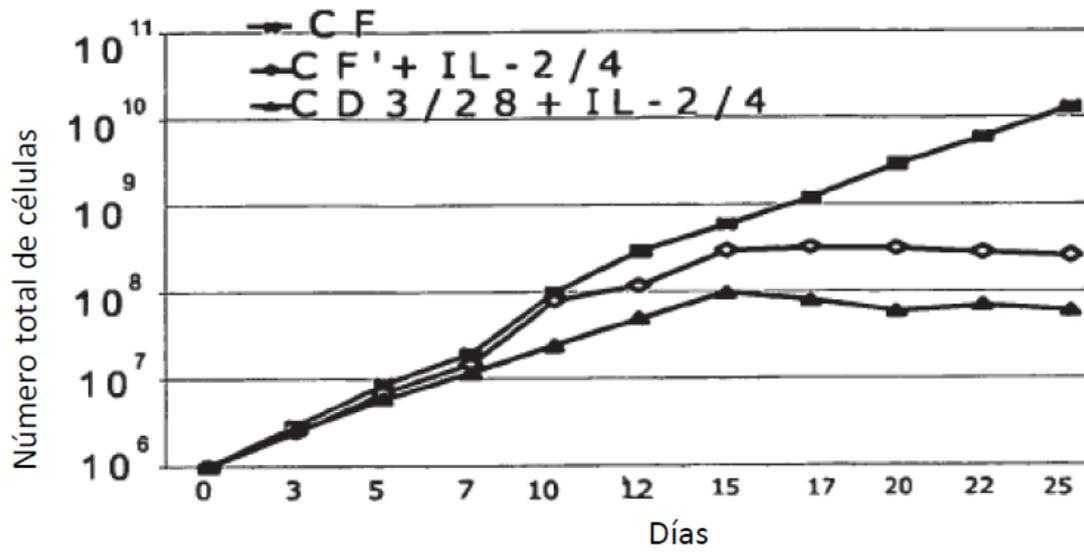


Figura 4

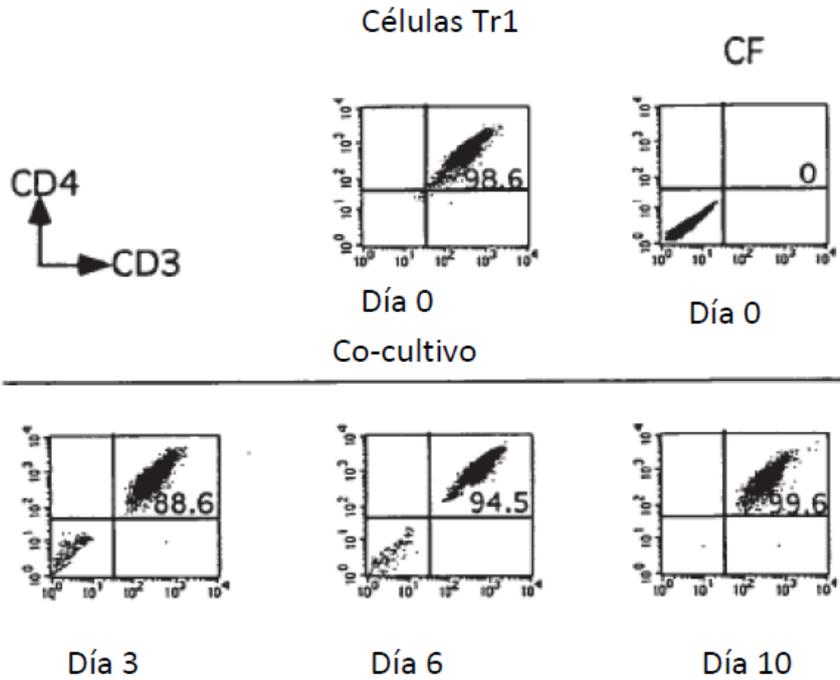


Figura 5

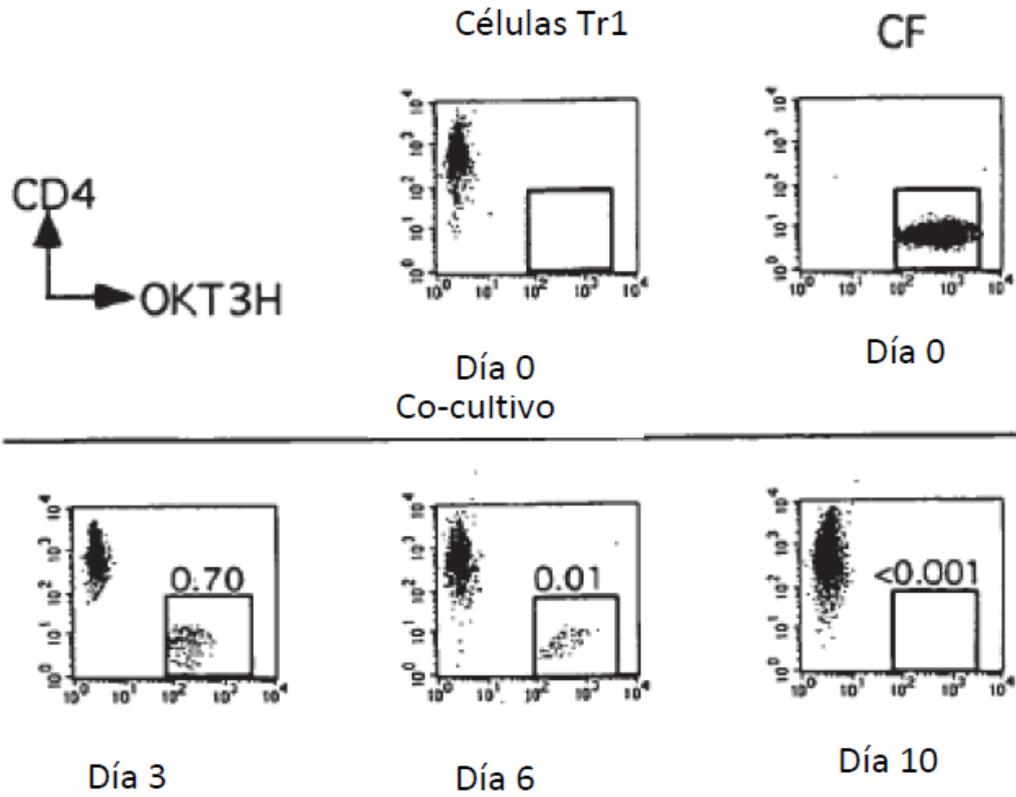


Figura 6

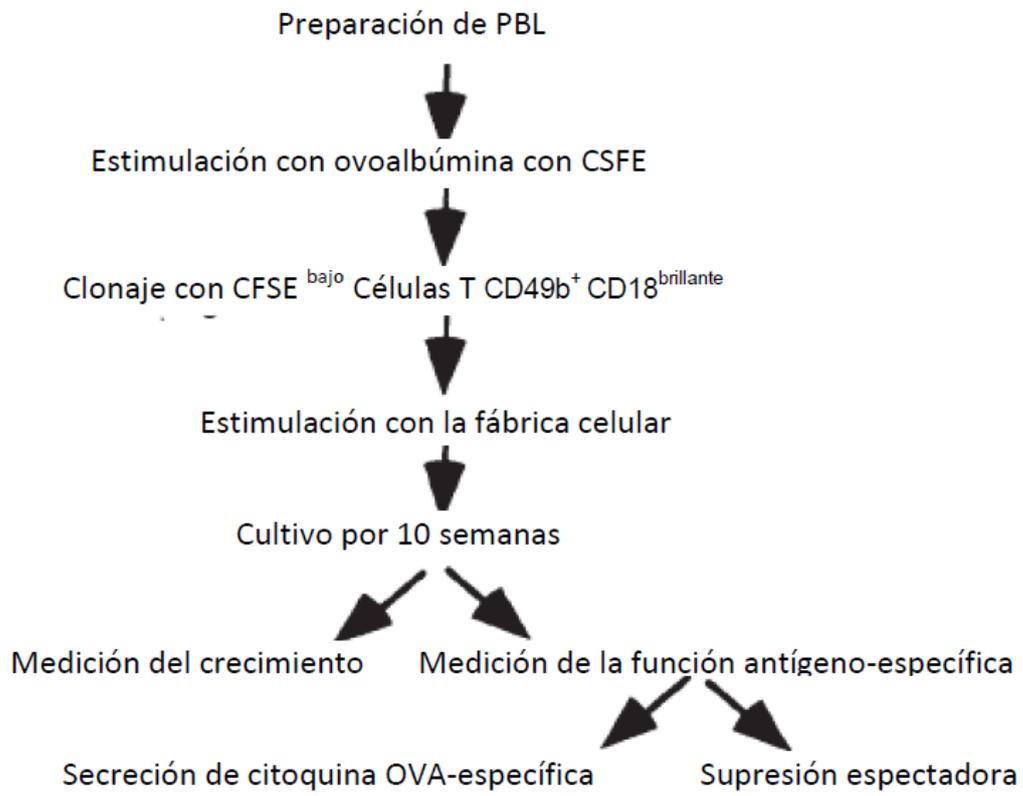


Figura 7

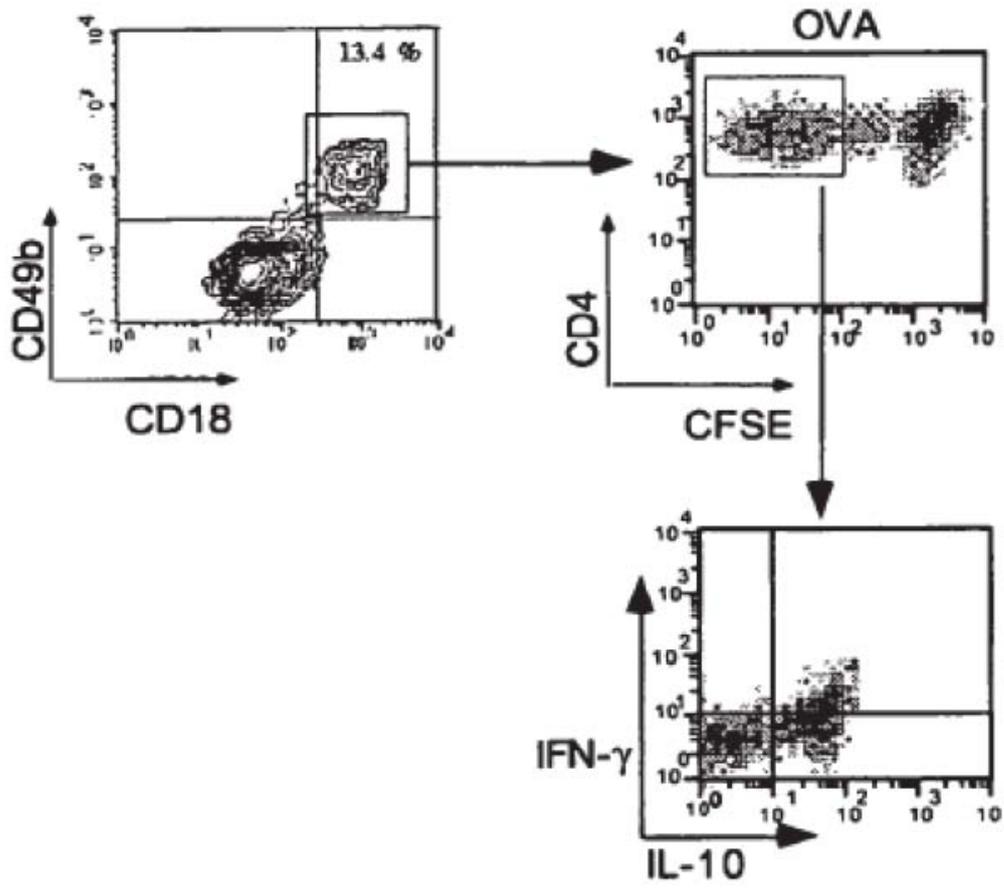


Figura 8

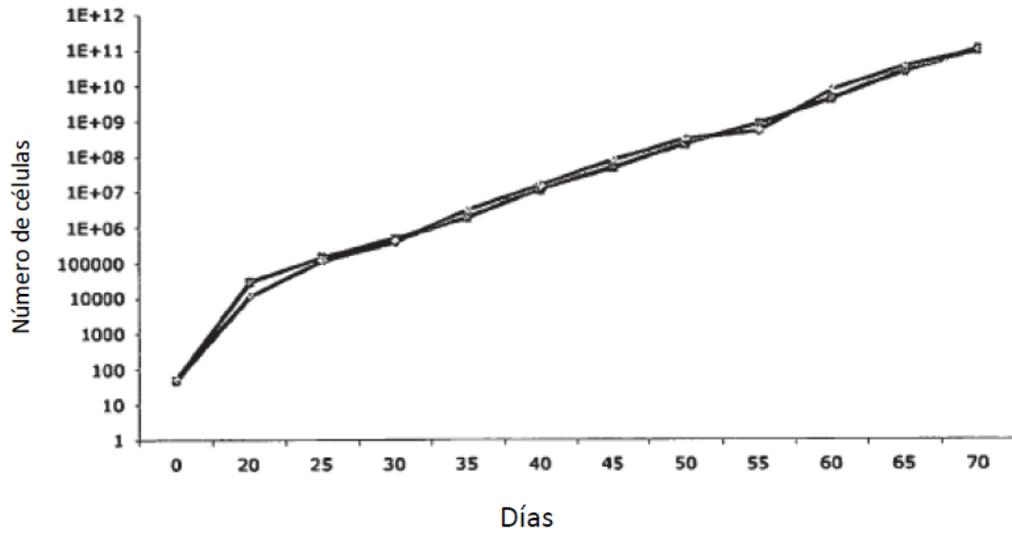


Figura 9

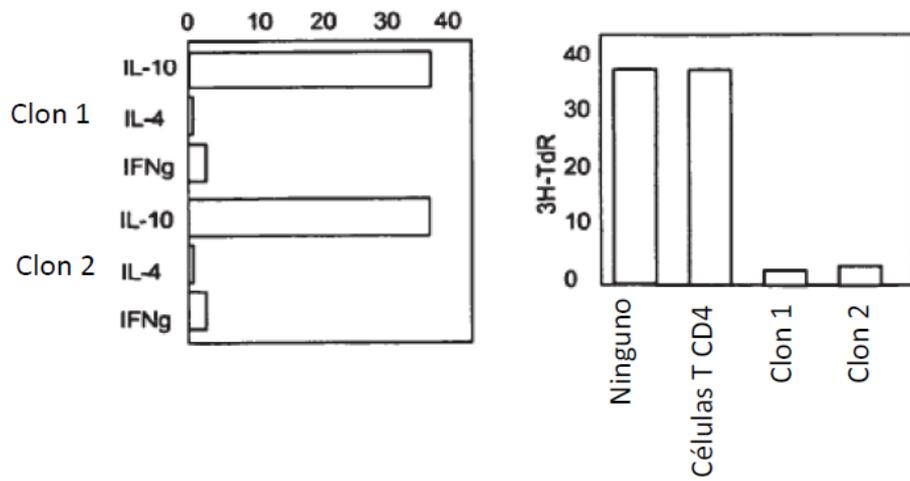


Figura 10

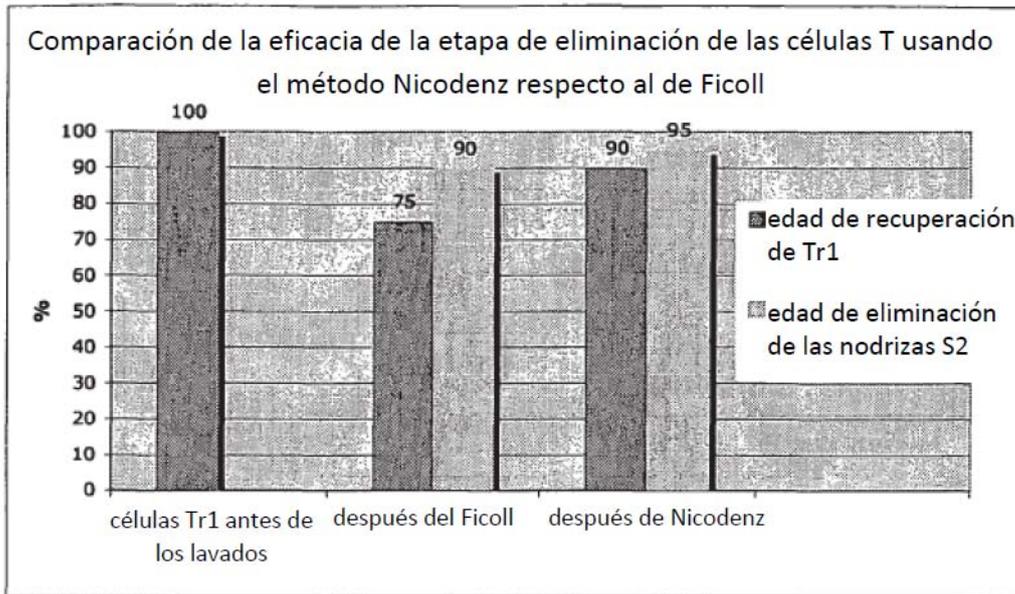


Figura 11