

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 580**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63	(2006.01)	C07K 16/28	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)	C12N 5/0783	(2010.01)
A61K 39/00	(2006.01)	C12N 5/074	(2010.01)
A61K 39/38	(2006.01)	C12N 5/071	(2010.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
G01N 33/53	(2006.01)		
A01N 43/04	(2006.01)		
C07K 16/00	(2006.01)		
C12P 21/08	(2006.01)		
C07K 14/705	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2004 E 07021595 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1897548**

54 Título: **Regulación de células T**

30 Prioridad:

28.02.2003 US 451039 P
24.06.2003 US 482143 P
22.12.2003 US 531704 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2014

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)
3400 N. Charles Street
Baltimore, MD 21218, US y
ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL
INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

PARDOLL, DREW M.;
VIGNALI, DARIO A.;
HUANG, CHUNG-TAI;
WORKMAN, CREG J.;
POWELL, JONATHAN y
DRAKE, CHARLES

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 439 580 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

Regulación de células T

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos terapéuticos y de selección de fármacos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Una variedad de enfermedades se caracterizan por el desarrollo de inmunosupresión progresiva en un paciente. La presencia de una respuesta inmunitaria afectada en pacientes con tumores malignos se ha documentado particularmente bien. Se ha mostrado que los pacientes con cáncer y ratones que portan tumor tienen una variedad de funciones inmunitarias alteradas tales como una disminución en la hipersensibilidad de tipo retardada, una
15 disminución en la función lítica y la respuesta proliferativa de linfocitos. S. Broder *et al.*, N. Engl. J. Med., 299: 1281 (1978); E. M. Hersh *et al.*, N. Engl. J. Med., 273: 1006 (1965); North y Burnauker, (1984). Muchas otras enfermedades o intervenciones también se caracterizan por el desarrollo de una respuesta inmunitaria afectada. Por ejemplo, se ha observado inmunosupresión progresiva en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), septicemia, lepra, infecciones por citomegalovirus, malaria, y similares, así como con quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, aún han de dilucidarse por completo los mecanismos responsables de la regulación por
20 disminución de la respuesta inmunitaria.

La respuesta inmunitaria es un fenómeno complejo. Los linfocitos T (células T) son críticos en el desarrollo de todas las reacciones inmunitarias mediadas por células. Las células T cooperadoras controlan y modulan el desarrollo de
25 respuestas inmunitarias. Las células T citotóxicas (linfocitos T citolíticos) son células efectoras que desempeñan un papel importante en reacciones inmunitarias frente a virus y parásitos intracelulares por medio de la lisis de las células diana infectadas. Las células T citotóxicas también se han implicado en la protección del organismo frente al desarrollo de cánceres a través de un mecanismo de vigilancia inmunitario. Las células T reguladoras bloquean la inducción y/o actividad de las células T cooperadoras. Las células T no reconocen generalmente el antígeno libre, sino que lo reconoce en la superficie de otras células. Estas otras células pueden ser células presentadoras de
30 antígeno especializadas que pueden estimular la división de células T o pueden ser células infectadas por virus dentro del organismo que se convierten en una diana para las células T citotóxicas.

Las células T citotóxicas reconocen habitualmente el antígeno en asociación con productos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I que se expresan en todas las células nucleadas. Las células T cooperadoras, y la mayor parte de las células T que proliferan en respuesta al antígeno *in vitro*, reconocen el antígeno en asociación con productos de CMH de clase II. Los productos de clase II se expresan de manera costosa en células presentadoras de antígeno y en algunos linfocitos. Las células T también pueden dividirse en dos subpoblaciones principales basándose en sus glicoproteínas de la membrana celular tal como se define con anticuerpos
35 monoclonales. El subconjunto CD4⁺ que expresa una glicoproteína de 62 kD reconoce habitualmente el antígeno en el contexto de antígenos de clase II, mientras que el subconjunto CD8⁺ expresa una glicoproteína de 76 Kd y se restringe a reconocer el antígeno en el contexto de CMH de clase I.

El aumento de la respuesta inmunitaria en animales comprometidos de manera inmunitaria mediante infusiones de linfocinas, inmunoterapia adoptiva se ha encontrado con un éxito variable y limitado. Son necesarios métodos para mejorar este tipo de tratamiento. Por ejemplo, se proporcionan infusiones de linfocitos, sangre y otras células a
45 pacientes inmunodeficientes en determinadas prácticas. Sin embargo, la aceleración y potenciación de la reconstitución de una población de células T sanas podría proporcionar un beneficio y una eficacia aumentados significativos a tales pacientes.

Varios estados pueden dar como resultado una actividad perjudicial de células T. Por ejemplo, las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias mediadas por célula T se caracterizan por una actividad perjudicial de células T en la que proliferan células T que reconocen autoantígenos y atacan células que expresan tales antígenos. Otros ejemplos incluyen la aparición de rechazo de injertos mediado por células T del huésped y enfermedad de injerto
50 contra huésped.

Las terapias inmunosupresoras existentes disponibles para tratar estos estados incluyen la administración de compuestos inmunosupresores tales como ciclosporina A, FK506 y rapamicina. Sin embargo, estas terapias no son completamente eficaces y se asocian con efectos secundarios adversos significativos tales como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, hipertensión, hirsutismo y neurotoxicidad. Por tanto, son necesarias terapias adicionales que puedan suprimir de manera más eficaz la actividad de células T con menos efectos secundarios, para tratar estos
60 estados.

La homeostasis de linfocitos es un proceso biológico fundamental que está regulado estrictamente. Tanchot, C. *et al.*, Semin. Immunol. 9: 331-337 (1997); Marrack, P. *et al.*, Nat. Immunol. 1: 107-111 (2000); C. D. Surh, C.D. y
65

Sprent, J., *Microbes. Infect.* 4: 51-56 (2002); Jameson, S.C., *Nat. Rev. Immunol.* 2: 547-556 (2002). Aunque se entiende escasamente el control molecular de este proceso, se cree que las moléculas implicadas en la mediación de dos rutas de señalización son esenciales. En primer lugar, el reconocimiento de moléculas de autohistocompatibilidad mayor (CMH) es importante en el mantenimiento de la homeostasis de células T vírgenes y la función de células T de memoria. Takeda, S. *et al.*, *Immunity* 5: 217-228 (1996); Tanchot, C. *et al.*, *Science* 276:2057-2062 (1997).

Además, estudios recientes han demostrado que se requiere la expresión del receptor de células T (TCR) para la supervivencia continuada de la célula T virgen. Polic, B. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 8744-8749 (2001); Labrecque, N. *et al.*, *Immunity* 15: 71-82 (2001). En segundo lugar, las citocinas que señalizan a través de la cadena gamma común (γ c) son críticas para la supervivencia y homeostasis de células T vírgenes, particularmente la interleucina-7 (IL-7). Schluns, K.S. *et al.*, *Nat. Immunol.* 1: 426-432 (2000); Tan, J.T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 8732-8737 (2001). Todas estas moléculas regulan positivamente la homeostasis de células T. En cambio, sólo se han implicado CTLA-4 y TGF- β en la regulación negativa de la homeostasis de células T, aunque esto ha de confirmarse aún mediante la transferencia de células T a huéspedes linfopénicos o análisis de expansión neonatal. Waterhouse, P. *et al.*, *Science* 270: 985-988 (1995); Tivol, E.A. *et al.*, *Immunity* 3: 541-547 (1995); Lucas, P.J. *et al.*, *J. Exp. Med.* 191: 1187-1196 (2000); Gorelik, L. y Flavell, R.A., *Immunity* 12: 171-181 (2000).

LAG-3 es particularmente interesante debido a su estrecha relación con CD4. LAG-3 tiene una organización genómica similar a CD4 y reside en la misma ubicación cromosómica. Bruniquel, D. *et al.*, *Immunogenetics* 47: 96-98 (1997). LAG-3 se expresa en linfocitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺ activados y un subconjunto de células T $\gamma\delta$ y linfocitos citolíticos naturales. Baixeras, E. *et al.*, *J. Exp. Med.* 176: 327-337 (1992); Triebel, F. *et al.*, *J. Exp. Med.* 171: 1393-1405 (1990); Huard, B. *et al.*, *Immunogenetics* 39: 213-217 (1994); Workman, C.J. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 32: 2255-2263 (2002). Como CD4, LAG-3 se une a moléculas de moléculas de CMH de clase II pero con una afinidad mucho mayor. Huard, B. *et al.*, *Immunogenetics* 39: 213-217 (1994); Huard, B. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25: 2718-2721 (1995).

El trasplante de células que expresan LAG-3 en su superficie da como resultado la protección frente al rechazo de injertos (documento WO 98/23748).

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A a 1E. Las células T CD4⁺ específicas de HA se vuelven tolerantes y desarrollan actividad de células T reguladoras con la transferencia adoptiva a ratones transgénicos C3-HAhigh. (Figura 1A) Los ratones transgénicos C3-HAhigh expresan altos niveles de HA en diversos compartimentos epiteliales, expresándose el mayor nivel en epitelios pulmonares. Los receptores C3-HAhigh mueren 4-7 días tras la transferencia adoptiva de 2,5X10⁶ células T CD4⁺ transgénicas de TCR específico de HA (6.5) debido a neumonía asociada con una fase efectora transitoria de activación que se produce antes del desarrollo de un fenotipo anérgico. La transferencia de números menores de células T CD4⁺ 6.5 da como resultado una patología pulmonar menos grave y los receptores C3-HAhigh sobreviven a la transferencia. Las células T 6.5 residuales se vuelven anérgicas tal como se define por su incapacidad para producir interferón γ o proliferar para dar antígeno HA *in vitro*. Los ratones que reciben una dosis inferior a la letal de células T 6.5 se protegen frente a la infusión posterior de 2,5X10⁶ células T 6.5 vírgenes. Por tanto, las células T tolerizadas iniciales desarrollan actividad Treg que suprime la neumonía letal inducida por la segunda dosis alta de células T 6.5. (Figuras 1B a 1E) Localización de células T efectoras/de memoria frente a suprimidas en ratones C3-HAhigh. Se transfirieron de manera adoptiva células T 6.5 vírgenes (Thy 1.1⁺/1.2⁻) a receptores C3-HAhigh (Thy 1.1⁻/1.2⁺), o bien en ausencia o bien en presencia de células 6.5 anérgicas/Treg (Thy 1.1⁻/1.2⁺). Se recogieron los bazo y pulmones 3 días tras la transferencia adoptiva y se tiñeron células Thy 1.1⁺ mediante inmunohistoquímica. En ausencia de células Treg, se dispersan células T efectoras en los folículos esplénicos (figura 1B) y se infiltran en los vasos pulmonares (figura 1C). En presencia de células Treg, las células T 6.5 específicas de HA suprimidas se secuestran en la vaina linfática periarteriolar esplénica (figura 1D) y no pueden infiltrarse en los vasos pulmonares (figura 1E).

Figuras 2A-2C. LAG-3 se expresa de manera diferencial entre células T CD4⁺ anérgicas/Treg y efectoras/de memoria y la expresión de LAG-3 en células T CD4⁺ anérgicas/Treg se correlaciona con la expresión de IL-10. La expresión diferencial revelada mediante análisis de chip genético se confirmó mediante (figura 2A) RT-PCR en tiempo real cuantitativa. La expresión diferencial de LAG-3 en los primeros días (día 2 a día 4) se extiende hasta 30 días tras la transferencia adoptiva. (Figura 2B) Se evaluaron los niveles de proteína LAG-3 de superficie celular mediante tinción con anticuerpos. Se recogieron los esplenocitos de ratones B10.D2 de tipo natural, C3-HAhigh inmunizados con Vac-HA, o ratones B10.D2 de tipo natural 5 días tras inyección i.v. con esplenocitos 6.5^{+/+}Thy1.1^{+/+}, y se prepararon en una suspensión monocelular. Todas las muestras se incubaron en primer lugar con IgG de rata completa para bloquear los receptores Fc. Se tiñeron las células con anticuerpo anti-6.5-biotina+SA-APC específico de TCR, LAG-3-PE, o los controles de isotipo correspondientes. Se regularon las células de forma doble con la

población total de linfocitos y linfocitos positivos para 6.5. Control de isotipo, línea discontinua; células vírgenes, línea de color gris claro; células efectoras/de memoria, línea de color gris oscuro; células anérgicas/Treg, línea de color negro. (Figura 2C) El análisis de múltiples muestras de poblaciones anérgicas/Treg a lo largo de muchos experimentos confirma una correlación directa entre el nivel de LAG-3 y el nivel de ARNm de IL-10.

5 Figuras 3A-3B. LAG-3 se expresa en células Treg inducidas independientemente de CD25 y es un marcador de la función de Treg. (Figura 3A) Se tiñeron células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg de bazo de receptores C3-HAhigh 5 días tras la transferencia para determinar la expresión de LAG-3 y CD25, en comparación con controles de isotipo. (Figura 3B) Se clasificaron las células en 4 poblaciones basándose en su tinción de LAG-3 y CD25 de superficie: 10 LAG-3highCD25high, LAG-3highCD25low, LAG-3lowCD25high y LAG-3lowCD25low. Se añadieron 1X10⁵ de cada uno de los diferentes subconjuntos clasificados de células como supresores en un ensayo de supresión *in vitro* con 1X10⁴ CD4⁺ 6.5 vírgenes como células que responden. Las células LAG-3lowCD25low fueron las menos supresoras. LAG-3highCD25high, LAG-3highCD25low y LAG-3lowCD25high son comparables en la actividad supresora, mostrando las células doblemente positivas LAG-3highCD25high la actividad más supresora. Esto es el 15 resultado representativo de tres experimentos reproducibles.

Figura 4. Los anticuerpos anti-LAG-3 bloquean la actividad Treg *in vitro*. El anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 20 añadido al ensayo de supresión *in vitro* a una concentración de 2 µg/ml, revierte totalmente la supresión de la proliferación de células T CD4⁺ 6.5 vírgenes *in vitro* por supresores de CD4⁺ 6.5 a una razón de supresor: célula que responde de 0,04:1.

Figuras 5A a 5C. El anticuerpo anti-LAG-3 elimina la supresión *in vivo* por células Treg CD4⁺ 6.5 inhibiendo 25 directamente células Treg. (Figura 5A) Ratones C3-HAhigh pretratados con 8.000 células T CD4⁺ 6.5 sobrevivieron a la exposición posterior a 2,5X10⁶ células T CD4⁺ 6.5 administradas 4 días tras el establecimiento de la transferencia inicial de la población Treg (con protección). Sin el pretratamiento con dosis inferior a la letal, los receptores C3-HAhigh murieron 4-6 días tras la exposición letal (sin protección). Se administró el anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 (200 µg) por vía i.v. a los ratones C3-HAhigh con la dosis letal de células T 6.5 4 días tras pretratarse con 8.000 30 células T CD4⁺ 6.5 y se administró otra dosis de 200 µg 2 días después. Los ratones tratados con anticuerpo anti-LAG-3 ya no pudieron tolerar la exposición letal posterior (protección + aLAG-3). En cambio, el tratamiento con el anticuerpo control de isotipo, IgG1 de rata no pudo eliminar la supresión *in vivo* (protección + IgG1 de rata). (Figuras 5B y 5C) El Acm anti-LAG-3 no hiperactiva células T CD4⁺ 6.5 vírgenes en ausencia de Treg. Los ratones C3-HAhigh recibieron o bien 2,5X10⁵ (dosis inferior a la letal; figura 5B) o bien 8X10⁵ (letalidad parcial entre 7 y 14 días tras la transferencia; figura 5C) células T CD4⁺ 6.5 vírgenes en combinación con el anticuerpo anti-LAG-3, IgG1 de 35 rata control o sin anticuerpo. No se observó letalidad con las infusiones de anticuerpo anti-LAG-3 a la dosis de 2,5X10⁵ mientras que la letalidad a la dosis de 8X10⁵ no se vio afectada por el anticuerpo anti-LAG-3.

Figuras 6A a 6D. Papel de LAG-3 en células T CD4⁺CD25⁺ naturales. (Figura 6A) Las células T CD4⁺CD25⁺ 40 naturales tienen mayores niveles de expresión de ARNm de LAG-3 en comparación con su homólogo CD4⁺CD25⁻. Se purificaron células T CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ de ganglios linfáticos de ratón BALB/c de tipo natural. Las células T CD4⁺CD25⁺, la población documentada que contiene células T reguladoras naturales, tienen niveles de ARN significativamente mayores para CD25 y LAG-3, así como para CTLA-4, GITR y Foxp3, en comparación con su homólogo CD4⁺CD25⁻ (se normalizó la expresión de cada ARNm en el subconjunto CD4⁺CD25⁻ a un valor de 1). (Figura 6B) La tinción de superficie de LAG-3 es negativa en células T reguladoras naturales CD4⁺CD25⁺, como en su homólogo CD4⁺CD25⁻. Sin embargo, la tinción intracelular para LAG-3 revela una población positiva en células T 45 CD4⁺CD25⁺, pero no en CD4⁺CD25⁻. (Figura 6C) Se usaron las células T CD4⁺CD25⁺ clasificadas de ganglios linfáticos de ratón BALB/c como supresores y las células T CD4⁺CD25⁻ como células que responden en un ensayo de supresión *in vitro* (razón de supresor: efector de 0,04: 1), con anticuerpos anti-CD3 (0,5 µg/ml) como el estímulo de células T. Los anticuerpos anti-LAG-3 a la concentración de 50 µg/ml revierten la supresión *in vitro* de células T reguladoras naturales CD4⁺CD25⁺ mientras que el anticuerpo de control de isotipo no lo hace (figura 6D). Tras el 50 ensayo con supresor en C, se tiñeron las células CD4⁺CD25⁺ (que se distinguen de las células efectoras por el marcaje de Thy1.2) con anticuerpo anti-LAG-3 o de control de isotipo.

Figura 7. La expresión ectópica de LAG-3 de tipo natural pero no mutante en células T CD4⁺ 6.5 sometidas a 55 depleción de CD25 confiere una potente actividad reguladora *in vitro*. En primer lugar se sometieron células T CD4⁺ 6.5 a depleción de cualquier Treg CD25⁺ "natural" y luego se transdujeron con vectores retrovirales basados en MSCV que codifican para o bien GFP solo, GFP + LAG-3 de tipo natural o bien GFP + una LAG-3 mutante, Y73FΔCY que tiene una unión disminuida a CMH de clase II y no puede mediar en la señalización posterior. Tras un periodo de descanso de 10 días, esencialmente no se observó tinción de LAG-3 endógena en células T CD4⁺ 6.5 GFP⁺ transducidas con el vector MSCV-GFP mientras que se observaron altos niveles de tinción de LAG-3 en 60 células T 6.5 GFP⁺ transducidas con los vectores MSCV-LAG-3/GFP y MSCV-LAG-3.Y73FΔCY/GFP. Las células GFP⁺ procedentes de las transducciones con MSCV-LAG-3/GFP y MSCV-LAG-3.Y73FΔCY/GFP se tiñeron de manera brillante con anticuerpos anti-LAG-3 mientras que las células transducidas con MSCV-GFP prácticamente no presentaron tinción de LAG-3. Se clasificaron las células GFP⁺ de cada grupo y se mezclaron a diferentes razones con APC, péptido HA110-120 5 µg/ml y células 6.5 CD4⁺CD25⁻ vírgenes en un ensayo de proliferación.

65

La figura 8 muestra que la expresión ectópica de LAG-3 en un clon de células T específico de fognina confiere protección frente a diabetes tras la transferencia conjunta con esplenocitos de ratones NOD. Se transfirieron 10^7 esplenocitos de ratones NOD prediabéticos solos (ninguno) o en combinación con células del clon 4 de células T de fognina (obtenidas de John Hutton) transducidas con vector (MIG), LAG-3, o un mutante defectuoso para la señalización, LAG-3 \square K, en ratones NOD/SCID. Se monitorizaron los ratones NOD/SCID (5/grupo) para detectar diabetes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

LAG-3 es una molécula de la superficie celular de activación inducida, relacionada con CD4, que se une a CMH de clase II con alta afinidad. Se encontró que ratones deficientes en LAG-3 de edad avanzada tienen el doble de células T CD4⁺ y CD8⁺ que los controles de tipo natural. Las células T deficientes en LAG-3 muestran expansión homeostásica potenciada en huéspedes linfopénicos, que depende del ligamiento a LAG-3 de moléculas de moléculas de CMH de clase II. Esto se suprimió mediante la expresión ectópica de LAG-3 de tipo natural pero no mediante un mutante defectuoso para la señalización. Esta disregulación de la homeostasis de células T da como resultado la expansión de múltiples tipos celulares. Estos datos sugieren que LAG-3 regula negativamente la homeostasis de células T CD4⁺ y CD8⁺, y presentan LAG-3 como diana terapéutica para acelerar el injerto de células T tras el trasplante de médula ósea.

CD223, también conocida como gen de antígeno de leucocitos-3 o LAG-3, es una proteína de la superficie celular de activación inducida relacionada con CD4 que se une a moléculas de CMH de clase II con alta afinidad. Baixeras, E. *et al.*; J. Exp. Med. 176: 327 (1992). Véanse Triebel, F., "Lag-3(CD223)", Protein Reviews on the Web (PROW) 3:15-18(2002) en la dirección URL: <http://tipo.de.archivo.www.servidor.principal.nombre.de.dominio.ncbi.nlm.gov/directorio.PROW/guía.de.subdirectorio.nombre.de.documento.165481751g.htm>; Triebel, F. *et al.*, "LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4", J. Exp. Med. 171: 1393-1405 (1990). Se exponen una secuencia de aminoácidos y ADN murino representativas para CD223 como SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Véase también el código de acceso GenBank X9113. Se exponen una secuencia de aminoácidos y ADN humano representativas para CD223 como SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente. Véase también el número de acceso GenBank X51985. Estas secuencias se derivan de individuos únicos. Se espera que existan variantes alélicas en la población que difieren en menos de aproximadamente el 5% de las posiciones. Tales variantes alélicas están incluidas dentro del significado de CD223 de origen murino o humano.

Las células T reguladoras son un subgrupo de células T que funcionan inhibiendo las células T efectoras. Las células T reguladoras son CD223⁺ y normalmente también son CD4⁺CD25⁺. Las células T reguladoras desempeñan un papel fundamental en el equilibrio de la tolerancia autoinmunitaria y la capacidad de respuesta inmunitaria. Tales células pueden aislarse de células CD223⁺ usando anticuerpos y técnicas de separación conocidas en la técnica. Éstas incluyen pero no se limitan a cromatografía de inmunoafinidad, FACS, inmunoprecipitación, etc. Las células CD223⁺ pueden administrarse a pacientes con enfermedad autoinmunitaria, alergia o asma. En el caso de un paciente con enfermedad autoinmunitaria, las células puede preactivarse con autoantígeno. Las células CD223⁺ pueden transferirse de manera similar a pacientes con cáncer, pacientes con infección bacteriana o viral o pacientes con SIDA.

Un análisis comparativo de alineamientos de expresión génica de células T CD4⁺ específicas de antígeno que se diferencian o bien en un fenotipo efector/de memoria o bien regulador reveló la expresión específica de Treg de LAG-3, un homólogo de CD4 que se une a CMH de clase II. Las células T CD4⁺ LAG-3^{high} presentan actividad supresora *in vitro* y los anticuerpos frente a LAG-3 inhiben la supresión tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos hallazgos identifican a LAG-3 como un receptor específico de Treg o correceptor que modula la actividad supresora. La manipulación de células Treg a través de LAG-3 puede usarse por tanto para potenciar la inmunoterapia de enfermedades autoinmunitarias, cáncer y enfermedades infecciosas así como potenciar el injerto de linfocitos en prácticas de infusión de linfocitos de donantes, trasplante de médula ósea y transferencia adoptiva de células T.

CD223 es una molécula de la superficie celular específica de células T reguladoras que regula la función de las células T reguladoras. La función de una célula T reguladora puede potenciarse potenciando o aumentando la actividad de CD223, o aumentando el número de células CD223⁺ en una población de células T. La potenciación de la función de células T reguladoras en un organismo puede usarse para limitar la respuesta inmunitaria de células T en aquellas circunstancias en las que sea deseable una respuesta de ese tipo, tal como cuando un sujeto padece una enfermedad autoinmunitaria. A la inversa, la función de una célula T reguladora puede inhibirse inhibiendo la actividad de CD223 o disminuyendo el número de células CD223⁺ en una población de células T. La inhibición de la función de células T reguladoras en un organismo puede usarse para potenciar la respuesta inmunitaria de células T en aquellas circunstancias en las que sea deseable una respuesta de ese tipo, tal como en un paciente que padece cáncer, infección crónica o un receptor de un trasplante de médula ósea.

Cuando se trata un paciente con cáncer con un agente inhibidor que se une a la proteína CD223 o ARNm, puede coadministrarse opcionalmente una vacuna antitumoral. Tales vacunas pueden dirigirse a antígenos aislados o a grupos de antígenos o a células tumorales completas. Puede ser deseable administrar el agente inhibidor con

agentes quimioterápicos. No es necesario realizar el tratamiento con múltiples agentes usando una mezcla de agentes sino que puede realizarse usando preparaciones farmacéuticas separadas. No es necesario administrar las preparaciones en el mismo momento exacto, sino que puede coordinarse que se administren a un paciente durante el mismo periodo de tratamiento, es decir, en el plazo de una semana o un mes o cada dos. Por tanto, puede constituirse una composición que comprende dos principios activos en el cuerpo del paciente. Puede coordinarse cualquier tratamiento antitumoral adecuado con los tratamientos de la presente invención dirigidos a CD223. De manera similar, si se tratan pacientes con infecciones, pueden coordinarse otros agentes antiinfecciosos con el tratamiento de la presente invención dirigido a CD223. Tales agentes pueden ser fármacos de molécula pequeña, vacunas, anticuerpos, etc.

El número de células CD223⁺ en una población de células T puede modificarse usando un anticuerpo u otro agente que se una selectivamente a CD223. Las células CD223⁺ representan una población enriquecida de células T reguladoras que puede introducirse de vuelta en la fuente original de las células T o en otro huésped compatible para potenciar la función de las células T reguladoras. Alternativamente, las células CD223⁻ representan una población de células T deficientes en actividad de células T reguladoras que pueden reintroducirse en la fuente original de las células T u otro huésped compatible para inhibir o reducir la función de células T reguladoras a la vez que se conserva la actividad de células T generales.

Puede usarse cualquier medio deseado para o bien aumentar o bien disminuir (modular) la actividad de CD223 en los métodos de la invención. Esto incluye modular directamente la función de la proteína CD223, modular la transducción de señales de CD223 y modular la expresión de CD223 en células T modulando o bien la transcripción o bien la traducción o ambas. Estos medios que modulan selectivamente la actividad de CD223 se prefieren con respecto a moduladores no selectivos. Además, pueden preferirse aquellos medios inhibidores que crean una deficiencia en CD223 transitoria en una población de células T que luego vuelven a niveles normales de actividad de CD223, para tratar una deficiencia en células T temporal. Pueden usarse células T deficientes de manera transitoria para reconstituir una población de células T disminuida con células T que serán genéticamente normales con respecto a CD223. Una deficiencia de células T temporal de ese tipo se produce, por ejemplo, en pacientes que reciben una transferencia de células madre tras mioablación. Puede realizarse la modulación de la actividad de CD223 en células *in vitro* o en animales completos, *in vivo*. Pueden administrarse células que se tratan *in vitro* a un paciente, o bien la fuente original de las células o bien un individuo no relacionado.

Para inhibir la función de CD223, pueden usarse anticuerpos contra CD223 o inhibidores de molécula pequeña. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que son útiles para este fin serán aquellos que puedan unirse a CD223 y bloquear su capacidad para funcionar. Tales anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo Workman, C. J. *et al.*, "Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3)", *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263 (2002)), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, moléculas de CMH de clase II solubles, fragmentos de anticuerpo, etc.

Pueden obtenerse anticuerpos generados contra polipéptidos de CD223 mediante inyección directa de los polipéptidos de CD223 en un animal o administrando polipéptidos de CD223 a un animal, preferiblemente un ser no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá él mismo entonces a los polipéptidos de CD223. De esta manera, puede usarse incluso una secuencia que codifica para sólo un fragmento del polipéptido de CD223 para generar anticuerpos que se unen al polipéptido de CD223 nativo completo.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica de VEB-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, *et al.*, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss, Inc., págs. 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente estadounidense n.º 4.946.778) puede usarse fácilmente para producir anticuerpos monocatenarios frente a polipéptidos de CD223. Además, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados frente a polipéptidos de CD223 inmunogénicos.

Para potenciar o activar la función de CD223, puede usarse cualquier agente que aumente el nivel de CD223 o la actividad de CD223 existente en la célula T. Tales agentes pueden identificarse usando los ensayos de selección descritos a continuación. También pueden administrarse vectores de expresión que codifican para CD223 para aumentar la dosificación génica. Los vectores de expresión pueden ser vectores de plásmido o vectores virales, tal como se conocen en la técnica. Cualquier vector puede elegirse por el profesional por propiedades particularmente deseables.

Pueden prepararse *in vitro* composiciones que comprenden una mezcla de anticuerpos que se unen específicamente a CD223; y una vacuna contra el cáncer. Preferiblemente la composición se prepara en condiciones que hacen que sea adecuada para su uso como composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas

pueden ser estériles y libres de pirógenos. Los componentes de la composición también pueden administrarse por separado a un paciente en el plazo de un periodo de tiempo tal que se encuentren dentro del cuerpo del paciente al mismo tiempo. Tal administración separada en el tiempo conduce a la formación de la mezcla de anticuerpos y vacuna dentro del cuerpo del paciente. Si el anticuerpo y la vacuna van a administrarse de modo separado en el tiempo, pueden suministrarse juntos en un kit. Dentro del kit, los componentes pueden estar contenidos o envasarse por separado. También pueden suministrarse en el kit otros componentes tales como excipientes, portadores, otros adyuvantes o moduladores inmunitarios, instrucciones para la administración del anticuerpo y la vacuna y dispositivos de inyección. Las instrucciones pueden estar en forma escrita, de vídeo o audio, pueden estar contenidas en papel, un medio electrónico o incluso como una referencia a otra fuente, tal como un sitio web o manual de referencia.

Y pueden usarse anticuerpos contra CD223 para aumentar la magnitud de la respuesta contra el cáncer del paciente con cáncer a la vacuna contra el cáncer. También pueden usarse para aumentar el número de pacientes que responden en una población de pacientes con cáncer. Por tanto los anticuerpos pueden usarse para superar la supresión inmunitaria que se encuentra en pacientes que no responden a vacunas contra el cáncer. Las vacunas contra el cáncer pueden ser cualquiera que sea conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a vacunas de células tumorales completas, antígenos tumorales aislados o polipéptidos que comprenden uno o más epítomos de antígenos tumorales.

La expresión de CD223 en células T puede modularse a nivel transcripcional o traduccional. Pueden identificarse agentes que pueden producir tal modulación usando los ensayos de selección descritos a continuación.

Puede inhibirse la traducción de ARNm de CD223 usando ribozimas, moléculas antisentido, ARN de interferencia pequeño (ARNip; véase Elbashir, S. M. *et al.*, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells", *Nature* 411:494-498 (2001)) o inhibidores de molécula pequeña de este proceso que seleccionan como diana ARNm de CD223. Puede usarse la tecnología antisentido para controlar la expresión génica a través de la formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, basándose ambos métodos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante en 5' de la secuencia de polinucleótido, que codifica para los polipéptidos maduros de la presente invención, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de desde aproximadamente 10 hasta 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para ser complementario a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice, véanse Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science*, 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science*, 251: 1360 (1991)), impidiendo de ese modo la transcripción y la producción de CD223. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido de CD223 (antisentido, Okano, J. *Neurochem.*, 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla (1988)). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden suministrarse a células mediante constructos de expresión antisentido tales que el ARN o ADN antisentido o puede expresarse *in vivo* para inhibir la producción de CD223. Tales constructos se conocen bien en la técnica.

Pueden usarse constructos antisentido, oligonucleótidos antisentido, constructos de interferencia de ARN o moléculas de ARN en dúplex de ARNip para interferir en la expresión de CD223. Normalmente al menos 15, 17, 19 ó 21 nucleótidos del complemento de la secuencia de ARNm de CD223 son suficientes para una molécula antisentido. Normalmente al menos 19, 21, 22 ó 23 nucleótidos de CD223 son suficientes para una molécula de interferencia de ARN. Preferiblemente una molécula de interferencia de ARN tendrá una proyección en 3' de 2 nucleótidos. Si la molécula de interferencia de ARN se expresa en una célula a partir de un constructo, por ejemplo a partir de una molécula de horquilla o partir de una repetición invertida de la secuencia de CD223 deseada, entonces la maquinaria celular endógena creará las proyecciones. Pueden prepararse moléculas de ARNip mediante síntesis química, transcripción *in vitro* o digestión de ARNbc largo por ARNasa III o Dicer. Éstas pueden introducirse en células mediante transfección, electroporación u otros métodos conocidos en la técnica. Véanse Hannon, GJ, 2002, RNA Interference, *Nature* 418: 244-251; Bernstein E *et al.*, 2002, The rest is silence. *RNA* 7: 1509-1521; Hutvagner G *et al.*, RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genetics & Development* 12: 225-232; Brummelkamp, 2002, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553; Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li M-J, Ehsani A, Salvaterra P y Rossi J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells, *Nature Biotechnol.* 20:500-505; Miyagishi M y Taira K. (2002). U6-promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 20:497-500; Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ y Conklin DS. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Dev.* 16:948-958; Paul CP, Good PD, Winer I y Engelke DR. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnol.* 20:505-508; Sui G, Soohoo C, Affar E-B, Gay F, Shi Y, Forrester WC y Shi Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(6):5515-5520; Yu J-Y, DeRuiter SL y Turner DL. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9):6047-6052.

Además de los moduladores conocidos, pueden identificarse moduladores adicionales de la actividad de CD223 que son útiles en los métodos de la invención usando selecciones de dos híbridos, enfoques bioquímicos convencionales

y técnicas de selección basadas en células, tales como la selección de moléculas candidatas por una capacidad para unirse a CD223 o la selección de compuestos que inhiben la actividad de CD223 en cultivo celular. Como ejemplo, los inventores han identificado un hibridoma de células T CD4⁺ murino restringido a H-2A^k, específico de 48-62, de lisozima de huevo de gallina (HEL), 3A9 que no expresa CD223, ni siquiera tras la activación. La expresión ectópica de CD223 de tipo natural, pero no defectuoso para la señalización, redujo significativamente la respuesta de IL-2 de este hibridoma de células T a su péptido específico. Esto proporciona un sistema de ensayo *in vitro* sencillo para seleccionar moduladores de la actividad de CD223. Este último método puede identificar agentes que interaccionan directamente con y modulan CD223, así como agentes que modulan indirectamente la actividad de CD223 afectando a una etapa en la ruta de transducción de señales de CD223.

Los ensayos basados en células que emplean células que expresan CD223 pueden emplear células que se aíslan de mamíferos y que expresan de manera natural CD223. Alternativamente, pueden usarse células que se han modificado mediante ingeniería genética para expresar CD223. Preferiblemente, las células modificadas mediante ingeniería genética son células T.

Pueden identificarse agentes que modulan la actividad de CD223 modulando la expresión génica de CD223 en ensayos de selección basados en células midiendo las cantidades de la proteína CD223 en las células en presencia y ausencia de agentes candidatos. La proteína CD223 puede detectarse y medirse, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales específicos anti-CD223. También puede detectarse y medirse el ARNm de CD223 usando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a transferencia de tipo Northern, RT-PCR e hibridación de alineamientos.

Una secuencia diana particularmente útil para identificar moduladores de CD223 es el motivo de aminoácidos KIEELE (SEQ ID NO: 5) en el dominio citoplasmático de CD223 que es esencial para la función de CD223 *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos de selección para agentes que se unen a este motivo identificarán moduladores de CD223 candidatos cuya actividad como inhibidor o activador de CD223 puede caracterizarse adicionalmente a través de pruebas adicionales, tales como en ensayos basados en células. Este motivo puede estar contenido en un polipéptido que consiste en 50 o menos residuos de aminoácido contiguos de CD223. Alternativamente, el motivo puede estar contenido dentro de una proteína de fusión que comprende una parte de CD223 y la totalidad o una parte de una segunda proteína (distinta a CD223). La segunda proteína puede ser una proteína natural o puede ser un polipéptido sintético, que contiene por ejemplo una cola de histidina, u otra característica de polipéptido útil. Los ensayos de unión proteína-proteína se conocen bien en la técnica y puede usarse cualquiera de una variedad de técnicas y formatos.

CD223 puede procesarse de manera postraduccional para producir una forma soluble de la proteína. La forma soluble comprende al menos los residuos de aminoácido 1 a 431 de CD223 murina, y al menos los residuos de aminoácido 1 a 440 de CD223 humana. En cada caso falta la cola citoplasmática. También falta la totalidad o parte del dominio transmembrana. Esta forma soluble modula respuestas de células T restringidas para CMH de clase II/CD4⁺. Por tanto, la forma soluble puede ser útil para la administración a pacientes con enfermedad autoinmunitaria, pacientes con alergia, pacientes con asma o pacientes con cáncer, por ejemplo. La administración de la forma soluble puede ser mediante cualquier medio conveniente, incluyendo infusión, administración tópica o intravenosa.

Pueden administrarse inhibidores de CD223 a un organismo para aumentar el número de células T en el organismo. Este método puede ser útil para tratar organismos que padecen estados que dan como resultado una baja población de células T. Tales estados incluyen enfermedades que resultan de inmunodeficiencia tal como SIDA, así como trastornos que implican crecimiento o invasión celular no deseada, tal como invasión del cuerpo por microorganismos foráneos (bacterias o virus) o crecimiento de tumores o cáncer.

Una deficiencia de células T de este tipo es también un peligro esperado para pacientes que reciben una transferencia de células madre tras mioablación. Las células T de tales pacientes están comprometidas y seleccionadas como diana deliberadamente para su destrucción de modo que puedan sustituirse por células T de donante, sanas. El proceso de reconstituir una población de células T sanas a partir de una transferencia de células madre puede llevar varios meses, tiempo durante el cual el paciente es muy susceptible a infecciones oportunistas que pueden ser potencialmente mortales. Mediante la inhibición de CD223 en las células T de donante o usando células T de donante que se han seleccionado o modificado mediante ingeniería para una deficiencia en CD223, se potencia la división de células T y puede acelerarse el proceso de reconstitución de células T y puede reducirse el periodo de deficiencia en células T.

Los inhibidores de CD223 también pueden ser útiles cuando se administran en combinación con agentes terapéuticos convencionales para tratar trastornos sensibles a la proliferación de células T. Por ejemplo un tumor, que es un trastorno sensible a la proliferación de células T, se trata de manera convencional con un agente quimioterápico que funciona destruyendo células que se dividen rápidamente. Los inhibidores de CD223 de la invención cuando se administran junto con un agente quimioterápico potencian el efecto tumoricida del agente quimioterápico estimulando la proliferación de células T para potenciar el rechazo inmunológico de las células

tumorales.

5 Pueden administrarse potenciadores de la expresión o activadores de CD223 a un organismo para disminuir el número de células T en el organismo y disminuir de ese modo la actividad perjudicial de células T. Este método puede ser útil para tratar organismos que padecen estados que dan como resultado una población de células T anómalamente alta o actividad perjudicial de células T, por ejemplo rechazo de injertos mediado por células T del huésped, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias mediadas por células T tales como artritis reumatoide, diabetes tipo 1, esclerosis muscular, etc. Los métodos pueden aplicarse a cualquier organismo que contenga células T que expresen CD223. Esto incluye, pero no se limita a, cualquier mamífero y particularmente incluye seres humanos y ratones.

15 Cuando se llevan a cabo métodos de la invención *in vivo*, la cantidad eficaz de modulador de CD223 usada variará con el modulador particular que esté usándose, el estado particular que esté tratándose, la edad y el estado físico del sujeto que esté tratándose, la gravedad del estado, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede depender del grado en que un individuo tiene reducidos de forma anómala los niveles de células T.

20 Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener de forma rutinaria sal, agentes tamponantes, conservantes, portadores compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse de manera conveniente sales farmacéuticamente no aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Tales sales farmacológicas y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similares. Además, pueden prepararse sales farmacéuticamente aceptables como sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

30 Los moduladores de CD223 pueden combinarse, opcionalmente, con un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa una o más cargas, diluyentes o sustancias de encapsulación líquidos o sólidos compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano. El término "portador" indica un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden mezclarse conjuntamente con las moléculas de la presente invención, y unos con otros, de tal manera que no exista interacción que afectaría sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponantes adecuados, incluyendo: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

45 Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden de manera conveniente una preparación acuosa estéril del agente antiinflamatorio, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede formularse según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral, no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que puede emplearse se encuentran agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean de manera convencional aceites fijos como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo, insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Puede encontrarse una formulación de portador adecuada para administraciones orales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences; Mack Publishing Co., Easton, Pa.

60 Están disponibles una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, naturalmente, del fármaco particular seleccionado, la gravedad del estado que esté tratándose y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, en términos generales, pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Tales modos de administración incluyen las vías oral, rectal, tópica, nasal, interdérmica o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutáneo, intravenoso, intramuscular o infusión. Las vías intravenosa o intramuscular no son particularmente adecuadas para la profilaxis y terapia a largo plazo. Podrían preferirse, sin embargo, en situaciones de urgencia. Se preferirá la administración oral debido a la comodidad para el paciente así como el programa de

dosificación.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con un portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las composiciones se preparan poniendo, de manera uniforme e íntima, el principio activo en asociación con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto.

10 Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, que contienen cada una, una cantidad predeterminada del principio activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

15 Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación programada, liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar las administraciones repetidas del principio activo, aumentar la comodidad para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de liberación y los conocen los expertos habituales en la técnica. Incluyen sistemas de base polimérica tales como poli(láctida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas de Sylastic; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos sometidos a compresión que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el agente antiinflamatorio está contenido en una forma dentro de una matriz tal como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una tasa controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 3.832.253 y 3.854.480. Además, pueden usarse sistemas de administración de hardware basados en bombas, estando adaptados algunos de ellos para la implantación.

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de estados crónicos. Liberación a largo plazo, tal como se usa en el presente documento, significa que el implante se construye y se dispone para administrar niveles terapéuticos del principio activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo los conocen bien los expertos habituales en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1- Regulación negativa de homeostasis celular mediante LAG-3. (CD223)

El siguiente ejemplo muestra que LAG-3 (CD223) regula de manera negativa la homeostasis de células T CD4⁺ y CD8⁺, respaldando su identificación como diana terapéutica novedosa para acelerar el injerto de células T tras trasplante de médula ósea.

45 Los ratones C57BL/6 de tipo natural tienen un número constante de células T $\alpha\beta^+$ desde 4 hasta 52 semanas de edad. Tal como se notificó anteriormente, ratones LAG-3^{-/-} jóvenes de 4 semana de edad tienen números de células T normales. Miyazaki, T. *et al.*, Science 272: 405-408 (1996). En cambio, el número de células T $\alpha\beta^+$ en ratones LAG-3^{-/-} aumenta de manera constante a partir de 3 meses de edad hasta números ~2 veces superiores a los ratones de tipo natural. Esta diferencia es altamente significativa dada la estrecha regulación homeostática del número de células T $\alpha\beta^+$ demostrada por la desviación estándar muy baja. Se aumentaron las células tanto CD4⁺ como CD8⁺ en ratones LAG-3^{-/-} pero la razón CD4:CD8 permaneció inalterada. De manera similar, ratones LAG-3^{-/-} transgénicos para TCR OT-II (restringido para H-2A^b, específico para 326-339 de ovoalbúmina) tenían un número aumentado de células T CD4⁺ V α 2⁺ en comparación con ratones transgénicos OT-II control de tipo natural, excepto porque esas diferencias eran evidentes a las 5 semanas de edad. Aproximadamente el 20% de las células T $\alpha\beta^+$ y las células NK CD49b⁺ expresan constitutivamente LAG-3 en ratones de tipo natural (Workman, C.J. *et al.*, Eur. J. Immunol. 32: 2255-2263 (2002)), y sus números también aumentaron significativamente en ratones LAG-3^{-/-}. Sorprendentemente, varios otros tipos de células tales como células B B220⁺, granulocitos Gr-1⁺ y macrófagos Mac-1⁺, ninguno de los cuales expresan LAG-3, también aumentaron LAG-3^{-/-} en comparación con ratones control. Los números de células aumentados observados en ratones LAG-3^{-/-} concordaron con un aumento del ~50% en el número de células BrdU⁺ en división *in vivo*. Es importante observar que las diferencias en el número de células observadas entre ratones LAG-3^{-/-} y de tipo natural eran altamente sistemáticas y reproducibles. La ausencia de LAG-3 no pareció tener ningún efecto significativo sobre el fenotipo de superficie celular de células T de ratones LAG-3^{-/-}. Estos datos respaldan la idea de que LAG-3 regula el número de células T en ratones, y afecta indirectamente a los números de leucocitos en general.

Para determinar si LAG-3 influye sobre la expansión homeostática de células T en un entorno linfopénico, se transfirieron de manera adoptiva células T purificadas en ratones RAG^{-/-}, que carecen de células T y B, y se determinó el número de células T en el bazo 15 días tras la transferencia. Hubo un aumento de 2,8 veces en el número de células T LAG-3^{-/-} en comparación con el control de tipo natural. De manera notable, sólo un pequeño porcentaje de las células T de tipo natural expresaron LAG-3 a pesar del claro efecto que tiene la ausencia de LAG-3 sobre la expansión de células T. Esto sugiere que una expresión breve, transitoria, de LAG-3 puede ser suficiente para que ejerza su efecto sobre células en división. Se observó una expansión aumentada de células T CD4⁺ y CD8⁺ demostrando que ambos tipos de células se vieron afectados por igual por la ausencia de LAG-3. De manera interesante, también hubo un aumento de dos veces en el número de células derivadas de huésped $\alpha\beta^+$ en receptores de células T LAG-3^{-/-} frente a LAG-3^{+/+}. Esto concordó con el número aumentado de macrófagos y granulocitos observado en ratones LAG-3^{-/-} no manipulados. Para garantizar que expansión aumentada de células T LAG-3^{-/-} observada en ratones RAG^{-/-} es independiente de la especificidad del antígeno, se usaron células T purificadas a partir de ratones transgénicos OVA [restringido para H-2k^b, específico para 257-264 de ovoalbúmina; Hogquist, K.A. *et al.*, Cell 76: 17-27 (1994)] y OT-II [restringido para H-2A^b, específico para 326-339 de ovoalbúmina; Barnden, M.J. *et al.*, Immunol. Cell Biol. 76: 34-40 (1998)]. Las células T CD4⁺ V α 2⁺ OT-II de tipo natural se expandieron escasamente en ratones RAG^{-/-}, lo que concuerda con informes anteriores que indicaban que estas células muestran poca expansión homeostática en huéspedes linfopénicos. Ernst, B. *et al.*, Immunity 11: 173-181 (1999). En cambio, esta limitación no se aplicó a células T de ratones transgénicos OT-II LAG-3^{-/-}, que se expandieron vigorosamente en huéspedes linfopénicos hasta números que fueron 3,2 veces superiores a los de células T de tipo natural a los 15 días tras la transferencia. De manera similar, el número de células T transgénicas OVA LAG-3^{-/-} CD8⁺ V α 2⁺ recuperadas de ratones RAG-1^{-/-} fue 4 veces superior a las células T OVA control de tipo natural. De manera notable, esta diferencia persistió durante al menos un mes tras la transferencia. Estos datos demostraron de nuevo que células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ se ven afectadas por igual por la pérdida de LAG-3. Para evaluar la importancia del ligamiento de LAG-3 por moléculas de CMH de clase II, se transfirieron células T transgénicas OVA LAG-3^{-/-} y de tipo natural en ratones que carecían de moléculas de CMH tanto de clase I como de clase II (β 2m^{-/-} x H-2A β b^{-/-}). Los datos muestran claramente que la expansión potenciada de células T LAG-3^{-/-} se ve abolida en ausencia de moléculas de CMH de clase II, demostrando la importancia de esta interacción.

Los ratones LAG-3^{-/-} o receptores adoptivos de células T LAG-3^{-/-} tienen números aumentados de células que son normalmente negativas para LAG-3, tales como células B y macrófagos. Esto respalda la idea de que una alteración en el control homeostático de células T, debido a la ausencia de LAG-3, altera directamente el control de otros tipos celulares de leucocitos. Para someter esto a prueba directamente, se transfirieron conjuntamente células B con células T o bien LAG-3^{-/-} o bien de tipo natural en ratones RAG^{-/-}. También se aprovechó este enfoque para evaluar los papeles opuestos de moléculas de CMH de clase II en la regulación de la homeostasis de células T. Estudios anteriores han demostrado claramente que la expansión homeostática y la supervivencia a largo plazo de células T CD4⁺ requieren la interacción periódica con moléculas de CMH de clase II. Takeda, S. *et al.*, Immunity 5: 217-228 (1996); Rooke, R., *et al.*, Immunity 7: 123-134 (1997). En cambio, es posible que la interacción entre LAG-3 y moléculas de CMH de clase II tenga el efecto opuesto. Tal como se observó anteriormente, hubo un aumento de 3,0 veces en el número de células T LAG-3^{-/-} en comparación con el control de tipo natural cuando se les transfirieron células B CMH de clase II^{-/-}. Sin embargo en presencia de células B de tipo natural, la diferencia entre los números de células T LAG-3^{-/-} y LAG-3^{+/+} aumentaron hasta 4,9 veces. El número de células T LAG-3^{-/-} aumentado se debe probablemente a una interacción CMH:TCR aumentada, potenciando así la expansión. En cambio, las células T LAG-3^{+/+} se someterán a un control homeostático tanto positivo (mediante interacción CMH:TCR) como negativo (mediante interacción CMH:LAG-3) que da como resultado una expansión comparable de células T de tipo natural.

En presencia de células T de tipo natural, el número de células B recuperadas del bazo 7 días tras la transferencia fue idéntico a ratones que recibieron células B solas. En cambio, hubo un aumento de 2,7 veces en el número de células B recuperadas de receptores de células T LAG-3^{-/-}, proporcionando una demostración directa de que el número de células B aumentado se debía a la "desregulación" de células T LAG-3^{-/-}. De manera interesante, hubo un aumento en el número de células B CMH de clase II^{-/-} en presencia de células T de tipo natural en comparación con ratones que recibieron células B solas. Esto respalda la idea de que la ausencia "local" de interacción LAG-3:CMH de clase II puede dar como resultado una expansión de células B aumentada debida a una desregulación transitoria de células T de tipo natural aunque los ratones RAG^{-/-} receptores tengan células dendríticas y macrófagos CMH de clase II⁺ en el bazo. Una posibilidad alternativa es que el ligamiento de moléculas de CMH de clase II mediante LAG-3 suministre una señal reguladora negativa a células B evitando de ese modo la expansión. Aunque esto es verosímil para células B, no explicaría los números aumentados de células CMH de clase II^{-/-}, tales como granulocitos, en ratones LAG-3^{-/-}. Una posibilidad, que se está investigando actualmente, es que la expansión desregulada de células T LAG-3^{-/-} da como resultado su producción de citocinas que inducen la amplia expansión de muchos tipos de células.

La influencia de la expresión de LAG-3 sobre la expansión homeostática en ratones linfopénicos no se limita a células T vírgenes. La transferencia de células T OT-II "de memoria" que se han expuesto a antígeno también dio como resultado una expansión sustancialmente acelerada de células T LAG-3^{-/-} en comparación con las células control de tipo natural [7,2 veces]. Fue importante verificar que LAG-3 era directamente responsable de esta

expansión de células T “desregulada” y no un gen estrechamente vinculado que se alteraba mediante la estrategia de direccionamiento original. Por tanto, se transdujeron células T OT-II LAG-3^{-/-} con retrovirus basado en virus de células madre murino (MSCV) que contenía o bien LAG-3 de tipo natural o bien un mutante defectuoso para la señalización, LAG-3.ΔK^M. Workman, C.J. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 32: 2255-2263 (2002). El vector también contenía un casete de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y proteína verde fluorescente (GFP) para facilitar el análisis de células transducidas. Persons, D.A. *et al.*, *Blood* 90: 1777-1786 (1997). También se transdujeron células T OT-II LAG-3^{-/-} y LAG-3^{+/+} con un control de vector “vacío”/GFP solo. Se transfirieron células transducidas a receptores RAG-1^{-/-} y se determinó el número de células T OT-II recuperadas 15 días tras la transferencia. Tal como se esperaba, las células T control con GFP LAG-3^{-/-} solo se expandieron más que las células con GFP de tipo natural [2,8 veces]. La expresión ectópica de LAG-3 redujo el número de células T OT-II hasta un nivel comparable con el control de tipo natural, mientras que la expresión del mutante defectuoso para la señalización de LAG-3 no tuvo ningún efecto sobre la expansión homeostática. Estos datos demuestran que LAG-3 es directamente responsable de los efectos observados.

Estos datos muestran claramente que LAG-3 regula de manera negativa la expansión homeostática de células T. También respaldan la idea de que las células T pueden contribuir a la homeostasis de muchos tipos de células. A pesar del claro efecto que tuvo la ausencia de LAG-3 sobre los números de células T en ratones deficientes y la expansión de células T en ratones linfopénicos, fue notable que sólo un porcentaje muy pequeño de células T expresaran LAG-3. De manera interesante, la expresión ectópica de LAG-3 sobre todas las células T no tuvo un efecto sobre la expansión homeostática mayor que la expresión transitoria, de nivel bajo, de LAG-3 observada sobre células de tipo natural. Esto sugiere que el umbral para la señalización de LAG-3 puede ser muy bajo, y que puede haber otros factores que limitan el efecto de la señalización de LAG-3. Identificar la(s) molécula(s) de señalización posterior(es) que interacciona(n) con LAG-3 y determinar el mecanismo mediante el cual LAG-3 regula la expansión homeostática será claramente un centro de atención importante de la investigación futura.

Una observación sorprendente fue el número aumentado de células que no expresan LAG-3, tales como células B y macrófagos. Experimentos de transferencia conjunta demostraron claramente que la ausencia de LAG-3 en células T era responsable del aumento en otros tipos de células observados. Esto puede deberse a una proteína soluble o de superficie celular que o bien se induce por la señalización de LAG-3 que limita el número y/o la expansión de otros tipos de células o bien se produce debido a la ausencia de regulación negativa por LAG-3 que limita el número y/o la expansión de otros tipos de células. Siguen teniendo que determinarse la naturaleza precisa de esta expansión inespecífica y su papel fisiológico.

Los pacientes que reciben trasplantes de médula ósea o de células madre en megadosis son particularmente propensos a infecciones en los 4-6 primeros meses debido a la lenta tasa de reconstitución de linfocitos. Estos estudios soportan la idea de que LAG-3 es una diana terapéutica viable y que bloquear la expresión o la función de LAG-3 acelerará el injerto de células T y reducirá significativamente este intervalo de propensión.

Ejemplo 2 - Materiales y métodos

Este ejemplo proporciona los métodos experimentales y materiales para el ejemplo 1.

Ratones: Se usaron los siguientes ratones: LAG-3^{-/-} [obtenidos de Yueh-Hsiu Chen, Stanford University, Palo Alto, CA, con autorización de Christophe Benoist y Diane Mathis, Joslin Diabetes Center, Boston, MA; Miyazaki, T. *et al.*, *Science* 272: 405-408 (1996)]; C57BL/6J [Jackson Labs, Bar Harbor, ME]; B6.PL-*Thy1^a/Cy* (*Thy1.1* congénicos) [Jackson Labs]; RAG-1^{-/-} [Jackson Labs, Bar Harbor, ME; Mombaerts, P. *et al.*, *Cell* 68: 869-877 (1992)]; CMH de clase II^{-/-} [proporcionados por Peter Doherty, St. Jude Children’s Research Hospital, Memphis, TN; Grusby, M.J. *et al.*, *Science* 253: 1417-1420 (1991)]; CMH de clase I^{-/-}/II^{-/-} [Taconic, Germantown, NY; Grusby, M.J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3913-3917 (1993)]; ratones transgénicos para TCR OT-II [proporcionados por Stephen Schoenberger, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA, con autorización de William Heath, Walter and Eliza Hall Institute, Parkville, Victoria Australia; Barnden, M.J. *et al.*, *Immunol. Cell Biol.* 76: 34-40 (1998)] y ratones transgénicos para TCR OT-I (OVA) [Jackson Labs; Hogquist, K.A. *et al.*, *Cell* 76: 17-27 (1994)]. Análisis de microsatélites en todo el genoma demostraron que el 97% de los 88 marcadores genéticos sometidos a prueba para los ratones LAG-3^{-/-} se derivaban de ratones B6 (Charles River Laboratories, Troy, NY). Se mantuvieron colonias LAG-3^{-/-}, CMH de clase II^{-/-}, OT-I.LAG-3^{-/-} y OT-II.LAG-3^{-/-} en el St. Jude Animal Resource Center. Todos los experimentos con animales se realizaron en una instalación SPF, acreditada por la AAALAC, siguiendo las directrices nacionales, estatales e institucionales. Los protocolos para animales se aprobaron por el St. Jude IACUC.

Constructos de LAG-3 y transducción retroviral: Se produjeron constructos de LAG-3 usando PCR recombinante tal como se describe (Vignali, D.A.A. y K. M. Vignali, *J. Immunol.* 162: 1431-1439 (1999)). Se han descrito LAG-3.WT y LAG-3.ΔK^M (LAG-3 con una delección del motivo KIEELE conservado en la cola citoplasmática) (Workman, C.J. *et al.*, *J. Immunol.* 169: 5392-5395 (2002)). Se clonaron constructos de LAG-3 en un vector retroviral basado en virus de células madre murino (MSCV), que contenía un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y proteína verde fluorescente (GFP), y retrovirus producido tal como se describe (Persons, D.A. *et al.*, *Blood* 90: 1777-1786 (1997); Persons, D.A. *et al.*, *Blood Cells Mol Dis.* 24: 167-182 (1998)). Se generaron líneas celulares productoras de

retrovirus transduciendo repetidamente células GPE+86 (7-10) veces hasta que se obtuvo un título viral superior a 10^5 /ml tras 24 h (Markowitz, D. *et al.*, J Virol. 62: 1120-1124 (1988)).

Citometría de flujo: Se realizaron suspensiones de células individuales a partir de bazos y RBC sometidos a lisis con disolución de Gey. En primer lugar se tiñeron esplenocitos con Fc Block, anticuerpo anti-CD16/CD32 (2.4G2) (BD PharMingen, San Diego, CA) durante 10 min. sobre hielo. Entonces se tiñeron las células para detectar los siguientes marcadores de superficie celular usando diversos anticuerpos conjugados de BD PharMingen: TCR $\alpha\beta^+$ (H-57-597), $V\alpha 2$ (B20.1), $\gamma\delta$ TCR (GL3), CD4 (RM4-4), CD8a (53-6.7), CD45R/B220 (RA3-6B2), CD11b/Mac1 (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5), CD44 (IM7), CD25/IL2R (7D4), CD69 (H1.2F3) y CD244.2/células NK (2B4). Se evaluó la expresión de LAG-3 con un AcM de rata biotinilado anti-LAG-3 (C9B7W, IgG1 κ ; Workman, C.J. *et al.*, Eur. J. Immunol. 32: 2255-2263 (2002)) o el mismo anticuerpo obtenido como conjugado con PE (BD PharMingen). Entonces se analizaron las células mediante citometría de flujo (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Incorporación de bromodesoxiuridina: A las 5, 16, 28 y 52 semanas de edad, a ratones LAG-3^{+/+}, LAG-3^{-/-}, OTII.LAG-3^{+/+} y OTII.LAG-3^{-/-} se les administró BrdU (Sigma, St. Louis, MO) en su agua para beber durante 8 días (0,8 mg/ml). Entonces se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂ y se extirparon los bazos. Se realizó la tinción para determinar la incorporación de BrdU tal como se describe (Flynn, K.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 8597-8602 (1999)). En resumen, se tiñeron los esplenocitos LAG-3^{-/-} y LAG-3^{+/+} para detectar la expresión de TCR $\alpha\beta$, CD4, CD8 y B220. Se tiñeron los esplenocitos OTII.LAG-3^{+/+} y OTII.LAG-3^{-/-} para detectar la expresión de $V\alpha 2$ y CD4 (PharMingen). Entonces se fijaron las células con 1,2 ml de etanol al 95% helado durante 30 min. sobre hielo. Se lavaron las células y se permeabilizaron con PBS + paraformaldehído al 1% + Tween 20 al 0,01% durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las células y se incubaron con 50 KU de ADNasa (Sigma) en NaCl 0,15 M + MgCl₂ 4,2 mM pH 5,0 durante 10 min. a 37°C. Se detectó BrdU mediante la adición de anticuerpo anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson) durante 30 min. a TA y después se analizó mediante citometría de flujo.

Experimentos de transferencia adoptiva: O bien se clasificaron positivamente mediante FACS células T y/o células B de esplenocitos o bien se clasificaron negativamente mediante clasificación celular en perlas magnéticas (MACS). Para purificaciones mediante FACS, se tiñeron esplenocitos para detectar la expresión de TCR $\alpha\beta$, CD4 y CD8 y se clasificaron mediante selección positiva en un instrumento MoFlow (Cytomation, Ft. Collins, CO). Para la purificación mediante MACS negativa, se tiñeron esplenocitos con anticuerpo acoplado a PE anti-B220, anti-Gr1 anti-Mac1, anti-TBR119 (eritrocitos), anti-CD244.2 (células NK) y anti-CD8 (para la purificación negativa de células T transgénicas OTII). Entonces se incubaron las células con perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-PE (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y después se clasificaron negativamente en un instrumento autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) hasta una pureza del 90-95%. En algunos experimentos, se marcaron células T con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Se lavaron las células dos veces con PBS, se resuspendieron en PBS más BSA al 0,1% a 1×10^7 células/ml y se incubaron con CFSE 5 μ M durante 10 min. a 37°C. Se lavaron las células dos veces con PBS más BSA al 0,1%. Las células T marcadas con CFSE o no marcadas, purificadas (5×10^6 ó 1×10^7) y en algunos casos células B (5×10^6) se inyectaron i.v. en ratones RAG-1^{-/-} o They 1.1⁺ (B6.PL).

Transducción retroviral de células T normales: Se extirparon bazos de ratones OTII.LAG-3^{+/+} y OTII.LAG3^{-/-} y se prepararon suspensiones de células individuales a $2,5 \times 10^6$ célula/ml. Se activaron los esplenocitos con péptido 326-339 de OVA [10 μ M] en cultivo durante dos días. Entonces se incubaron los esplenocitos activados sobre una monocapa de células productoras de retrovirus con GFP sola, LAG-3.WT/GFP o LAG-3. ΔK^M /GFP durante 2 días en presencia de Polybrene. Se dejaron reposar las células durante 10 días y después se clasificaron para detectar la expresión de $V\alpha 2^+$ /CD4⁺/GFP⁺ mediante FACS. Se dejaron reposar las células durante dos días adicionales y después se inyectaron 5×10^6 células en ratones RAG^{-/-} a través de la vena de la cola. Quince días tras la transferencia, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂ y se extirparon los bazos. Se tiñeron los esplenocitos y se analizaron mediante citometría de flujo.

Ejemplo 3 – Células Treg inducidas con potente actividad reguladora

Con el fin de identificar moléculas específicas Treg, se realizó un análisis de expresión génica diferencial de células T específicas de antígeno que se diferenciaban o bien en células efectoras/de memoria en respuesta a infección viral o bien en células Treg tras encontrarse con antígeno del mismo origen como autoantígeno. Este análisis reveló que el gen de LAG-3 estaba regulado por incremento selectivamente en células Treg. El papel fisiológico de LAG-3, un homólogo de CD4 de unión a CMH de clase II, aún no se ha esclarecido claramente. Varios estudios *in vitro* han sugerido que LAG-3 puede tener una función reguladora negativa (Hannier *et al.*, 1998; Huard *et al.*, 1994; Workman *et al.*, 2002a; Workman *et al.*, 2002b). En este caso se muestra que la expresión en membrana de LAG-3 marca selectivamente células Treg independientemente de CD25 y que LAG-3 modula la actividad supresora tanto *in vitro* como *in vivo* de células Treg.

Con el fin de estudiar diferencias entre la inducción de tolerancia y efectora/de memoria de células T, se ha usado la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ transgénicas para receptor de células T (TCR) (clon 6.5) específicas para un modelo antígeno - hemaglutinina (HA). En ratones de tipo natural infectados con virus vaccinia que expresa HA recombinante (Vac-HA), las células CD4⁺ 6.5 específicas de HA transferidas de manera adoptiva se diferencian para

dar células efectoras/de memoria tras encontrarse con HA. La respuesta efectora/de memoria se caracteriza por una fase de expansión/contracción típica y el desarrollo de marcadores de memoria. Cuando se extraen del animal sometido a transferencia adoptiva, estas células efectoras/de memoria son hipersensibles a HA *in vitro* con respecto a células T CD4⁺ 6.5 vírgenes tal como se somete a ensayo mediante respuesta proliferativa específica de antígeno y producción de interferón γ . Esta respuesta de memoria persiste durante meses tras la transferencia adoptiva. En cambio, la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ 6.5 en ratones transgénicos C3-HA, que expresan HA en múltiples tejidos epiteliales, da como resultado tolerancia (Adler *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 1998). De manera similar a la respuesta efectora/de memoria, hay una fase de expansión/activación rápida caracterizada por la proliferación y expresión de citocinas efectoras, tales como interferón γ . Sin embargo, tras la fase de activación, la combinación de células T específicas de HA total se contrae y las células 6.5 residuales no logran producir interferón γ o proliferar *in vitro* tras la estimulación con antígeno 4-7 días tras la transferencia adoptiva (Adler *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003). La extinción de la capacidad para producir linfocinas tales como IL-2 e interferón γ y proliferar en respuesta a antígeno representa la definición operativa estándar del fenotipo anérgico.

La intensidad de la fase efectora *in vivo* inicial en ratones C3-HA que precede a la inducción de tolerancia, es proporcional al número de células T CD4⁺ 6.5 transferidas de manera adoptiva así como al nivel de expresión de antígeno HA en los ratones receptores. Así, los ratones C3-HA^{low} toleran la transferencia de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ 6.5 bastante bien, pero los ratones C3-HA^{high}, que tienen una expresión de HA 1000 veces superior a la de ratones C3-HA^{low}, mueren en el plazo de 4-7 días tras la transferencia de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ 6.5 (figura 1A). La causa de muerte es vasculitis pulmonar letal debida a infiltración de células T CD4⁺ 6.5 transgénicas en el pulmón, en el que la expresión de HA es la más alta. La transferencia adoptiva de menos de $2,5 \times 10^5$ células T CD4⁺ 6.5 en ratones C3-HA^{high} provoca vasculitis pulmonar de menor intensidad y los receptores sobreviven (figura 1A) (Huang *et al.*, 2003). De manera interesante, las células T CD4⁺ 6.5 transferidas a una dosis inferior a la letal adquieren un fenotipo regulador ya que pueden proteger a ratones frente a la muerte tras la infusión posterior de lo que sería una dosis letal de células T CD4⁺ 6.5 en ratones C3-HA^{high} no protegidos. Esta función reguladora *in vivo* es extremadamente potente, ya que la transferencia de tan sólo 8.000 células (el 0,3% de la dosis letal) protegerá completamente a animales frente a la muerte tras la infusión posterior de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ 6.5 vírgenes. Se observa protección ya a los 4 días tras la transferencia inicial y permanece activa hasta 6 meses (figura 1A). La depleción de células T CD4⁺, pero no de células T CD8⁺, antes de la transferencia adoptiva elimina totalmente el efecto protector, definiendo de ese modo el fenotipo Treg de células T CD4⁺ 6.5 clonotípicas anergizadas.

La supresión de neumonitis letal va acompañada por una acumulación de las células T 6.5 (Treg) introducidas iniciales en los pulmones y una drástica reducción en el número de células T efectoras infiltrantes de la segunda infusión. En vez de acumularse en los pulmones, como sucede en ausencia de células Treg, las células T efectoras se acumulan en la vaina linfática periarteriolar esplénica (figura 1B). Evidencias adicionales de que las células anérgicas demuestran una función Treg proceden del hallazgo de que inhiben la activación de células T CD8⁺ específicas de HA citotóxicas *in vivo* (datos no mostrados). La eliminación de células T CD25⁺ antes de la primera transferencia adoptiva (protectora) no afectó al desarrollo de células Treg que pueden proteger a animales frente a una exposición letal posterior de células T 6.5. Por tanto, es probable que el fenotipo Treg de las células T introducidas iniciales se adquirió tras la transferencia adoptiva al contrario que ser una consecuencia de células Treg que se producen de manera natural entre la población transferida de manera adoptiva. Estos hallazgos son altamente compatible con los hallazgos publicados de Von Boehmer y colaboradores, que demostraron que células T CD4⁺ 6.5 se volvieron tolerantes tras la transferencia en ratones transgénicos que expresaban HA en el compartimento de células B de hecho mostraban función Treg (Jooss *et al.*, 2001).

Ejemplo 4 – LAG-3 se expresa de manera diferencial en células Treg inducidas

Con el fin de identificar genes asociados con el fenotipo anérgico/Treg en el presente sistema *in vivo*, se realizó un análisis en chip Affymetrix con células T CD4⁺ 6.5 purificadas o bien tras transferencia adoptiva en receptores no transgénicos seguida por inmunización con Vac-HA para generar células T efectoras/de memoria o bien tras transferencia en ratones C3-HA^{high} para generar células anérgicas/Treg. Se purificaron células T 6.5 congénicas Thy1.1(+)/Thy1.2(-) a partir de receptores C3HA^{high} (anérgicos/Treg) o de tipo natural (efectores/de memoria) infectados con Vac-HA Thy1.1(-)/Thy1.2(+) usando un procedimiento de aislamiento secuencial que implicaba depleción en columna de MACS de células T CD8⁺, células B y células T Thy 1.2(+) seguido por clasificación mediante citometría de flujo hasta una pureza de >95%. Este protocolo evita el uso de anticuerpos específicos de TCR o específicos de receptor conjunto de CD4 que pueden alterar posiblemente los patrones de expresión génica dependientes de TCR o de CD4.

Se aisló ARN a partir de células T CD4⁺ 6.5 vírgenes como muestra de día 0 y se aisló a partir de células T CD4⁺ 6.5 en los días 2, 3 y 4 tras la transferencia adoptiva para análisis en chip. Genes que se expresaron diferencialmente entre poblaciones anérgicas/Treg y poblaciones efectoras/de memoria se ordenaron por rangos según un algoritmo que sumó su expresión diferencial de los días 0-4. Un número sorprendentemente grande de genes se activaron selectivamente en poblaciones anérgicas/Treg incluso en estos puntos de tiempo tempranos tras la transferencia adoptiva. Muchos de estos genes representaron EST sin función conocida. Entre los genes que se habían identificado anteriormente, LAG-3 estaba entre los más expresados diferencialmente en poblaciones anérgicas/Treg

con respecto a poblaciones efectoras/de memoria. Este resultado se validó posteriormente mediante análisis de RT-PCR cuantitativa con un par de cebador-sonda de LAG-3 para diversos puntos de tiempo prolongados hasta 1 mes tras la transferencia adoptiva. Tras un aumento inicial mínimo en las células efectoras/de memoria, la expresión de LAG-3 vuelve al nivel inicial a los 20 días tras la transferencia adoptiva. En marcado contraste, la expresión de LAG-3 aumenta 20-50 veces a lo largo de los 5 primeros días entre poblaciones celulares anérgicas/Treg y permanece alta a lo largo del análisis de 4 semanas posterior (figura 2A). En cambio, los niveles de FoxP3, GITR y CTLA-4 mostraron moderados aumentos (1,5-4 veces) que fueron similares tanto en células efectoras/de memoria como en las células anérgicas/Treg inducidas a lo largo de los 4-5 primeros días (datos no mostrados).

Entonces se analizó la expresión en la superficie celular de LAG-3 en poblaciones de células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg con respecto a células T CD4⁺ 6.5 efectoras/de memoria usando un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 (Workman *et al.*, 2002b) (figura 2B). Aunque hay niveles muy bajos de tinción de LAG-3 en células efectoras/de memoria, una proporción significativa de células anérgicas/Treg de ratones transgénicos C3-HA^{high} presentan niveles de moderados a altos de tinción de LAG-3, lo que se correlaciona con los resultados de expresión génica. Dado que IL-10 está comúnmente asociada con la diferenciación y función de Treg (Moore *et al.*, 2001), se analizaron los niveles endógenos de ARNm de IL-10 y su correlación con los niveles de ARNm de LAG-3 en subconjuntos de células T CD4⁺ a partir de ratones transgénicos C3-HA^{high} (células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg). El análisis de múltiples muestras de poblaciones anérgicas/Treg a lo largo de muchos experimentos reveló una correlación entre el nivel de ARNm de LAG-3 y el nivel de ARNm de IL-10 con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,87 (figura 2C).

Ejemplo 5 – Se requiere LAG-3 para una función Treg máxima

Se analizó la expresión en la superficie celular de LAG-3 y CD25 en poblaciones de células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg de manera coordinada usando anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 y anti-CD25. Aunque proporciones similares de células efectoras/de memoria y anérgicas/Treg expresan CD25 (datos no mostrados), la expresión de LAG-3 y CD25 en células anérgicas/Treg no concordaba completamente (figura 3A). Por tanto se clasificaron las células en poblaciones LAG-3^{high}CD25^{high}, LAG-3^{high}CD25^{low}, LAG-3^{low}CD25^{high} y LAG-3^{low}CD25^{low} y se analizó su actividad reguladora en un ensayo de supresión *in vitro* convencional. La supresión *in vitro* de respuestas proliferativas entre células CD4⁺ 6.5 vírgenes mostró que la población LAG-3^{high}CD25^{high} presentaba la mayor actividad supresora y la población LAG-3^{low}CD25^{low} tenía la menor, mientras que la actividad supresora de las células LAG-3^{high}CD25^{low} y LAG-3^{low}CD25^{high} era comparable (figura 3B). Estos resultados sugieren que, entre las células Treg inducidas, la combinación de LAG-3 y CD25 puede marcar las células Treg con la mayor actividad supresora.

Para evaluar adicionalmente el papel directo de LAG-3 en la regulación de la supresión mediante células Treg inducidas, se determinó en primer lugar si anticuerpos anti-LAG-3 podían bloquear la capacidad de células que expresan LAG-3 para suprimir las respuestas proliferativas *in vitro* de células T específicas de HA vírgenes. Los anticuerpos anti-LAG-3 a la concentración de 2 µg/ml inhiben la supresión mediante células T CD4⁺ 6.5 Treg en el sistema de ensayo *in vitro* (figura 4). A lo largo del periodo de ensayo de 2 días, los anticuerpos anti-LAG-3 no afectaron a las respuestas proliferativas de células T 6.5 estimuladas en ausencia de Treg, confirmando que el efecto de anticuerpos anti-LAG-3 era de hecho sobre las células Treg y no las células efectoras (datos no mostrados). La capacidad de anticuerpos anti-LAG-3 para bloquear la supresión *in vitro* mediante células Treg demuestra que LAG-3 no es simplemente un marcador selectivo de células Treg, sino que es una molécula que modula la actividad Treg.

Ejemplo 6 – Se requiere LAG para actividad Treg inducida *in vivo*

A continuación se evaluó el papel de LAG-3 en la modulación de la función Treg *in vivo* determinando si la administración de anticuerpos anti-LAG-3 podía bloquear la supresión de neumonitis letal mediante células Treg en ratones C3-HA^{high}. Se trataron previamente ratones C3-HA^{high} con 8.000 (dosis inferior a la letal) de células T CD4⁺ 6.5 seguido por una dosis posterior de 2,5X10⁶ células T CD4⁺ 6.5 vírgenes 4 días tras la primera transferencia. Tal como se describió anteriormente, en este punto ya se han desarrollado células Treg. Se administró anticuerpo anti-LAG-3 (200 µg) i.v. junto con la exposición posterior de 2,5X10⁶ células 6.5 y se administraron otros 200 µg 2 días después. Este tratamiento con anticuerpo elimina totalmente la actividad supresora *in vivo* de las células Treg y los ratones murieron en un marco temporal comparable a los ratones C3-HA^{high} sometidos a exposición letal sin tratamiento previo con células 6.5 con dosis inferior a la letal protector. Por el contrario, ratones con células Treg establecidas tratadas con anticuerpo de control de isotipo (IgG1 de rata) o sin anticuerpo sobrevivieron a una exposición posterior con 2,5X10⁶ células T 6.5 vírgenes (figura 5A). Aunque estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-LAG-3 bloqueaban la actividad Treg *in vivo*, una posibilidad formal alternativa era que, en vez de inhibir directamente las células Treg, los anticuerpos anti-LAG-3 hiperactivaron las células T en la población de exposición de tal manera que superaron los efectos inhibidores de las células Treg. Para descartar esta posibilidad, se planteó la cuestión de si la administración *in vivo* de anticuerpos anti-LAG-3 junto con una dosis de células T 6.5 justo por debajo del umbral de letalidad provocaría letalidad en ausencia de una población Treg previamente establecida. Por tanto, se administraron 2,5x10⁵ células T 6.5 (la dosis máxima que no provocará letalidad) u 8,0x10⁵ células T 6.5 (una letalidad de aproximadamente el 50% entre 7 y 14 días tras la transferencia) en ratones C3-HA^{high}

junto con anticuerpos anti-LAG-3 o control de isotipo. La figura 5B demuestra que el tratamiento con anticuerpo anti-LAG-3 no hizo que la dosis de $2,5 \times 10^5$ células T 6.5 fuera letal ni potenció la letalidad parcial de la dosis de $8,0 \times 10^5$ células T 6.5. Por tanto, el efecto de los anticuerpos anti-LAG-3 en el experimento en la figura 5A era inhibir directamente las células Treg.

5

Ejemplo 7 – LAG-3 se expresa por células Treg naturales y se requiere para la actividad supresora

Tomados en conjunto, estos datos confirman un papel importante para LAG-3 en la mediación en la función supresora de células Treg inducidas. Dado que la relación entre células Treg inducidas y células Treg naturales sigue sin estar clara, era interesante ver si LAG-3 se expresaba selectivamente en células T $CD4^+CD25^+$ de ratones de tipo natural. El ARNm de LAG-3 (junto con ARNm de CTLA-4, FoxP3 y GITR) se expresa de hecho selectivamente en células $CD4^+CD25^+$ en comparación con células $CD4^+CD25^-$ (figura 6A). A pesar de este hallazgo reproducible, no pudo detectarse LAG-3 en la superficie ni en células $CD4^+CD25^+$ ni en células $CD4^+CD25^-$ mediante tinción con anticuerpo. Sin embargo, la tinción con anticuerpo de células permeabilizadas indicó claramente que el 10-20% de las células $CD4^+CD25^+$ expresaron depósitos intracelulares de LAG-3. En cambio la tinción de células $CD4^+CD25^-$ permeabilizadas no demostró absolutamente ninguna población LAG-3⁺ (figura 6B). Estos hallazgos sugirieron que al menos algunas células Treg naturales presentan depósitos intracelulares de LAG-3 que podían reclutarse rápidamente en la superficie celular tras encontrarse con un antígeno del mismo origen y posteriormente mediar en la supresión. Aunque las células Treg naturales están contenidas dentro de la población de células T definida por CD4 y CD25, es posible de hecho que las células Treg reales sean aquellas que expresan LAG-3 intracelular. Para evaluar directamente el papel de LAG-3 en la función reguladora de células Treg naturales, se planteó la cuestión de si anticuerpos anti-LAG-3 podían inhibir la supresión *in vitro* mediada por células $CD4^+CD25^+$ purificadas. La figura 6C demuestra que anticuerpos anti-LAG-3 bloquean de hecho la supresión mediada por células $CD4^+CD25^+$ purificadas, lo que sugiere que LAG-3 desempeña un papel en la supresión mediada por células Treg naturales así como inducidas. La tinción de las células $CD4^+CD25^+$ al final del ensayo de supresión *in vitro* reveló que aproximadamente el 20% expresan ahora altos niveles de LAG-3 en su superficie, lo que respalda la noción de que la LAG-3 intracelular se moviliza a la superficie en circunstancias de acoplamiento a TCR y media en la actividad reguladora (figura 6D).

30

Ejemplo 8 – La expresión ectópica de LAG-3 confiere actividad reguladora

Los experimentos de bloqueo en las figuras 5 y 6 sugieren que se requiere LAG-3 para una función Treg máxima. Para validar adicionalmente esta conclusión, se realizó una serie de experimentos de transducción para determinar si la expresión ectópica de LAG-3 en células T confiere actividad reguladora. Para estos experimentos, en primer lugar se sometieron células T $CD4^+$ 6.5 a depleción de cualquier célula Treg “natural” $CD25^+$ y después se transdujeron con vectores retrovirales basados en MSCV que codificaban o bien para GFP sola, GFP + LAG-3 de tipo natural o bien GFP + un mutante LAG-3.Y73FΔCY que tiene una afinidad sustancialmente reducida por CMH de clase II y no puede mediar en la señalización posterior (Workman *et al.*, 2002a). Tras un periodo de reposo de 10 días, no se observó esencialmente ninguna tinción de LAG-3 endógena en células T $CD4^+$ 6.5 GFP⁺ transducidas con el vector MSCV-GFP, mientras que se observaron niveles altos de tinción de LAG-3 en células 6.5 GFP⁺ transducidas con los vectores MSCV-LAG-3/GFP y MSCV-LAG-3.Y73FΔCY/GFP. Se clasificaron las células GFP⁺ de cada grupo y se mezclaron a diferentes razones con APC, péptido de HA¹¹⁰⁻¹²⁰ y células $CD4^+CD25^-$ 6.5 vírgenes en un ensayo de proliferación. Tal como se muestra en la figura 7, las células 6.5 que expresaban LAG-3 de tipo natural suprimieron potentemente la proliferación de células 6.5 vírgenes mientras que no se observó ninguna supresión con células 6.5 transducidas con GFP control o células 6.5 que expresaban el mutante no funcional LAG-3.Y73FΔCY. De hecho, la proliferación total aumentó algo en estos dos últimos grupos, ya que las propias células 6.5 transducidas con GFP y LAG-3.Y73FΔCY proliferan además de las células 6.5 vírgenes en el ensayo. De hecho, las propias células T transducidas con LAG-3 de tipo natural demostraron una reducción significativa en las respuestas proliferativas aparte de inhibir la proliferación de las células 6.5 no transducidas. Estos resultados proporcionan evidencias directas que confirman el papel funcional de LAG-3 en la supresión. De manera interesante, la transducción de LAG-3 no indujo otros genes asociados con células Treg, incluyendo Foxp3, CD25, CD103 y GITR (datos no mostrados). Este resultado, junto con la ausencia de expresión diferencial significativa de estos genes entre células T 6.5 que se diferencian para dar fenotipos efectores/de memoria frente a anérgicos/Treg, sugiere que LAG-3 puede mediar en una ruta distinta de la función de células T reguladoras independiente de la ruta de Foxp3.

55

Ejemplo 9 – Discusión

Estos hallazgos identifican a LAG-3 como una molécula de superficie celular regulada por incremento selectivamente en células Treg que puede implicarse directamente en la mediación de la función Treg. Dados los muchos sistemas en los que se ha definido la actividad Treg tanto natural como inducida, sigue teniendo que determinarse si LAG-3 es un marcador de células Treg “universal” o sólo marca selectivamente determinados subconjuntos de células Treg. Los presentes resultados sugieren que además de células Treg $CD4^+$ inducidas, LAG-3 desempeña al menos algún papel en la mediación en la supresión mediante células Treg $CD4^+CD25^+$ naturales. Además, otros datos experimentales demuestran un papel para LAG-3 en la regulación de la expansión de linfocitos

65

homeostáticos mediante células Treg naturales (Workman y Vignali, artículo adjunto). El hallazgo de que la expresión de LAG-3 es significativamente superior entre células T CD4⁺CD25⁺ de ratones de tipo natural sugiere que puede desempeñar un papel en la función de células Treg naturales, así como inducidas. Tal como se sugiere mediante los experimentos en la figura 3, la combinación de LAG-3 y CD25 puede definir subconjuntos de células Treg con la actividad supresora más potente. No se propone que LAG-3 sea un “marcador de linaje” para células Treg ya que se expresa a niveles variables que se correlacionan con la magnitud de actividad reguladora en ensayos *in vitro*. De hecho, no queda claro que las células Treg representen un linaje estable o un estado de diferenciación que puede fomentar la tolerancia de una manera no autónoma celular (von Boehmer, 2003). Se han identificado diferentes mecanismos para la función Treg en diferentes sistemas (revisado en Shevach, 2002). Las células LAG-3^{high} producen cantidades aumentadas de IL-10 y presentan una actividad supresora *in vitro* potenciada, pero sigue teniendo que determinarse el papel de IL-10 en la mediación en la función supresora en el presente sistema. Los anticuerpos contra LAG-3 inhiben la actividad supresora de células Treg tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto se propone que LAG-3 es un receptor conjunto o receptor específico de células Treg que modula la actividad supresora de este subconjunto de células T.

Varios estudios han sugerido un papel inhibitorio autónomo celular para LAG-3 (Huard *et al.*, 1994; Workman *et al.*, 2002b), aunque estudios iniciales con ratones deficientes para LAG-3 no han logrado descubrir ninguna evidencia de autoinmunidad o hiperinmunidad manifiesta (Miyazaki *et al.*, 1996). Dado el papel propuesto para LAG-3 en la función Treg, puede esperarse que ratones deficientes para LAG-3 presenten autoinmunidad a múltiples sistemas (es decir, similar a ratones deficientes para Foxp3 o *scurfy*), que no se ha notificado en estos ratones. Sin embargo, los ratones deficientes para LAG-3 presentan defectos de célula T claramente reguladores, tales como un defecto en la regulación de la homeostasis celular (Workman y Vignali, artículo adjunto). Actualmente están volviéndose a examinar ratones deficientes para LAG-3 más mayores para detectar una evidencia más sutil de autoinmunidad de aparición tardía, tal como se observó en ratones deficientes para PD-1 (Nishimura *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001). También es concebible que pueden haberse potenciado otros mecanismos reguladores en estos ratones para compensar la pérdida de expresión de LAG-3.

Dado que se expresa a niveles superiores en células Treg, LAG-3 proporciona una excelente diana posible para la manipulación selectiva de la actividad Treg para tratar tanto cáncer como enfermedad autoinmunitaria. CD25, el marcador de células Treg “de referencia”, se induce a altos niveles en células activadas, ya que es un componente crítico del complejo de receptor de IL-2. El motivo aparente por el que las células CD4⁺CD25⁺ están enriquecidas en actividad Treg no es porque CD25 es específico para la función Treg, sino más bien porque las células Treg están crónicamente estimuladas mediante encuentro continuo con autoantígeno en la periferia. Más recientemente, se demostró que la molécula miembro 18 de la superfamilia de receptores de TNF (también denominada GITR) estaba regulada por incremento en células Treg. Además, se ha notificado que anticuerpos contra GITR inhiben la actividad Treg tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, GITR está regulado por incremento de manera equivalente en células T activadas y por tanto aparentemente no es más selectivo como marcador para células Treg de lo que lo es CD25 (McHugh *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002). Además, hay numerosos informes de que las poblaciones de células CD4⁺CD25⁻ pueden suprimir determinadas funciones inmunitarias (Annacker *et al.*, 2001; Apostolou *et al.*, 2002; Curotto de Lafaille *et al.*, 2001; Graca *et al.*, 2002; Shimizu y Moriizumi, 2003; Stefens y Mason, 2000). No obstante, el hallazgo de que las células CD25^{high}LAG-3^{high} presentan la mayor actividad supresora sugiere que anticuerpos contra ambas de estas moléculas de superficie celular pueden usarse de manera coordinada para manipular la actividad Treg.

Los presentes datos muestran que se requiere LAG-3 para la máxima actividad supresora de células Treg tanto naturales como inducidas. Sin embargo, ¿es esto suficiente? Hasta ahora, la única molécula que se ha mostrado que confiere actividad reguladora en células T activadas es Foxp3 (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003). De manera importante se ha mostrado en este caso que la expresión ectópica de LAG-3, pero no un mutante funcionalmente defectuoso, en células T CD4⁺ también puede conferir actividad reguladora.

Otra cuestión clave es si las células Treg suprimen la reactividad de células efectoras CD4⁺ y CD8⁺ mediante interacciones T-T directas o mediante productos intermedios DC. La identificación de la expresión funcional y selectiva de células Treg de LAG-3, una molécula de unión a CMH de clase II, debe proporcionar un nuevo control sobre la disección de mecanismos y manipulación de la función Treg para enfermedades en las que estas células desempeñan un papel importante.

Ejemplo 10 –Procedimientos experimentales

Ratones transgénicos

Los ratones transgénicos C3-HA se han descrito anteriormente (Adler *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 1998). En resumen, el gen de hemaglutinina (HA) derivado del virus influenza A/PR/8/34 (cepa del monte Sinaí) se ha colocado bajo el control del promotor C3(1) de rata. Se establecieron dos líneas fundadoras en el contexto genético B10.D2. Estas dos líneas fundadoras, C3-HA^{high} y C3-HA^{low}, que contienen 30-50 y 3 copias de transgenes respectivamente, expresan el ARNm de híbrido C3-HA en el mismo conjunto de tejidos no linfoides incluyendo el pulmón y la próstata.

Aunque no se midió directamente la diferencia en la expresión de proteína HA total entre C3-HA^{high} y C3-HA^{low}, en el pulmón y la próstata, en los que los niveles de expresión son los más altos, la diferencia es de aproximadamente 1000 veces tal como se muestra mediante bioensayo de liberación de citocina de hibridoma inducida por extracto tisular.

La línea de ratón transgénico para TCR, 6.5, que expresa un TCR que reconoce un epítipo de HA limitado a I-E^d (¹¹⁰SFERFEIFPKE¹²⁰; SEQ ID NO: 7) (generosamente proporcionada por el Dr. Harald von Boehmer, Harvard University, Boston, MA), se sometió a cruce regresivo 9 generaciones sobre el contexto genético B 10.D2. La otra línea de ratón transgénico para TCR, el clon 4, que expresa un TCR que reconoce un epítipo de HA limitado a K^d (⁵¹⁸IYSTVASSL⁵²⁶; SEQ ID NO: 8) (generosamente proporcionada por la Dra. Linda Sherman, Scripps Research Institute, La Jolla, CA), también se sometió a cruce regresivo más de 9 generaciones sobre el contexto genético Thy 1.1/1.1 B10.D2. Dado que no hay ningún anticuerpo clonotípico disponible para TCR de clon 4, se usó Thy 1.1 como marcador sustituto. Tras la transferencia adoptiva en receptores Thy1.2/1.2, puede suponerse que todas las células T CD8⁺ Thy 1.1⁺ expresan el TCR clonotípico específico de HA ya que casi todas las células T CD8⁺ maduras en los ratones de clon 4 reconocen directamente el epítipo de HA limitado a K^d (Morgan *et al.*, 1996).

Los ratones transgénicos usados para los experimentos tenían una edad de entre 8 y 24 semanas. Todos los experimentos que implicaron el uso de ratones se realizaron según protocolos aprobados por el Animal Care and Use Committee de la Johns Hopkins University School of Medicine.

Transferencia adoptiva

Se prepararon células T CD4⁺ o CD8⁺ clonotípicas a partir de bazos y ganglios linfáticos combinados de ratones transgénicos 6.5 o de clon 4. Se determinó el porcentaje clonotípico mediante análisis por citometría de flujo. Se analizó el marcador de activación CD44 para garantizar que estas células clonotípicas no estaban activadas en ratones donadores y eran vírgenes en cuanto a su fenotipo. Tras lavar 3 veces con HBSS, se resuspendió un número apropiado de células en 0,2 ml de HBSS para inyección i.v. a través de la vena de la cola.

Inmunohistoquímica

Se recogieron tejidos de ratones tres días tras la transferencia adoptiva. Se fijó tejido en ImmunoHistoFix (APhase sprl, Bélgica) durante 3 días a 4°C y después se incrustó en ImmunoHistoWax (APhase sprl, Bélgica). Se tiñeron secciones en serie usando AcM anti-Thy1.1 marcado con biotina (PharMingen, San Diego, CA). Se usaron el kit Vectastain ABC (Vector, Burlingame, CA) y NovaRed (Vector) para el desarrollo. Se contratificaron secciones con hematoxilina QS (Vector). Se analizaron secciones usando un instrumento Eclipse E800 de Nikon. Se realizó un procesamiento de imágenes final usando Adobe PhotoShop (Mountain Vista, CA).

Enriquecimiento y purificación de células T CD4⁺ 6.5 cebadas in vivo

Con inducción o bien efectora/de memoria o bien de tolerancia *in vivo* tras la transferencia adoptiva, el porcentaje clonotípico de células T CD4⁺ 6.5 en los bazos de ratones receptores es de tan sólo el 0,2% ~ 5%. El enriquecimiento deliberado y la purificación es obligatorio para obtener suficientes células T CD4⁺ clonotípicas para estudios adicionales, tales como para análisis en chip génico Affymetrix. Se cruzaron células T 6.5 de donante en un contexto Thy1.1(+)/Thy1.2(-) que permitió un procedimiento de enriquecimiento y purificación en dos etapas tras transferencia adoptiva en receptores Thy1.1(-)/Thy1.2(+). En primer lugar se enriquecieron células T CD4⁺ 6.5 usando anticuerpos biotinilados anti-CD8 (Ly-2, 53-6.7), anti-B220 (RA3-6B2) y anti-Thy1.2 (30-H12) (todos adquiridos de BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA) y microperlas de estreptavidina para MACS y columna de separación MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) para someter células T CD8⁺, células B y las células T de receptor (Thy 1.2⁺) a depleción. Dado que las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺ son las únicas poblaciones que llevan Thy1.1, y dado que las células T CD8⁺ se habían sometido a depleción durante el enriquecimiento, la clasificación de células Thy1.1(+) usando el clasificador celular FACSVantage SE (BD Biosciences) dio como resultado células T CD4⁺ 6.5 altamente purificadas (95%). Esta técnica evita el uso de anticuerpos específicos de TCR o específicos de receptor conjunto de CD4 que podían alterar posiblemente los patrones de expresión génica dependientes de TCR o de CD4.

Análisis de chip génico

Se cortaron células clasificadas con columnas Qiashredder (Qiagen, Valencia CA), seguido por un aislamiento de ARN total usando el kit RNeasy (Qiagen). Se sintetizó ADNc usando el kit Superscript Choice (Gibco/BRL) y un cebador de T7-DT purificado mediante HPLC (Proligo, Boulder, CO). Se preparó una sonda de ARNc biotinilado usando el kit de transcripto de ARN ENZO BioArray (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se hibridaron chips génicos murinos U174A, B y C y se analizaron según protocolos convencionales de Affymetrix.

Clasificación de la expresión diferencial de genes en células T CD4⁺ entre la inducción de anergia/Treg y la inducción efectora/de memoria.

Se analizó mediante chips génicos de Affymetrix ARNm preparado a partir de células T CD4⁺ clonotípicas 6.5 vírgenes purificadas y células T CD4⁺ clonotípicas 6.5 anérgicas/Treg y efectoras/de memoria en diversos días tras transferencia adoptiva. Se clasificó mediante "distancia" la expresión diferencial de genes entre la inducción de anergia/Treg y la inducción efectora/de memoria. Se definió la distancia como la suma de las diferencias absolutas de expresión entre células T anérgicas y células T efectoras/de memoria en el día 2 (*d1*), el día 3 (*d2*) y el día 4 (*d3*) tras transferencia adoptiva, dividido entre el valor de células T CD4⁺ vírgenes (*n*) para la normalización.

Anticuerpos y tinción

Se usaron los siguientes anticuerpos. Anticuerpo anti-LAG-3 (C9B7W, de PharMingen) (Workman *et al.*, 2002b) o bien purificado o bien conjugado con PE; anticuerpo anti-CD25 (7D4, de PharMingen) o bien purificado o bien conjugado con FITC; y anticuerpo anti-GITR (anticuerpo policlonal adquirido de R&D Systems). Para la tinción en superficie celular para detectar LAG-3 y CD25, se aislaron esplenocitos de ratones transgénicos 6.5^{+/-} Thy1.1^{+/-} y se enriquecieron para CD4⁺ usando un kit de aislamiento de selección negativa de CD4⁺ (Miltenyi Biotec). Se resuspendieron aproximadamente 2,5 x 10⁶ células 6.5 clonotípicas, según se determinó mediante citometría de flujo (el 16% de las células CD4⁺ totales), en HBSS y se inyectaron a través de la vena de la cola en ratones B10.D2 137 (C3-HA^{high}) o de tipo natural. Se trató un grupo de ratones B10.D2 con 5 x 10⁶ Vac-HA, mientras que se dejó el otro grupo sin tratar para control virgen. Se recogieron esplenocitos y ganglios linfáticos inguinales y axilares cinco días después y se prepararon en una suspensión de células individuales. Se lisaron RBC con tampón de lisis ACK. Se bloquearon las células inmediatamente con 5 µg de IgG de rata completa (Sigma) durante 15 minutos antes de la tinción con anticuerpo anti-TCR de 6.5-biotina + SA-APC, LAG-3-PE y CD25-FITC, o los controles de isotipo correspondientes. Todos los reactivos de tinción, excepto por el anticuerpo anti-6.5-biotina, se adquirieron de Pharmingen (San Diego, CA). Tras una incubación corta, se lavaron muestras una vez en PBS + disolución de FBS al 1% y se leyeron en una máquina FACScalibur (BD, San Jose, CA).

Ensayo de supresión *in vitro* para células T reguladoras 6.5 inducidas

Se mezclaron 1 X 10⁴ células T CD4⁺ 6.5 vírgenes purificadas (células que responden) y 1 X 10⁵ esplenocitos B10.D2 singénicos irradiados con 3000 rad (células presentadoras de antígeno) con diferente números de células T CD4⁺ 6.5 supresoras y se incubaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo con 10 µg/ml de péptido de HA de clase II (¹¹⁰SFERFEIFPKE¹²⁰; SEQ NO: 7) en 200 µl de medios CTL. De cuarenta y ocho a 72 horas después, se sometieron los cultivos a pulsos con 1 µCi de ³H-timidina y se incubaron 16 horas adicionales antes de recogerse con un colector de células Micromate de Packard. La determinación de la cantidad de recuentos radiactivos incorporados se realizó con un contador beta directo Matrix 96 de Packard (Packard Biosciences, Meriden, CT).

Ensayo de supresión *in vitro* para células T reguladoras naturales

Se usaron ratones BALB/c de tipo natural para ensayos de células Treg naturales. Se mezclaron 5 X 10⁴ células T CD4⁺CD25⁻ clasificadas mediante citometría de flujo (células que responden) y 5 x 10⁴ esplenocitos de ratones BALB/c irradiados con 3000 rad (células presentadoras de antígeno) con diferentes números de células T supresoras CD4⁺CD25⁺ clasificadas mediante citometría de flujo y se incubaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo con 0,5 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 en 200 µl de medios CTL. De cuarenta y ocho a 72 horas después, se sometieron los cultivos a pulsos con 1 µCi de ³H-timidina y se incubaron 16 horas adicionales antes de recogerse con un colector de células Micromate de Packard. La determinación de la cantidad de recuentos radiactivos incorporados se realizó con un contador beta directo Matrix 96 de Packard (Packard Biosciences, Meriden, CT).

Análisis mediante PCR en tiempo real cuantitativa

Se usaron inmediatamente las células T CD4⁺ 6.5 clasificadas para la extracción de ARN usando reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó una transcripción inversa con el sistema de síntesis de primera hebra Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se analizaron los niveles de ADNc mediante PCR cuantitativa en tiempo real con el sistema Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se sometió a ensayo cada muestra por duplicado o triplicado para determinar el gen diana junto con ARNr de 18S como referencia interna en un volumen de reacción final de 25 µl, usando la mezcla maestra para PCR universal de Taqman y el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700. Se adquirieron reactivos de reacción previamente preparados (PDAR) de Applied Biosystems para la detección de IL-10 e IL-2. Se diseñaron los conjuntos de pares de cebadores y sondas usando el software Primer Express y después se sintetizaron mediante Applied Biosystems para LAG-3, CD25, GITR e IFN-γ. El conjunto de cebadores y sonda usado para *Foxp3* se cogió de la bibliografía (S4). Se determinaron las frecuencias de ARNm relativas mediante normalización al ARN de 18S de control interno. En resumen, se normalizó cada conjunto de muestras usando la diferencia en los ciclos umbral (Ct) entre el gen diana y el ARN de 18S: $\Delta Ct_{muestra} = (Ct_{muestra} - Ct_{18S})$. Se asignó la muestra de calibración como la muestra con el mayor ΔCt en cada conjunto de ensayo

($\Delta Ct_{\text{calibración}}$). Se calcularon las frecuencias de ARNm relativas como $2^{\Delta\Delta Ct}$ en la que $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{calibración}} - \Delta Ct_{\text{muestra}})$. Los cebadores y conjuntos de sondas usados son: LAG-3 cebador 5'-ACA TCA ACC AGA CAG TGG CCA-3' (SEQ ID NO: 9)/cebador 5'-GCA TCC CCT GGT GAA GGT C-3' (SEQ ID NO: 10)/sonda 5'-6FAM-CCC ACT CCC ATC CCG GCC C-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 11); CD25 cebador 5'-TGT ATG ACC CAC CCG AGG TC-3' (SEQ ID NO: 12)/cebador 5'-TTA GGA TGG TGC CGT TCT TGT-3' (SEQ ID NO: 13)/sonda 5'-6FAM-CCA ATG CCA CAT TCA AAG CCC TCT CC-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 14); GITR cebador 5'-TCC GGT GTG TTG CCT GTG-3' (SEQ ID NO: 15)/cebador 5'-CAA AGT CTG CAG TGA CCG TCA-3' (SEQ ID NO: 16)/sonda 5'-6FAM-CAT GGG CAC CTT CTC CGC AGG T-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 17); IFN- γ cebador 5'-CAT TGA AAG CCT AGA AAG TCT GAA TAA C-3' (SEQ ID NO: 18)/cebador 5'-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3' (SEQ ID NO: 19)/sonda 5'-6FAM-TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC CAG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 20); *Foxp3* cebador 5'-CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT-3' (SEQ ID NO: 21)/cebador 5'-TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG-3' (SEQ ID NO: 22)/sonda: 5'-6FAM-ATC CTA CCC ACT GCT GGC AAA TGG AGT C-3' (SEQ ID NO: 23).

Constructos de LAG-3 y líneas celulares productoras de retrovirus.

Se produjeron constructos de LAG-3 usando PCR recombinante tal como se describe (Vignali y Vignali, 1999). Se han descrito LAG-3.WT y el mutante funcionalmente nulo LAG-3.Y73F. Δ CY (LAG-3 sin cola citoplasmática con una mutación puntual que reduce enormemente la capacidad de LAG-3 para unirse a CMH de clase II) (Workman *et al.*, 2002a). Se clonaron constructos de LAG-3 en un vector retroviral basado en virus de células madre murino (MSCV), que contenía un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y proteína verde fluorescente (GFP), y se produjo retrovirus tal como se describe (Persons *et al.*, 1997; Persons *et al.*, 1998). Se generaron líneas celulares productoras de retrovirus transduciendo repetidamente células GPE+86 (~7-10 veces) hasta que se obtuvo un título viral de más de 10^5 /ml tras 24 h (Markowitz *et al.*, 1988).

Transducción retroviral de células T CD4⁺/CD25⁻ y ensayo de supresión *in vitro*.

Se tiñeron esplenocitos de ratones 6.5 con anticuerpo marcado con biotina anti-B220, anti-Gr1, anti-Mac1, anti-TER119, anti-CD49b, anti-CD8 y anti-CD25 (PharMingen, San Diego, CA). Entonces se incubaron las células con perlas magnéticas acopladas con estreptavidina y se clasificaron negativamente en un instrumento autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn CA) hasta una pureza del 90-95% de células T CD4⁺/CD25⁻. Se activaron las células T CD4⁺/CD25⁻ 6.5 purificadas mediante anticuerpo unido a placa anti-CD3 (2C11) y anti-CD28 (35.71). En los días 2 y 3 tras la estimulación, se transdujeron mediante centrifugación las células T activadas (4×10^5 células/ml) (90 min., 3000 rpm) con sobrenadante viral de líneas celulares productoras de retrovirus GPE+86 con vector solo, LAG-3.WT/GFP o LAG-3.Y73F. Δ CY/GFP descritas anteriormente más IL-2 y Polybrene (6 μ g/ml). Se dejaron reposar las células durante 10 días y después se clasificaron en el ~30-35% superior de células T GFP⁺/Thy1.2⁺.

Para el ensayo de supresión *in vitro*, se cultivaron las células T GFP⁺ purificadas (diluciones de 2 veces comenzando a $2,5 \times 10^4$) con $2,5 \times 10^4$ células T CD4⁺/CD25⁻ 6.5 (purificadas mediante instrumento AutoMACS negativo), 5×10^4 esplenocitos irradiados (3000 rad) y 5 μ g/ml de HA110-120 en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se cultivaron las células durante 72 h y se sometieron a pulsos con 1 μ Ci/pocillo de [³H]timidina (Du Pont, Wilmington, DE) las últimas 7-8 h de cultivo.

Ejemplo 11

Se escinde CD223 de la superficie celular y se libera en una forma soluble (sLAG-3). Se genera en cantidades significativas mediante células T activadas *in vitro*. (5 μ g/ml) y también se encuentra en el suero de ratones (80 ng/ml). Se genera probablemente por una proteasa de superficie celular. Se detectó sLAG-3 mediante inmunotransferencia de tipo Western. La escisión se produce en la región transmembrana (por ejemplo, los aminoácidos 442-466 en SEQ ID NO: 2) o en la región de conector (por ejemplo, los aminoácidos 432-441 en SEQ ID NO: 2) que la precede inmediatamente en el sentido amino-terminal.

Ejemplo 12

Tal como se mostró anteriormente, no sólo se requiere LAG-3 para una función de células T reguladoras (Treg) máxima sino que también es suficiente. En otras palabras, la expresión de LAG-3 sola es suficiente para convertir células de células T efectoras activadas a células T reguladoras.

A continuación se desea determinar si las células que expresan ectópicamente LAG-3 también mostrarán función reguladora *in vivo* y estarán protegidas en un entorno de enfermedad. Se decide plantear la cuestión de si la expresión ectópica de LAG-3 en una célula T específica de autoantígeno protegerá a ratones frente a diabetes tipo 1. En este sistema experimental, se transfirieron de manera adoptiva esplenocitos de ratones NOD propensos a diabetes a ratones NOD-Scid, que carecen de linfocitos. Todos los ratones desarrollan diabetes en el plazo de 3 meses. Los análisis preliminares sugieren que la aparición de diabetes inducida por esplenocitos de ratones NOD se previene mediante células T específicas de fognina transducidas con LAG-3, pero no un mutante defectuoso para la señalización o el control de GFP. Estos datos respaldan la idea de usar la expresión ectópica de células T

específicas para autoantígeno con LAG-3 como estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de muchas enfermedades autoinmunitarias, asma y alergia.

Bibliografía

- 5 Adler, A. J., Huang, C. T., Yochum, G. S., Marsh, D. W., and Pardoll, D. M. (2000). In vivo CD4+ T cell tolerance induction versus priming is independent of the rate and number of cell divisions. *J Immunol* 164, 649-655.
- 10 Adler, A. J., Marsh, D. W., Yochum, G. S., Guzzo, J. L., Nigam, A., Nelson, W. G., and Pardoll, D. M. (1998). CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 187, 1555-1564.
- 15 Almeida, A. R., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A. A. (2002). Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* 169, 4850-4860.
- Annacker, O., Burlen-Defranoux, O., Pimenta-Araujo, R., Cumano, A., and Bandeira, A. (2000). Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment *J Immunol* 164, 3573-3580.
- 20 Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T. C., Cumano, A., and Bandeira, A. (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166, 3008-3018.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and Von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3,756-763.
- 25 Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.
- 30 Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2002). CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* 14, 771-778.
- Curotto de Lafaille, M. A., Muriglan, S., Sunshine, M. J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G. C., Wensky, A. K., Olivares-Villagomez, D., and Lafaille, J. J. (2001). Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* 194, 1349-1359.
- 35 Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- 40 Graca, L., Thompson, S., Lin, C. Y., Adams, E., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2002). Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 168, 5558-5565.
- Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., and Triebel, F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol* 161, 4058-4065.
- 45 Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Huang, C.-T., Huso, D. L., Lu, Z., Wang, T., Zhou, G., Kennedy, E. P., Drake, C. G., Morgan, D. J., Sherman, L. A., Higgins, A. D., *et al.* (2003). CD4+ T Cells Pass Through an Effector Phase During the Process of *In Vivo* Tolerance Induction. *J Immunol* 170, 3945-3953.
- 50 Huard, B., Tournier, M., Hercend, T., Triebel, F., and Faure, F. (1994). Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24, 3216-3221.
- 55 Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-6327.
- 60 Jooss, K., Gjata, B., Danos, O., von Boehmer, H., and Sarukhan, A. (2001). Regulatory function of in vivo anergized CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8738-8743.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- 65 Maloy, K. J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.

- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62, 1120-1124.
- 5 McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.
- 10 Miyazaki, T., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science* 272, 405-408.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19,683-765.
- 15 Morgan, D. J., Liblau, R., Scott, B., Fleck, S., McDevitt, H. O., Sarvetnick, N., Lo, D., and Sherman, L. A. (1996). CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice, *J Immunol* 157, 978-983.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151.]
- 20 Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-322.
- 25 Persons, D. A., Allay, J. A., Allay, E. R., Smeyne, R. J., Ashmun, R. A., Sorrentino, B. P., and Nienhuis, A. W. (1997). Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors *in vitro* and identification of genetically modified cells *in vivo*. *Blood* 90, 1777-1786.
- 30 Persons, D. A., Mehaffey, M. G., Kaleko, M., Nienhuis, A. W., and Vanin, E. F. (1998). An improved method for generating retroviral producer clones for vectors lacking a selectable marker gene. *Blood Cells Mol Dis* 24, 167-182.
- Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302.
- 35 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18-32.
- 40 Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shimizu, J., and Moriizumi, E. (2003). CD4+CD25- T Cells in Aged Mice Are Hyporesponsive and Exhibit Suppressive Activity *J Immunol* 170,1675-1682.
- 45 Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3,135-142.
- Stephens, L. A., and Mason, D. (2000), CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol* 165, 3105-3110.
- 50 Suttmuller, R. P., van Duivenvoorde, L. M., van Elsas, A., Schumacher, T. N., Wildenberg, M. E., Allison, J. P., Toes, R. E., Offringa, R., and Melief, C. J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194, 823-832.
- 55 Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003). CD4+CD25+ T Cells Regulate Virus-specific Primary and Memory CD8+ T Cell Responses. *J Exp Med* 198, 889-901.
- 60 Vignali, D. A., and Vignali, K. M. (1999). Profound enhancement of T cell activation mediated by the interaction between the TCR and the D3 domain of CD4. *J Immunol* 162, 1431-1439.
- 65 von Boehmer, H. (2003). Dynamics of Suppressor T Cells: *In Vivo* Veritas. *J Exp Med* 198, 845-849.]

Workman, C. J., Dugger, K. J., and Vignali, D. A. A. (2002a). Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3. *J Immunol* 169, 5392-5395.

5 Workman, C. J., Rice, D. S., Dugger, K. J., Kurschner, C., and Vignali, D. A. (2002b). Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol* 32, 2255-2263.

LISTA DE SECUENCIAS

10 <110> vignali, Dario
workman, creg
Pardoll, Drew
Powell, Jonathan
Drake, Charles
Huang, ching-Tai

15 <120> Regulación de células T

<130> 001107.00427

20 <150> Documento 60/451.039
<151> 28-02-2003

<150> Documento 60/482.143
<151> 24-06-2003

25 <150> Documento 60/531.704
<151> 22-12-2003

<160> 23

30 <170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1
<211> 1566

35 <212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> misc_feature

40 <222> (1)...(1566)
<223> LAG-3 murina

<221> CDS
<222> (1)...(1566)

45 <223> proteína LAG-3 murina

<221> sig_peptide
<222> (1)...(66)

50 <400> 1

ES 2 439 580 T3

atg	agg	gag	gac	ctg	ctc	ctt	ggc	ttt	ttg	ctt	ctg	gga	ctg	ctt	tgg	48
Met	Arg	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Trp	
		-20					-15					-10				
gaa	gct	cca	ggt	gtg	tct	tca	ggg	cct	ggg	aaa	gag	ctc	ccc	gtg	gtg	96
Glu	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Ser	Gly	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Pro	Val	Val	
	-5					1				5					10	
tgg	gcc	cag	gag	gga	gct	ccc	gtc	cat	ctt	ccc	tgc	agc	ctc	aaa	tcc	144
Trp	Ala	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Val	His	Leu	Pro	Cys	Ser	Leu	Lys	Ser	
				15					20					25		
ccc	aac	ctg	gat	cct	aac	ttt	cta	cga	aga	gga	ggg	ggt	atc	tgg	caa	192
Pro	Asn	Leu	Asp	Pro	Asn	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Val	Ile	Trp	Gln	
			30					35					40			
cat	caa	cca	gac	agt	ggc	caa	ccc	act	ccc	atc	ccg	gcc	ctt	gac	ctt	240
His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Pro	Thr	Pro	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Leu	
		45					50					55				

cac His	cag Gln 60	ggg Gly	atg Met	ccc Pro	tcg Ser	cct Pro 65	aga Arg	caa Gln	ccc Pro	gca Ala 70	ccc Pro	ggt Gly	cgc Arg	tac Tyr	acg Thr	288
gtg Val 75	ctg Leu	agc Ser	gtg Val	gct Ala	cca Pro 80	gga Gly	ggc Gly	ctg Leu	cgc Arg	agc Ser 85	ggg Gly	agg Arg	cag Gln	ccc Pro	ctg Leu 90	336
cat His	ccc Pro	cac His	gtg Val	cag Gln 95	ctg Leu	gag Glu	gag Glu	cgc Arg	ggc Gly 100	ctc Leu	cag Gln	cgc Arg	ggg Gly	gac Asp 105	ttc Phe	384
tct Ser	ctg Leu	tgg Trp	ttg Leu 110	cgc Arg	cca Pro	gct Ala	ctg Leu	cgc Arg 115	acc Thr	gat Asp	gcg Ala	ggc Gly	gag Glu 120	tac Tyr	cac His	432
gcc Ala	acc Thr	gtg Val 125	cgc Arg	ctc Leu	ccg Pro	aac Asn	cgc Arg 130	gcc Ala	ctc Leu	tcc Ser	tgc Cys	agt Ser 135	ctc Leu	cgc Arg	ctg Leu	480
cgc Arg	gtc Val 140	ggc Gly	cag Gln	gcc Ala	tcg Ser	atg Met 145	att Ile	gct Ala	agt Ser	ccc Pro	tca Ser 150	gga Gly	gtc Val	ctc Leu	aag Lys	528
ctg Leu 155	tct Ser	gat Asp	tgg Trp	gtc Val	ctt Leu 160	ttg Leu	aac Asn	tgc Cys	tcc Ser	ttc Phe 165	agc Ser	cgt Arg	cct Pro	gac Asp	cgc Arg 170	576
cca Pro	gtc Val	tct Ser	gtg Val	cac His 175	tgg Trp	ttc Phe	cag Gln	ggc Gly	cag Gln 180	aac Asn	cga Arg	gtg Val	cct Pro	gtc Val 185	tac Tyr	624
aac Asn	tca Ser	ccg Pro	cgt Arg 190	cat His	ttt Phe	tta Leu	gct Ala	gaa Glu 195	act Thr	ttc Phe	ctg Leu	tta Leu	ctg Leu 200	ccc Pro	caa Gln	672
gtc Val	agc Ser	ccc Pro 205	ctg Leu	gac Asp	tct Ser	ggg Gly	acc Thr 210	tgg Trp	ggc Gly	tgt Cys	gtc Val	ctc Leu 215	acc Thr	tac Tyr	aga Arg	720
gat Asp	ggc Gly 220	ttc Phe	aat Asn	gtc Val	tcc Ser	atc Ile 225	acg Thr	tac Tyr	aac Asn	ctc Leu	aag Lys 230	ggt Val	ctg Leu	ggt Gly	ctg Leu	768
gag Glu 235	ccc Pro	gta Val	gcc Ala	cct Pro	ctg Leu 240	aca Thr	gtg Val	tac Tyr	gct Ala	gct Ala 245	gaa Glu	ggt Gly	tct Ser	agg Arg	gtg Val 250	816
gag Glu	ctg Leu	ccc Pro	tgt Cys	cat His 255	ttg Leu	ccc Pro	cca Pro	gga Gly	gtg Val 260	ggg Gly	acc Thr	cct Pro	tct Ser	ttg Leu 265	ctc Leu	864
att Ile	gcc Ala	aag Lys	tgg Trp 270	act Thr	cct Pro	cct Pro	gga Gly	gga Gly 275	ggt Gly	cct Pro	gag Glu	ctc Leu	ccc Pro 280	gtg Val	gct Ala	912
gga Gly	aag Lys 285	agt Ser	ggc Gly	aat Asn	ttt Phe	acc Thr	ctt Leu 290	cac His	ctt Leu	gag Glu	gct Ala	gtg Val 295	ggt Gly	ctg Leu	gca Ala	960
cag Gln	gct Ala 300	ggg Gly	acc Thr	tac Tyr	acc Thr	tgt Cys 305	agc Ser	atc Ile	cat His	ctg Leu	cag Gln 310	gga Gly	cag Gln	cag Gln	ctc Leu	1008
aat Asn 315	gcc Ala	act Thr	gtc Val	acg Thr	ttg Leu 320	gcg Ala	gtc Val	atc Ile	aca Thr	gtg Val 325	act Thr	ccc Pro	aaa Lys	tcc Ser	ttc Phe 330	1056

ggg tta cct ggc tcc cgg ggg aag ctg ttg tgt gag gta acc ccg gca	1104
Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala	
	335 340 345
tct gga aag gaa aga ttt gtg tgg cgt ccc ctg aac aat ctg tcc agg	1152
Ser Gly Lys Glu Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Asn Asn Leu Ser Arg	
	350 355 360
agt tgc ccg ggc cct gtg ctg gag att cag gag gcc agg ctc ctt gct	1200
Ser Cys Pro Gly Pro Val Leu Glu Ile Gln Glu Ala Arg Leu Leu Ala	
	365 370 375
gag cga tgg cag tgt cag ctg tac gag ggc cag agg ctt ctt gga gcg	1248
Glu Arg Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Arg Leu Leu Gly Ala	
	380 385 390
aca gtg tac gcc gca gag tct agc tca ggc gcc cac agt gct agg aga	1296
Thr Val Tyr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala His Ser Ala Arg Arg	
	395 400 405 410
atc tca ggt gac ctt aaa gga ggc cat ctc gtt ctc gtt ctc atc ctt	1344
Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Val Leu Val Leu Ile Leu	
	415 420 425
ggt gcc ctc tcc ctg ttc ctt ttg gtg gcc ggg gcc ttt ggc ttt cac	1392
Gly Ala Leu Ser Leu Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Phe Gly Phe His	
	430 435 440
tgg tgg aga aaa cag ttg cta ctg aga aga ttt tct gcc tta gaa cat	1440
Trp Trp Arg Lys Gln Leu Leu Leu Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His	
	445 450 455
ggg att cag cca ttt ccg gct cag agg aag ata gag gag ctg gag cga	1488
Gly Ile Gln Pro Phe Pro Ala Gln Arg Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg	
	460 465 470
gaa ctg gag acg gag atg gga cag gag ccg gag ccc gag ccg gag cca	1536
Glu Leu Glu Thr Glu Met Gly Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro	
	475 480 485 490
cag ctg gag cca gag ccc agg cag ctc tga	1566
Gln Leu Glu Pro Glu Pro Arg Gln Leu *	
	495

5 <210> 2
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(22)
 <223> secuencia líder

15 <221> TRANSMEM
 <222> (442)...(466)

<221> DOMINIO
 <222> (432)...(441)
 <223> conector

20 <221> DOMINIO
 <222> (467)...(521)
 <223> cola citoplasmática

<400> 2

Met Arg Glu Asp Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Glu Ala Pro Val Val Ser Ser Gly Pro Gly Lys Glu Leu Pro Val Val
 20 25 30
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val His Leu Pro Cys Ser Leu Lys Ser
 35 40 45
 Pro Asn Leu Asp Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly Gly Val Ile Trp Gln
 50 55 60
 His Gln Pro Asp Ser Gly Gln Pro Thr Pro Ile Pro Ala Leu Asp Leu
 65 70 75 80
 His Gln Gly Met Pro Ser Pro Arg Gln Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Thr
 85 90 95
 Val Leu Ser Val Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Gln Pro Leu
 100 105 110
 His Pro His Val Gln Leu Glu Glu Arg Gly Leu Gln Arg Gly Asp Phe
 115 120 125
 Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Leu Arg Thr Asp Ala Gly Glu Tyr His
 130 135 140
 Ala Thr Val Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu Ser Cys Ser Leu Arg Leu
 145 150 155 160
 Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro Ser Gly Val Leu Lys
 165 170 175
 Leu Ser Asp Trp Val Leu Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg
 180 185 190
 Pro Val Ser Val His Trp Phe Gln Gly Gln Asn Arg Val Pro Val Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Pro Arg His Phe Leu Ala Glu Thr Phe Leu Leu Leu Pro Gln
 210 215 220
 Val Ser Pro Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys Val Leu Thr Tyr Arg
 225 230 235 240
 Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu Lys Val Leu Gly Leu
 245 250 255
 Glu Pro Val Ala Pro Leu Thr Val Tyr Ala Ala Glu Gly Ser Arg Val
 260 265 270
 Glu Leu Pro Cys His Leu Pro Pro Gly Val Gly Thr Pro Ser Leu Leu
 275 280 285
 Ile Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Glu Leu Pro Val Ala
 290 295 300
 Gly Lys Ser Gly Asn Phe Thr Leu His Leu Glu Ala Val Gly Leu Ala
 305 310 315 320
 Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Ile His Leu Gln Gly Gln Gln Leu
 325 330 335
 Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe
 340 345 350
 Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala
 355 360 365
 Ser Gly Lys Glu Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Asn Asn Leu Ser Arg
 370 375 380
 Ser Cys Pro Gly Pro Val Leu Glu Ile Gln Glu Ala Arg Leu Leu Ala
 385 390 395 400
 Glu Arg Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Arg Leu Leu Gly Ala
 405 410 415
 Thr Val Tyr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala His Ser Ala Arg Arg
 420 425 430
 Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Val Leu Val Leu Ile Leu
 435 440 445
 Gly Ala Leu Ser Leu Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Phe Gly Phe His
 450 455 460
 Trp Trp Arg Lys Gln Leu Leu Leu Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His
 465 470 475 480
 Gly Ile Gln Pro Phe Pro Ala Gln Arg Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg
 485 490 495
 Glu Leu Glu Thr Glu Met Gly Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510
 Gln Leu Glu Pro Glu Pro Arg Gln Leu
 515 520

<211> 1578
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1578)
<223> LAG-3 humana

10 <221> sig_peptide
<222> (1)..(66)

<400> 3

ES 2 439 580 T3

atg	tgg	gag	gct	cag	ttc	ctg	ggc	ttg	ctg	ttt	ctg	cag	ccg	ctt	tgg	48
Met	Trp	Glu	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Pro	Leu	Trp	
		-20					-15					-10				
gtg	gct	cca	gtg	aag	cct	ctc	cag	cca	ggg	gct	gag	gtc	ccg	gtg	gtg	96
Val	Ala	Pro	Val	Lys	Pro	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Val	Pro	Val	Val	
	-5					1			5						10	
tgg	gcc	cag	gag	ggg	gct	cct	gcc	cag	ctc	ccc	tgc	agc	ccc	aca	atc	144
Trp	Ala	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys	Ser	Pro	Thr	Ile	
				15					20					25		
ccc	ctc	cag	gat	ctc	agc	ctt	ctg	cga	aga	gca	ggg	gtc	act	tgg	cag	192
Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Trp	Gln	
			30					35					40			
cat	cag	cca	gac	agt	ggc	ccg	ccc	gct	gcc	gcc	ccc	ggc	cat	ccc	ctg	240
His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Leu	
		45					50					55				
gcc	ccc	ggc	cct	cac	ccg	gcg	gcg	ccc	tcc	tcc	tgg	ggg	ccc	agg	ccc	288
Ala	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Trp	Gly	Pro	Arg	Pro	
	60					65					70					
cgc	cgc	tac	acg	gtg	ctg	agc	gtg	ggt	ccc	gga	ggc	ctg	cgc	agc	ggg	336
Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Ser	Gly	
	75				80					85					90	
agg	ctg	ccc	ctg	cag	ccc	cgc	gtc	cag	ctg	gat	gag	cgc	ggc	cgg	cag	384
Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Gln	
				95					100					105		
cgc	ggg	gac	ttc	tcg	cta	tgg	ctg	cgc	cca	gcc	cgg	cgc	gcg	gac	gcc	432
Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala	
			110					115					120			
ggc	gag	tac	cgc	gcc	gcg	gtg	cac	ctc	agg	gac	cgc	gcc	ctc	tcc	tgc	480
Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys	
		125					130					135				
cgc	ctc	cgt	ctg	cgc	ctg	ggc	cag	gcc	tcg	atg	act	gcc	agc	ccc	cca	528
Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro	
	140					145					150					
gga	tct	ctc	aga	gcc	tcc	gac	tgg	gtc	att	ttg	aac	tgc	tcc	ttc	agc	576
Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser	
	155				160					165					170	
cgc	cct	gac	cgc	cca	gcc	tct	gtg	cat	tgg	ttc	cgg	aac	cgg	ggc	cag	624
Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Gln	
				175					180					185		
ggc	cga	gtc	cct	gtc	cgg	gag	tcc	ccc	cat	cac	cac	tta	gcg	gaa	agc	672
Gly	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser	
			190					195					200			

ttc	ctc	ttc	ctg	ccc	caa	gtc	agc	ccc	atg	gac	tct	ggg	ccc	tgg	ggc	720
Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly	
		205					210					215				
tgc	atc	ctc	acc	tac	aga	gat	ggc	ttc	aac	gtc	tcc	atc	atg	tat	aac	768
Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn	
	220					225					230					
ctc	act	gtt	ctg	ggt	ctg	gag	ccc	cca	act	ccc	ttg	aca	gtg	tac	gct	816
Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	
235				240						245					250	
gga	gca	ggt	tcc	agg	gtg	ggg	ctg	ccc	tgc	cgc	ctg	cct	gct	ggt	gtg	864
Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Ala	Gly	Val	
				255					260					265		
ggg	acc	cgg	tct	ttc	ctc	act	gcc	aag	tgg	act	cct	cct	ggg	gga	ggc	912
Gly	Thr	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	
			270					275					280			
cct	gac	ctc	ctg	gtg	act	gga	gac	aat	ggc	gac	ttt	acc	ctt	cga	cta	960
Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu	
		285					290					295				
gag	gat	gtg	agc	cag	gcc	cag	gct	ggg	acc	tac	acc	tgc	cat	atc	cat	1008
Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Ile	His	
	300					305					310					
ctg	cag	gaa	cag	cag	ctc	aat	gcc	act	gtc	aca	ttg	gca	atc	atc	aca	1056
Leu	Gln	Glu	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ile	Thr	
315					320					325					330	
gtg	act	ccc	aaa	tcc	ttt	ggg	tca	cct	gga	tcc	ctg	ggg	aag	ctg	ctt	1104
Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	
				335					340					345		
tgt	gag	gtg	act	cca	gta	tct	gga	caa	gaa	cgc	ttt	gtg	tgg	agc	tct	1152
Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Gln	Glu	Arg	Phe	Val	Trp	Ser	Ser	
			350				355						360			
ctg	gac	acc	cca	tcc	cag	agg	agt	ttc	tca	gga	cct	tgg	ctg	gag	gca	1200
Leu	Asp	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala	
		365					370					375				
cag	gag	gcc	cag	ctc	ctt	tcc	cag	cct	tgg	caa	tgc	cag	ctg	tac	cag	1248
Gln	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Cys	Gln	Leu	Tyr	Gln	
	380					385					390					
ggg	gag	agg	ctt	ctt	gga	gca	gca	gtg	tac	ttc	aca	gag	ctg	tct	agc	1296
Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Phe	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser	
	395				400					405					410	
cca	ggt	gcc	caa	cgc	tct	ggg	aga	gcc	cca	ggt	gcc	ctc	cca	gca	ggc	1344
Pro	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	
				415					420					425		
cac	ctc	ctg	ctg	ttt	ctc	acc	ctt	ggt	gtc	ctt	tct	ctg	ctc	ctt	ttg	1392
His	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	
			430					435					440			
gtg	act	gga	gcc	ttt	ggc	ttt	cac	ctt	tgg	aga	aga	cag	tgg	cga	cca	1440
Val	Thr	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	His	Leu	Trp	Arg	Arg	Gln	Trp	Arg	Pro	
		445					450					455				
aga	cga	ttt	tct	gcc	tta	gag	caa	ggg	att	cac	cct	ccg	cag	gct	cag	1488
Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	His	Pro	Pro	Gln	Ala	Gln	
	460					465					470					

agc aag ata gag gag ctg gag caa gaa ccg gag ccg gag ccg gag ccg 1536
 Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 475 480 485 490

gaa ccg gag ccc gag ccc gag ccc gag ccg gag cag ctc tga 1578
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu *

<210> 4
 <211> 525
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> SEÑAL
 10 <222> (1)...(22)

<221> TRANSMEM
 <222> (450)...(474)

15 <221> DOMINIO
 <222> (475)...(525)
 <223> COLA CITOPLASMÁTICA

<221> DOMINIO
 20 <222> (465)...(474)
 <223> PÉPTIDO CONECTOR

<400> 4

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Ala Asp Ala
 130 Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 260 Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 340 Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
 370 Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
 385 Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
 405 Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
 420 Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
 435 His Leu Leu Leu Phe Leu Thr Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 450 Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 Ser Lys Ile Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

<211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 5

Lys Ile Glu Glu Leu Glu
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(8)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

15

<400> 6

20

Gln xaa Lys Ile Glu Glu Leu Glu
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 7

Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 1 5 10

30

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35

<400> 8

Ile Tyr ser Thr Val Ala ser ser Leu

40

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

45

<400> 9

acatcaacca gacagtggcc a 21

50

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

55

<400> 10

gcatcccctg gtgaaggtc 19

60

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN

<213> *Mus musculus*
 <400> 11
 5 cccactccca tcccggccct 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> *Mus musculus*
 <400> 12
 15 tgtatgacct acccgaggtc 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> *Mus musculus*
 <400> 13
 ttaggatggt gccgttctg t 21
 25 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 30 <400> 14
 ccaatgccac attcaaagcc ctctcc 26
 35 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 15
 40 tccggtgtgt tgcctgtg 18
 <210> 16
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 16
 50 caaagtctgc agtgaccgtc a 21
 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> *Mus musculus*
 <400> 17
 60 catgggcacc ttctccgag gt 22
 <210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 65 <213> *Mus musculus*

ES 2 439 580 T3

<400> 18
cattgaaagc ctagaaagtc tgaataac 28

5 <210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10 <400> 19
tggctctgca ggatttcat g 21

15 <210> 20
<211> 32
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20 <400> 20
tcaccatcct tttgccagtt cctccagtam ra 32

25 <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 21

30 cccaggaaag acagcaacct t 21

<210> 22
<211> 21
<212> ADN

35 <213> *Mus musculus*

<400> 22

40 ttctacaac caggccactt g 21

<210> 23
<211> 28
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

45 <400> 23
atcctacca ctgctggcaa atggagtc 28

REIVINDICACIONES

1. Composición, que comprende:
 - 5 anticuerpos que se unen específicamente a CD223 y bloquean su capacidad para funcionar; y una vacuna contra el cáncer que comprende antígenos tumorales aislados o polipéptidos aislados que comprenden uno o más epítomos de antígenos tumorales.
2. Composición según la reivindicación 1, que es una composición farmacéutica.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1, en la que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
4. Kit que comprende:
 - 15 anticuerpos que se unen específicamente a CD223 y bloquean su capacidad para funcionar; y una vacuna contra el cáncer que comprende antígenos tumorales aislados o polipéptidos aislados que comprenden uno o más epítomos de antígenos tumorales.
- 20 5. Kit según la reivindicación 4, en el que dichos anticuerpos y vacuna están en recipientes separados.
6. Kit según la reivindicación 4, que comprende además instrucciones para la administración de componentes del kit a un paciente con cáncer.
- 25 7. Anticuerpo que se une específicamente a CD223 y bloquea su capacidad para funcionar y una vacuna contra el cáncer que comprende antígenos tumorales aislados o polipéptidos aislados que comprenden uno o más epítomos de antígenos tumorales para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 30 8. Anticuerpo que se une específicamente a CD223 y bloquea su capacidad para funcionar y una vacuna contra el cáncer que comprende antígenos tumorales aislados o polipéptidos aislados que comprenden uno o más epítomos de antígenos tumorales para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con células T reguladoras que suprimen una respuesta inmunitaria a una vacuna contra el cáncer.
- 35 9. Anticuerpo y vacuna contra el cáncer para su uso según la reivindicación 8, siendo el anticuerpo monoclonal.
10. Agente inhibidor de la proteína CD223 o ARNm de CD223 seleccionado de:
 - 40 un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD223 y bloquea su capacidad para funcionar; un oligonucleótido antisentido que se une específicamente a ARNm de CD223; una ribozima que se une específicamente a ARNm de CD223; una molécula de interferencia de ARN que se une específicamente a ARNm de CD223; y un constructo antisentido que codifica para dicho oligonucleótido antisentido, y una vacuna contra el cáncer que comprende antígenos tumorales aislados o polipéptidos aislados que comprenden uno o más epítomos de antígenos tumorales, para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero aumentando el número de células T en el mamífero.
11. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD223 y bloquea su capacidad para funcionar.
- 50 12. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor un constructo antisentido que expresa una molécula de ARN antisentido que es complementaria a al menos 7 nucleótidos de ARNm de CD223.
13. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor un oligonucleótido antisentido que es complementario a al menos 7 nucleótidos de ARNm de CD223.
- 55 14. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor una ribozima que se une específicamente a ARNm de CD223.
- 60 15. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor una molécula de interferencia de ARN que se une específicamente a ARNm de CD223.
16. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, en el que el mamífero es un paciente con cáncer.
- 65 17. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor para la administración

con una población de células T específica de tumor.

5

18. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor para la administración con un fármaco quimioterápico contra el cáncer.
19. Agente inhibidor para su uso según la reivindicación 10, siendo el agente inhibidor para la administración con anticuerpos contra el cáncer.

Fig. 1A

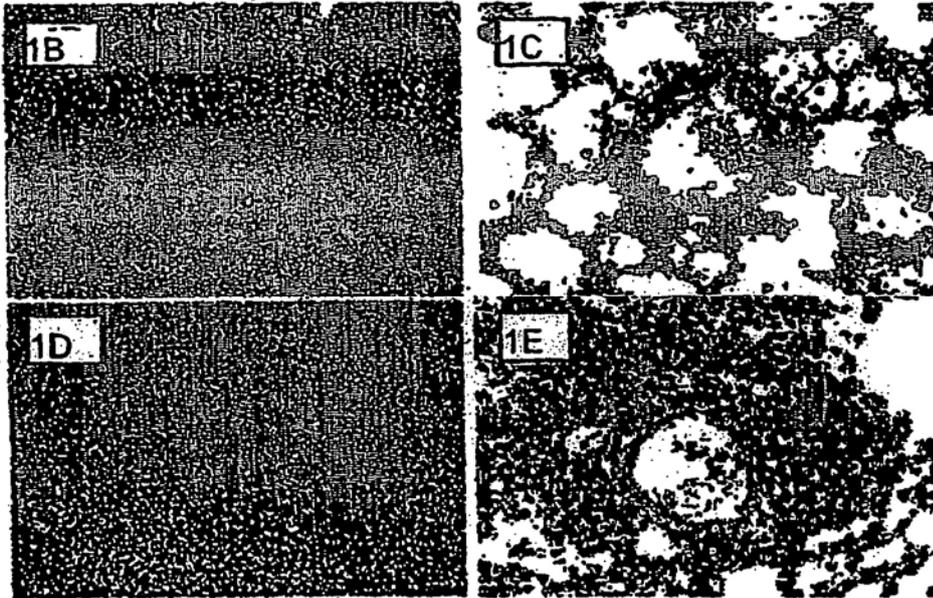
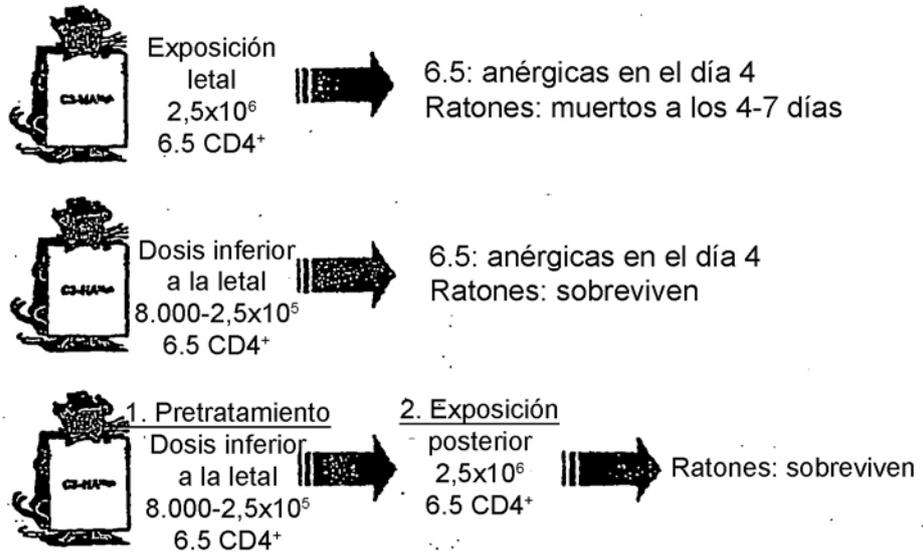


Fig. 2A

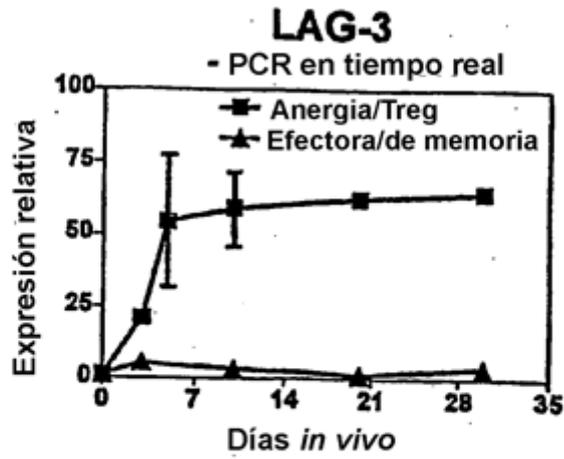


Fig. 2B

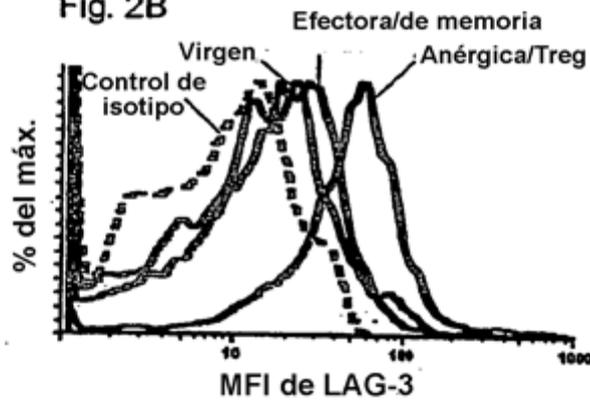


Fig. 2C

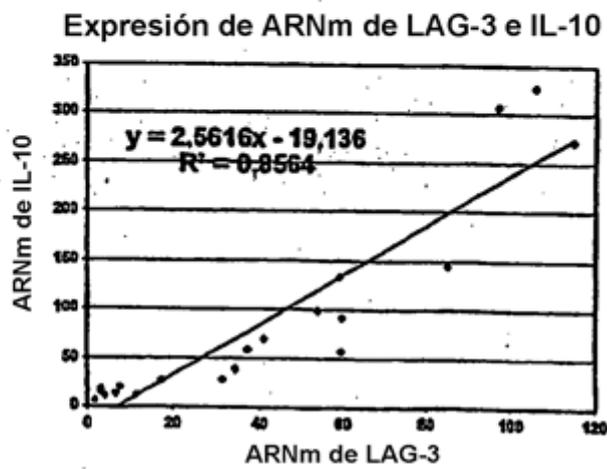


Fig. 3A

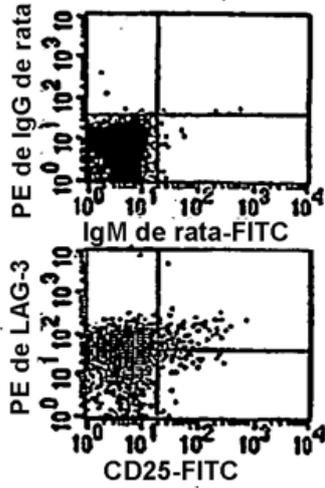


Fig. 3B

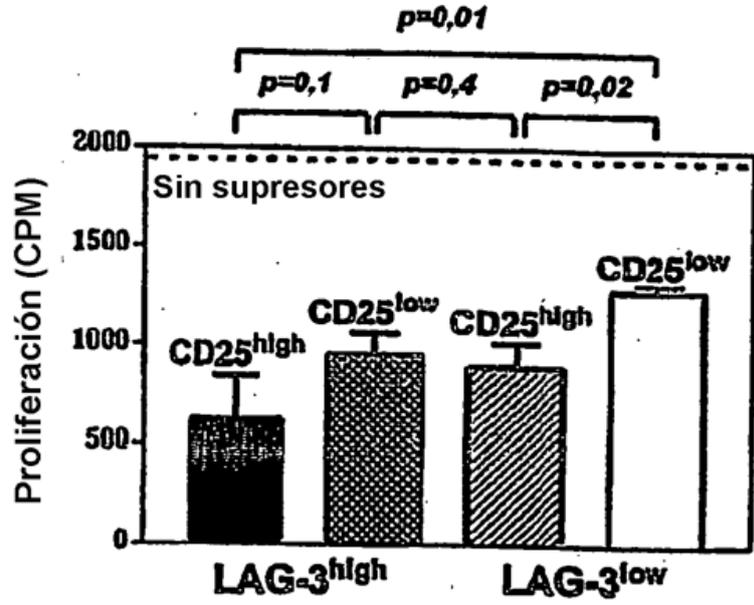


Fig. 4

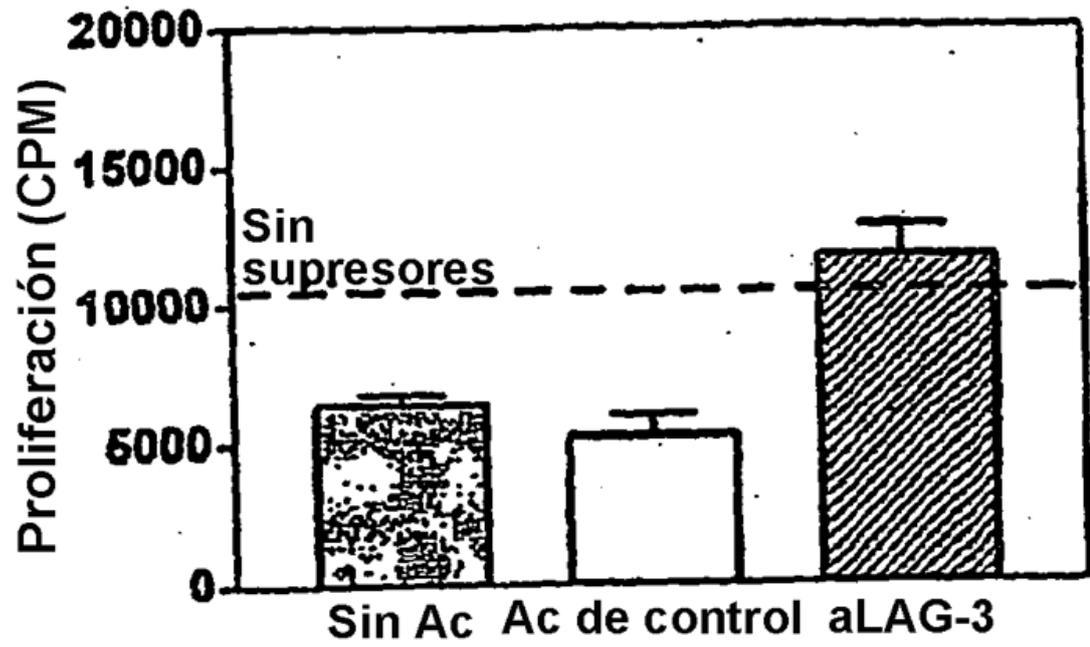


Fig. 5A



Fig. 5B

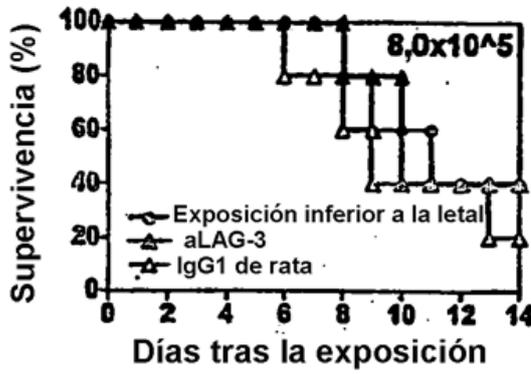


Fig. 5C

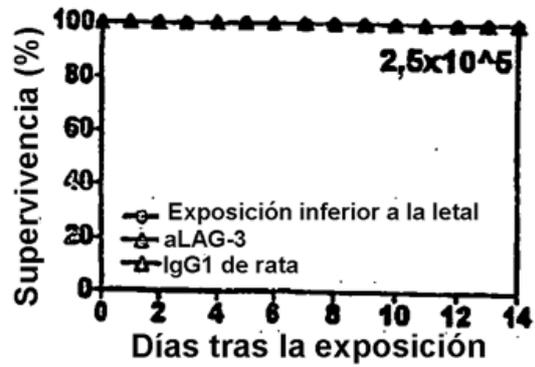


Fig. 6A

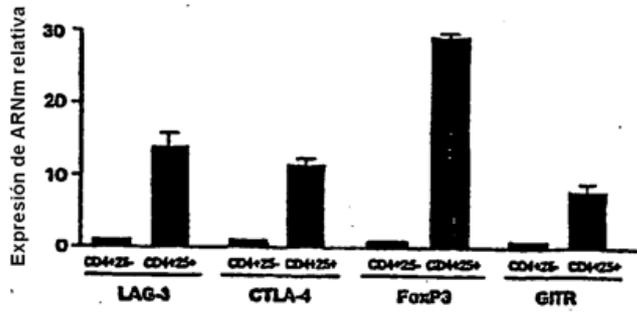


Fig. 6B

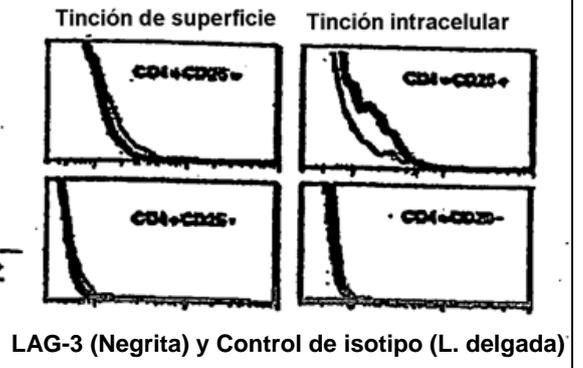


Fig. 6C

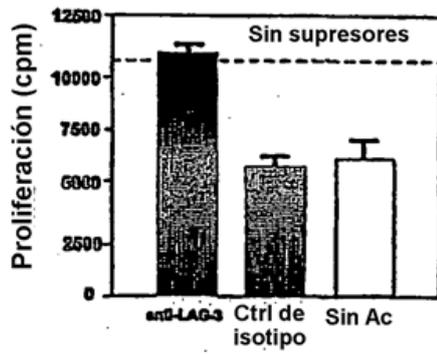


Fig. 6D

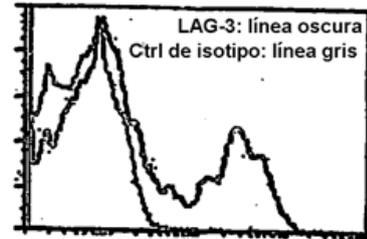


Fig. 7

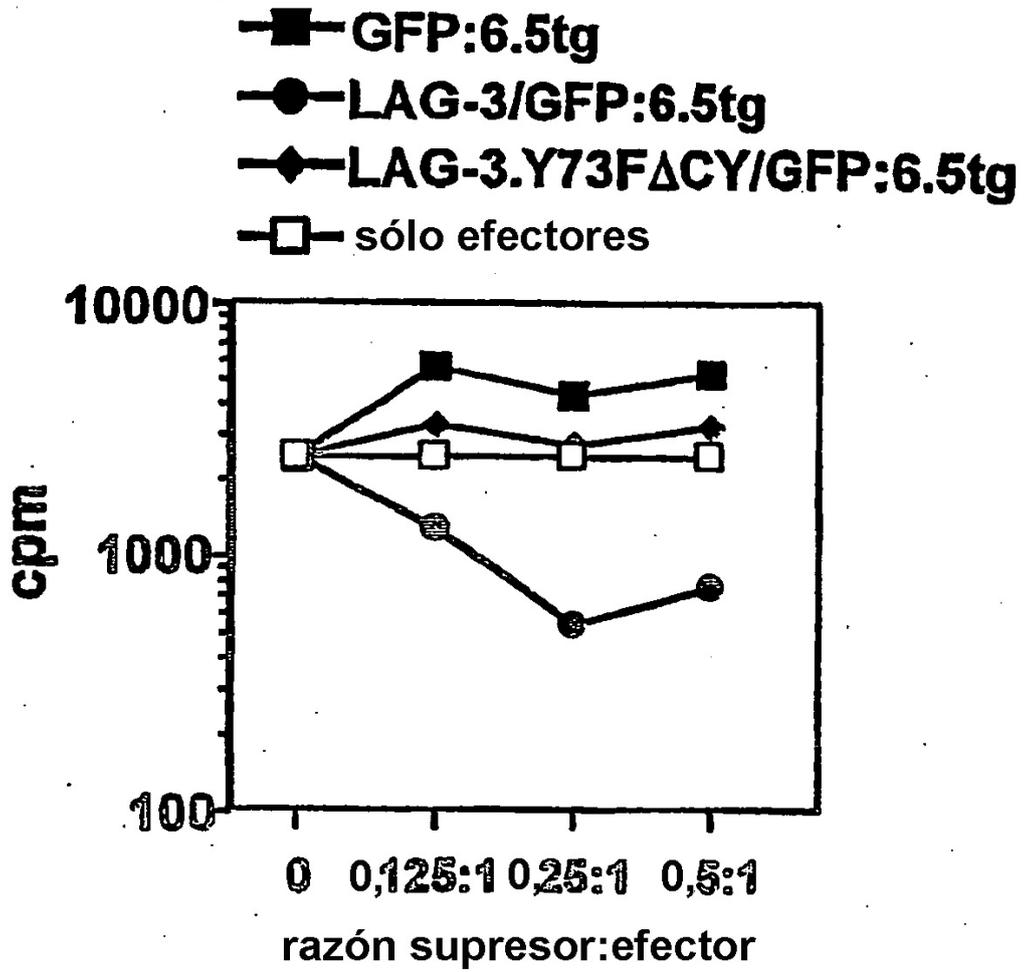


Fig. 8

