

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 502**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/25 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2007 E 07838099 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2069381**

54 Título: **Agentes y métodos para provocar una respuesta inmune antitumoral**

30 Prioridad:

13.09.2006 US 844240 P

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (50.0%)
412 Low Memorial Library 535 West 116th Street
New York, New York 10027, US y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GU, HUA;
JANG, IHNKYUNG;
HODES, RICHARD y
CHIANG, JEFFREY J.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 566 502 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes y métodos para provocar una respuesta inmune antitumoral

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente de los Estados Unidos serial No. 60/844.240 presentada el 13 de septiembre de 2006.

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno a través del programa de investigación intramural del NIH. Por lo tanto, el Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos.

10 Esta descripción de patente contiene material que es sujeto de protección por derechos de autor. El propietario de los derechos de autor no tiene objeción en que cualquier persona pueda hacer una reproducción en facsímil del documento de patente o de la divulgación de la patente ya que aparece en los archivo o registros de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, pero por lo demás se reserva todos y cada uno de los derechos de autor.

Antecedentes

15 Muchos de los tumores clínicos y experimentales expresan antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por infiltrados de CTL. Numerosas líneas de evidencia indican que los CTL que filtran el tumor pueden ser activados y expandidos con la vacunación apropiada. Sin embargo, a pesar del reconocimiento por las células T, la mayoría de los tumores antigénicos no son rechazados en el huésped. Los mecanismos que inhabilitan el rechazo del tumor mediado por CTL incluyen baja inmunogenicidad de los tumores tal como la subregulación de MHC y la interacción débil TCR-MHC-péptido, la supresión activa de la sensibilidad de las células T por el mismo tumor, incluyendo el factor de crecimiento beta de transformación derivado del tumor (TGF-beta) y moléculas solubles relacionadas con el MHC clase 1 (MIC), la prevención de la infiltración de células T por la barrera del tumor compuesta del estroma infiltrante, así como los mecanismos inmuno-reguladores del sistema inmune del huésped, tal como la supresión por las células t reguladoras CTLA-4, CD4⁺CD25⁺, e IL13 producidas por células T NK CD4⁺. Además, una amplia evidencia también indica que la carencia de un reconocimiento apropiado de las células tumorales por los CTL específicos del tumor tanto en la fase de cebado como en la fase efectora puede contribuir al silencio de una respuesta inmune antitumoral.

25 Señales para respuestas de células T productivas: La teoría de las dos señales

30 Se requieren dos señales para que las células T respondan a los antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno (APC) o células objetivo tales como células tumorales. El acoplamiento del receptor del antígeno de células T (TCR) con antígeno (complejos de péptido-MHC) proporcionan la señal inicial. La segunda señal, denominada coestimulación, se inicia por la interacción entre correceptores tales como CD28 sobre células T y los correspondientes ligandos tales como B7 expresados por las APC. Aunque la estimulación de las células T por las APC profesionales que portan tanto el antígeno como los ligandos coestimuladoras conduce a la proliferación de células T y la producción de citoquina, el acoplamiento del TCR con antígenos en ausencia de coestimulación trae como resultado la falta de sensibilidad de las células T, un estado llamado anergia. Un obstáculo importante en la vigilancia inmune del tumor es que la mayoría de las células tumorales no expresan ligandos co-estimuladoras, tales como B7. Por lo tanto, las células T que reconocen estas células tumorales por lo general no pueden ser completamente activadas y desarrolladas en células efectoras, dando como resultado la falla de la vigilancia inmune del huésped contra estos tumores.

La modulación del TCR y las señales coestimuladoras pueden revertir el estado silencioso de las células T citotóxicas específicas del tumor

40 Las respuestas inmunes contra tumores inmunogénicos son principalmente mediadas por células T, que incluyen los CTL CD8⁺ y las células T auxiliares CD4⁺. La masa del tumor tiene a menudo grandes cantidades de infiltrados de CTL. Sin embargo, estos CTL son principalmente no sensibles a los tumores, ya que son incapaces de ejercer la citotoxicidad a las cargas del tumor. Los experimentos han mostrado que el cebado *in vitro* de estos infiltrados a través del TCR en presencia de IL-2 exógeno podría activar estas células para proliferar y desarrollarse en los efectores de los CTL. Sin embargo, cuando estos CTL son transferidos en forma adoptiva en los animales portadores de tumores, a menudo no logran erradicar los tumores establecidos, a menos que se administren simultáneamente una vacuna apropiada, que altera la avidéz entre el TCR y el complejo MHC-péptido, así como una gran cantidad de interleuquina 2 (IL-2), lo que indica que la señalización del mejorada del TCR es esencial para superar la falta de sensibilidad de los CTL específicos del tumor. Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión reforzada de B7 en las células tumorales puede inducir respuestas fuertes de CTL, lo que eventualmente trae como resultado la erradicación de los tumores inoculados. Se ha logrado también un rechazo efectivo del tumor cuando se activan otras rutas de señalización coestimuladoras, tales como ICOS (molécula coestimuladora inducible), por las células tumorales que expresan al ligando B7HH/B7RP correspondiente. Por lo tanto, la modulación del TCR y las señales habituales pueden ser un enfoque terapéutico potencialmente poderoso contra el cáncer.

Aunque la expresión forzada de ligandos coestimuladoras en células tumorales puede inducir una fuerte respuesta de CTL contra los tumores que expresan antígeno, la aplicación de este enfoque en terapia clínica se ve obstaculizada por la falta de herramientas eficientes para el suministro de las moléculas coestimuladoras específicamente en las células tumorales *in vivo*. Un enfoque alternativo para inducir respuestas de CTL específicas del tumor es el uso de APC profesionales, tales como células dendríticas para presentar antígenos tumorales. Sin embargo, una limitación de este enfoque es que los tumores de inmunogenicidad débil, que son menos susceptibles a la función efectora de los CTL, pueden requerir señales coestimuladoras para aumentar la función de los CTL. Además, ya que las APC profesionales pueden presentar antígenos propios para un amplio espectro de células T, la transferencia adoptiva de las APC profesionales cargados con antígeno tumoral puede resultar en el desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas. La inmunoterapia tumoral es un enfoque prometedor que en una cantidad de modelos animales experimentales, así como en algunos ensayos clínicos, conduce a la regresión del cáncer primario y metastásico establecido. Sin embargo, los enfoques disponibles actualmente siguen siendo menos exitosos de lo deseado. Un obstáculo importante que aún tienen que ser superado se deriva de la observación de que la generación de respuestas efectivas de CTL contra tumores antigénicos requiere de señales coestimuladoras, y que muchos tumores no expresan los ligandos coestimuladores necesarios. Como resultado, las células T que reconocen estos tumores son a menudo no sensibles *in vivo*.

Las respuestas inmunes contra tumores inmunogénicos son mediadas por linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL). A pesar del reconocimiento por las células T, la mayoría de los tumores no son rechazados en el huésped. Los mecanismos que pueden evitar el rechazo del tumor mediado por CTL incluyen la inhibición de la sensibilidad de las células T por factores derivados del tumor, tal como el factor de crecimiento transformante β (TGF-β) y moléculas solubles relacionadas con MHC clase I secretadas por las células del tumor, así como regulación negativa del sistema inmune del huésped, incluyendo la señalización supresora de CTLA-4, el efecto de las células T reguladoras CD25⁺, y la supresión por IL-13 producida por células T NK CD4⁺. Además de estos mecanismos de supresión activa, la falta de reconocimiento efectivo de los tumores por las células T puede desactivar una respuesta inmune antitumoral, por ejemplo en ausencia de TCR y/o de señales coestimuladoras. Por lo tanto, subsiste la necesidad de identificar agentes y métodos que permitan y/o mejoren las respuestas inmunes antitumorales en ausencia de señales coestimuladoras.

Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una población aislada, sustancialmente purificada, de células que comprende células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la presente memoria.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una población aislada, sustancialmente purificada, de células que comprende células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b para uso de acuerdo con la reivindicación 2 en la presente memoria.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para elaborar una célula T CD8⁺ que no requiere de estimulación a través de un correceptor con el fin de que la célula se active o prolifere en respuesta al contacto a través de su receptor de célula T. Tales métodos se basan en la función de reducción/eliminación de Cbl-b, la reducción/eliminación de la expresión génica de Cbl-b, o la desactivación del gen mismo de Cbl-b.

La descripción proporciona un método para estimular, expandir, proliferar o inducir células T CD8⁺ en una forma que no requiera de coestimulación del correceptor, comprendiendo el método, o en ciertas realizaciones consistiendo los métodos esencialmente en: (a) proporcionar células T CD8⁺, y (b) reducir la actividad de Cbl-b en las células T CD8⁺, estimulando, expandiendo, proliferando, o induciendo células T CD8⁺ en una forma en la que CD28 no fue coestimulada. Los niveles de Cbl-b y de actividad pueden ser reducidos por cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo mediante el suministro de un ARN inhibidor de la SEQ ID No: 1 en las células T CD8⁺.

La descripción proporciona una población aislada, purificada de células humanas que comprenden células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b. En ciertos aspectos, la población comprende aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% de células T CD8⁺. La descripción proporciona una población aislada, purificada de células humanas que consiste esencialmente de células T CD8⁺ con actividad reducida Cbl-b. En ciertos aspectos, las células T CD8⁺ son aisladas de infiltradas de tumor de un sujeto que padece un tumor, y son modificadas para reducir el nivel de Cbl-b en las células T CD8⁺.

La descripción proporciona un método para inducir una respuesta inmune antitumoral en un sujeto, comprendiendo el método: (a) proporcionar una población de células (ya sea del sujeto o de otra fuente) que comprende células T CD8⁺, (b) reducir la actividad de Cbl-b en las células T CD8⁺, (c) administrar las células de la etapa (b) al sujeto. La descripción proporciona un método para inducir o mejorar una respuesta inmune antitumoral en un sujeto, comprendiendo el método: (a) proporcionar una población de células que comprende células T CD8⁺, con actividad reducida de Cbl-b en las células T CD8⁺, (b) administrar las células de la etapa (a) al sujeto. En ciertos aspectos, la

- 5 población que comprende células T CD8⁺ se aísla de infiltrados tumorales de un sujeto. En ciertos aspectos, la población comprende aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% células T CD8⁺. En ciertos aspectos, la población purificada de células consiste esencialmente de células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b. En ciertos aspectos, la respuesta inmune antitumoral inducida o mejorada es una respuesta inmune específica del antígeno tumoral. En ciertos aspectos, la respuesta inmune antitumoral inducido o mejorado es al menos mediada por células T CD8⁺ que tienen un receptor de células T (TCR) que es específico para un antígeno o antígenos de tumor.
- 10 En cierto aspecto, la población de células se deriva de una línea de células clonales que expresan un receptor de células T predeterminado (TCR). En otro aspecto, el TCR reconoce un antígeno tumoral. En ciertos aspectos, las células T CD8⁺ se proporcionan a partir de un clon de células T CD8⁺. En ciertos aspectos, el clon de células T CD8⁺ comprende un transgén del TCR. En ciertos aspectos, la transgén es específico para un antígeno tumoral. En ciertos aspectos, el antígeno tumoral es un antígeno específico del tumor.
- 15 La descripción proporciona un método para inducir una respuesta inmune antitumoral en un sujeto que padece un tumor, comprendiendo el método: (a) aislar del sujeto una población de células que comprende células T CD8⁺, (b) reducir la actividad de Cbl-b en las células T CD8⁺ o la ablación de Cbl-b en las células T CD8⁺, y (c) administrar las células de la etapa (b) al sujeto. En ciertos aspectos, la población que comprende las células T CD8⁺ se aísla de infiltrados tumorales de un sujeto. En cierto aspectos, la población comprende aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% células T CD8⁺. En ciertos aspectos, la población purificada de células consiste esencialmente de células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b.
- 20 En ciertos aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional de estimulación de la población que comprende células T CD8⁺ para que proliferen. En otros aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional de estimulación de la población de células T CD8⁺ para que proliferen en presencia de células tumorales aisladas del sujeto, para aumentar el número de células T CD8⁺ específicas del tumor, incluyendo las células T CD8⁺ funcionalmente deficientes/sometidas a ablación en Cbl-b. En otros aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional de separación de las células T CD8⁺ de la población de células y la estimulación de las células T CD8⁺ con células tumorales aisladas del sujeto para aumentar el número de células T CD8⁺ específicas del tumor. En ciertos aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional adicional que comprende poner en contacto las células T CD8⁺ específicas del tumor con un anticuerpo anti-CD3, o IL-2, o una combinación de los mismos, para aumentar adicionalmente el número de células T CD8⁺ específicas del tumor, incluyendo las células T CD8⁺ funcionalmente deficientes/sometidas a ablación en Cbl-b. Las etapas opcionales se pueden realizar antes o después de la etapa de reducción de la actividad de Cbl-b. En ciertos aspectos, las células T CD8⁺ se aíslan de infiltrados tumorales. En ciertos aspectos, las células T CD8⁺ son policlonales. En ciertos aspectos, las células T CD8⁺ se aíslan a partir de órganos sanguíneos o linfáticos periféricos. En ciertos aspectos, la proliferación de las células T CD8⁺ se estimula con anticuerpo anti-CD3, o la exposición a IL-2, o una combinación de los mismos.
- 25 En ciertos aspectos, la reducción o ablación de la actividad de Cbl-b se logra mediante uno o más de: (i) poner en contacto las células T CD8⁺ con un agente químico que inhibe la expresión o actividad de Cbl-b, (ii) la introducción de ARNi de la SEQ ID NO: 1 (5'-CAGGAGTATGAGACAGAAG-3'), que dirige Cbl-b en las células T CD8⁺, (iii) desactivar el gen que codifica Cbl-b, o cualquier método adecuado, (iv) la introducción de una forma dominante negativa de Cbl-b. En ciertos aspectos, las moléculas de ARNi, o las formas Cbl-b negativas dominantes pueden ser expresadas por vectores retrovirales que pueden comprender un marcador fluorescente, pero no limitado a una GFP o cualquiera de sus variantes, permitiendo así distinguir y/o aislar células, incluyendo células T CD8⁺, que tienen actividad de Cbl-b reducida/ablacionada. En ciertos aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional de separar específicamente células T CD8⁺, que tienen actividad de Cbl-b reducida/ablacionada. En ciertos aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional adicional de estimular la población que comprende las células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b para que proliferen.
- 30 En ciertos aspectos, la reducción o ablación de la actividad de Cbl-b se logra mediante uno o más de: (i) poner en contacto las células T CD8⁺ con un agente químico que inhibe la expresión o actividad de Cbl-b, (ii) la introducción de ARNi de la SEQ ID NO: 1 (5'-CAGGAGTATGAGACAGAAG-3'), que dirige Cbl-b en las células T CD8⁺, (iii) desactivar el gen que codifica Cbl-b, o cualquier método adecuado, (iv) la introducción de una forma dominante negativa de Cbl-b. En ciertos aspectos, las moléculas de ARNi, o las formas Cbl-b negativas dominantes pueden ser expresadas por vectores retrovirales que pueden comprender un marcador fluorescente, pero no limitado a una GFP o cualquiera de sus variantes, permitiendo así distinguir y/o aislar células, incluyendo células T CD8⁺, que tienen actividad de Cbl-b reducida/ablacionada. En ciertos aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional de separar específicamente células T CD8⁺, que tienen actividad de Cbl-b reducida/ablacionada. En ciertos aspectos, los métodos comprenden una etapa opcional adicional de estimular la población que comprende las células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b para que proliferen.
- 35 La invención proporciona un método para identificar un agente que afecta la expresión o actividad Cbl-b, comprendiendo el método: (a) la estimulación de una célula T CD8⁺ con un anticuerpo anti-CD3 en ausencia de coestimulación (con un anticuerpo anti-CD28), (b) poner en contacto la célula T CD8⁺ con un agente candidato, (c) medir los niveles de estimulación o proliferación de células T CD8⁺, en donde un agente que conduce a la estimulación o proliferación de células T CD8⁺ es indicativo de un agente que subregula la baja la actividad o expresión de Cbl-b. En ciertos aspectos, la estimulación de las células se mide por el nivel de expresión de citoquinas. En ciertos aspectos, poner en contacto la célula con un agente puede hacerse antes, después, o durante la estimulación de la célula con un anticuerpo anti-CD3 en ausencia de coestimulación con un anticuerpo anti-CD28.
- 40 La descripción proporciona un método de cribado para identificar un agente que afecta la actividad de Cbl-b, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una fuente de Cbl-b con un agente, (b) determinar si el agente (i) disminuye la actividad de Cbl-b, o (ii) afecta la proliferación de células T no modificadas inducidas por TCR, o la submodulación o la supresión de TGF-beta de la proliferación de células T. En este método, si el agente disminuye la submodulación de TCR inducida por TCR, mejora la proliferación de células T no modificadas inducidas por TCR, o elimina la supresión de TGF-beta, entonces esto es indicativo de que el agente puede disminuir la actividad de
- 45
- 50
- 55

Cbl-b. En ciertos aspectos, el método puede comprender además una etapa para determinar si el agente se une a Cbl-b. En ciertos aspectos, la fuente es: una célula que comprende proteína Cbl-b, un extracto celular que comprende proteína Cbl-b, una proteína Cbl-b recombinante, una proteína Cbl-b purificada, una proteína Cbl-b aislada, o un polipéptido Cbl-b sintético.

5 La descripción proporciona un método para tratar un tumor en un sujeto, comprendiendo el método la administración de un agente, que incluye un agente tal como se identifica en esta memoria por los métodos de cribado, que inhibe la actividad de Cbl-b, en donde el agente induce una respuesta inmune antitumoral. En un aspecto, el agente induce o mejora una respuesta antitumoral de células T CD8⁺. En un aspecto, la respuesta antitumoral de células T CD8⁺ es específica del antígeno del tumor. En ciertos aspectos, el agente comprende una molécula de ARNi, por ejemplo
10 ARNi de la SEQ ID NO: 1 (5'-CAGGAGTATGAGACAGAAG-3').

En ciertos aspectos, el sujeto tratado por cualquiera de los métodos en la presente memoria sufre de cualquiera de los siguientes tipos de tumores: melanoma, linfoma, por ejemplo linfomas espontáneos desarrollados por pacientes con ATM, o cualquier tumor sólido que expresa MHC-I con un antígeno que puede ser reconocido por CTL. En ciertos aspectos, el sujeto es un animal que pueden desarrollar tumores, tales como un humano, canino, felino,
15 roedor, y similares.

Un desafío importante a los esfuerzos encaminados a inducir una respuesta inmune antitumoral efectiva es que las células T CD8⁺, que desempeñan un papel destacado en estas respuestas, puede ser incapaz de responder a los tumores que carecen de señales coestimuladoras, lo que a menudo resulta en tolerancia o anergia de las células T específicas del tumor. La descripción establece que la activación *in vitro* o *in vivo* de las células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b (por ejemplo, pero no limitado a, células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}), no depende de la coestimulación de CD28. Por ejemplo, ratones Cbl-b^{-/-} *in vivo*, pero no controles de tipo silvestre, rechazan de manera eficiente linfomas E.G7 y EL4 que no expresan ligandos B7. La descripción también muestra que la introducción de una mutación de Cbl^f en ratones con ATM^{-/-} reduce marcadamente la incidencia de linfomas tímicos espontáneos que se producen en ratones con ATM^{-/-}. Un estudio inmunohistológico muestra que los tumores E.G7 de ratones Cbl-b^{-/-} pero no de tipo silvestre, contienen una infiltración masiva de células T CD8⁺. Por lo tanto, en ciertos aspectos, la descripción establece que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} purificadas, pero no de células T CD8⁺ de tipo silvestre, conduce a una erradicación eficaz de tumores establecidos. La descripción establece que la ablación de Cbl-b en las células T CD8⁺ se puede utilizar en un método para provocar respuestas inmunitarias contra los tumores.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para inducir una respuesta antitumoral por la transferencia adoptiva a un sujeto de células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b. En ejemplos no limitantes, células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden ser ampliamente eficaces contra una amplia clase de tumores somáticos, la mayoría de los cuales no expresan ligandos coestimuladores. La capacidad de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} para producir respuestas sustanciales de citoquina y para actuar de forma independiente de coestimulación con CD28 y ayuda de células T CD4⁺ podría evitar la necesidad de administrar grandes cantidades de citoquinas o de inmunizar a los pacientes con vacunas diseñadas para mejorar la señalización coestimuladora y las respuestas de células T auxiliares. En ciertos aspectos, se podría mejorar el uso clínico de linfocitos que infiltran tumores (TIL) en la inmunoterapia adoptiva, mediante la ablación de Cbl-b. La ablación de la función de Cbl-b puede lograrse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo pero no limitado a ARNi o la expresión de una forma negativa dominante del gen *cbl-b*.

40 La descripción proporciona métodos para inducir una respuesta inmune contra un tumor en un sujeto, incluyendo, pero no limitado a, los métodos de transferencia adoptiva, que no requieren de la coadministración al sujeto de citoquinas y/o componentes de vacuna exógenos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la proliferación independiente de CD28 y la producción de citoquinas por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}. La figura 1a muestra la producción de IL-2 e IFN-γ. Las células T CD8⁺ purificadas a partir de ratones tipo silvestre (TS) y Cbl-b^{-/-}, fueron estimuladas ya sea con anticuerpo anti-CD3 unido a la placa o anticuerpos anti-CD3 unido a la placa + anticuerpos anti-CD28 solubles. Se visualizaron las células productoras de IL-2 e IFN-γ por tinción intracelular y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran las gráficas de contorno de la tinción intracelular para la expresión de IL-2 e IFN-γ en células T CD8⁺. Los porcentajes de células productoras de IL-2 e IFN-γ se indican en las gráficas. La figura 1b muestra la respuesta proliferativa inducida por TCR. Las células T CD8⁺ purificadas a partir de nodos linfáticos y de bazo de ratón Cbl-b^{-/-} y de tipo silvestre fueron estimuladas con diversas concentraciones de anticuerpos anti-CD3 en presencia o en ausencia de anticuerpos anti-CD28. La proliferación celular se determinó por incorporación de ³[H]-timidina y se expresó como la media +/- DE de muestras por triplicado. Se muestran los representantes de más de tres experimentos independientes. Las Figuras 1c, d muestra la resistencia de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} a la supresión de TGF-β. Los histogramas (Fig. 1c) muestran intensidades de CSFE de células T CD8⁺ de TS y marcadas con Cbl-b^{-/-} después de 3 días de estimulación anti-CD3 y anti-CD28. Las células se cultivaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de TGF-β, como se indica en la figura. Las
45
50
55

gráficas de contorno (Fig. 1d) muestran la producción de IFN- γ en ausencia o en presencia de TGF- β . Los porcentajes de células IFN- γ + se indican en las gráficas.

5 La Figura 2 muestra la erradicación de los tumores inoculados en ratones Cbl-b^{-/-}. La Figura 2a muestra las tasas de crecimiento de tumores inoculados con E.G7. Se inocularon 10⁶ células E.G7 en los costados de ratones Cbl-b^{-/-} o de tipo silvestre (TS) mediante inyección subcutánea. Se documentó el crecimiento del tumor como el volumen total del tamaño del tumor. En la parte superior se muestran las tasas de crecimiento de los tumores E.G7 en un experimento representativo. Cada curva representa un ratón individual. Las barras inferiores representan los porcentajes de ratones con crecimiento tumoral al final de la séptima semana después de la inoculación del tumor. La Figura 2b y la Figura 2c muestran las tasas de crecimiento de tumores EL4. Se inyectaron dosis bajas (5 x 10⁴ células/ratón) y dosis altas (2,5 x 10⁵ células/ratón) de células EL4 por vía subcutánea en los costados de cinco ratones TS y 5 ratones Cbl-b^{-/-}, respectivamente. Los diagramas muestran resultados respectivamente representativos de 4 o 2 experimentos independientes inoculados ya sea con tumores de baja dosis (Figura 2b) o de dosis alta (Fig.2c). Cada curva representa un ratón individual. La Figura 2d muestra los porcentajes de ratones supervivientes (TS, n = 13; Cbl-b^{-/-}, n = 29) durante el transcurso del crecimiento del tumor. Cuando el volumen del tumor alcanza aproximadamente 5.000 mm³, se sacrificaron los ratones y se registraron como muertos. La Figura 2e muestra de rechazo de tumores EL4 por ratones Cbl-b^{-/-}CD28^{-/-}. Se inyectaron células EL4 (5 X 10⁴ células/ratón), y se hizo seguimiento al crecimiento del tumor como se describe en B. El número de ratones con crecimientos tumorales se indica en la parte superior de cada columna.

20 La Figura 3 muestra que el rechazo del tumor en ratones Cbl-b^{-/-} es mediado por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}. La Figura 3a muestra la inmunohistología de las células CD8⁺ que infiltran el tumor. Se muestran las secciones de tumores teñidos con H&E (izquierda) o anticuerpo anti-CD8 (derecha). Las células CD8⁺ son las células positivas para FITC (verde). Los tumores eran de ratones Cbl-b^{-/-} y de tipo silvestre (TS) y a los 7 o 19 días después de la inoculación. La Figura 3b muestra el análisis por citometría de flujo de infiltrados tumorales. Se prepararon infiltrados tumorales de tumores de ratones de tipo silvestre (TS) o Cbl-b^{-/-}. Estas células se tiñeron con anticuerpo anti-TCR β , anti-CD8 y anti-CD44 y se analizaron en LSR II. En la parte superior izquierda se muestran las gráficas de contorno de la expresión de CD8 y TCR β en células que infiltran el tumor. Los porcentajes de células CD8⁺ TCR β ⁺ se indican en las gráficas. Los porcentajes de células T CD8⁺ TCR β ⁺ en los infiltrados tumorales totales se resumen y se muestran como barras (arriba a la derecha). Los histogramas (abajo) muestran los niveles de expresión de TCR β y CD44 en las células T CD8⁺ infiltrantes. La Fig.3c, erradicación de tumores E.G7 establecidos por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} transferidos en forma adoptiva. Se inocularon 10⁶ células E.G7 en ratones C57BL/6 mediante inyección subcutánea. Siete días después de la inoculación, se transfirieron 3 x 10⁶ células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} o de tipo silvestre (TS) en los ratones portadores de tumores mediante inyección intravenosa. Se muestran los volúmenes de los tumores en diferentes puntos de tiempo después de la transferencia de células T CD8⁺. Las curvas representan el tamaño de los tumores en ratones individuales. Las barras rellenas (abajo) representan porcentajes de ratones con tumor. El número total de ratones incluidos en estos experimentos se indican en la gráfica. La Figura 3d muestra el análisis por citometría de flujo de infiltrados tumorales. Los infiltrados tumorales se prepararon a partir de tumores de ratones Cbl-b^{-/-} o de TS. Estas células se tiñeron con anticuerpos anti-TCR β , anti-CD8, anti-CD4 y anti-CD44 y se analizaron en LSR II. Se identificaron las células Foxp3⁺ (Treg) por tinción intracelular con un anticuerpo anti-Foxp3 de acuerdo al protocolo del fabricante. En la parte superior izquierda se muestran las gráficas de contorno de la expresión de CD8 y TCR β en células infiltrantes de tumor de 1 a 3 experimentos independientes. Los porcentajes de células CD8⁺ TCR β ⁺ se indican en las gráficas. Los porcentajes de infiltrados de CD8⁺ TCR β ⁺, CD4⁺, y Treg en los infiltrados tumorales totales se resumen y se muestra como barras.* P <0,001, ** P <0,005. Los histogramas muestran los niveles de expresión de TCR β y CD44 en las células T CD8⁺ infiltrantes. La Figura 3e muestra la erradicación de tumores E.G7 establecidos por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} o Cbl-b^{-/-} OT1 adoptivamente transferidas. Se inocularon 10⁶ células E.G7 en ratones C57BL/6 mediante inyección subcutánea. Siete días después de la inoculación, se transfirieron 3 x 10⁶ células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} OT1 o TS OT1 (abajo) o células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} o TS purificadas (arriba) en ratones portadores de tumores mediante inyección intravenosa. A la izquierda se muestran los volúmenes de los tumores en diferentes puntos de tiempo después de la transferencia de células T CD8⁺. Los genotipos de las células del donante se indican en la parte superior de cada gráfica. Los resultados son de 1 de 5 o más experimentos independientes. La Figura 3f muestra los porcentajes de ratones receptores sobrevivientes (TS, n = 11; Cbl-b^{-/-}, n = 13) que recibieron células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} o TS. Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 5.000 mm³, se sacrificaron los ratones fueron y se registraron como muertos.

55 La Figura 4 muestra el análisis de Kaplan-Meier de la incidencia de tumores en ratones mutantes dobles Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-}. La supervivencia libre de linfoma tímico se representa gráficamente en función del tiempo en días para ratones Cbl-b^{-/-}, ATM^{-/-} (n = 25) y Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} (n = 21). Los ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} exhibieron una incidencia reducida de linfoma espontáneo.

60 La Figura 5 muestra la producción de IL-2 e IFN- γ de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en presencia de células T CD4⁺. Las células T totales de ratones de tipo silvestre (TS) o Cbl-b^{-/-} se estimularon con anticuerpo anti-CD3 solo unido a la placa o anticuerpos anti-CD3⁺ anti-CD28 solubles. Se determinó la producción de IL-2 e INF- γ mediante tinción intracelular y se analizó por citometría de flujo. Los porcentajes de células productoras de IL-2 e INF- γ se indican en las gráficas. Los resultados muestran que la producción de IL-2 e INF- γ por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} fue

significativamente más alta que la de las células T CD8⁺ de TS después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 incluso en presencia de células T CD4⁺.

5 La Figura 6 muestra que la activación de células T de Cbl-b^{-/-} suprime la dependencia de la coestimulación con CD28. La figura 6a muestra proliferación de células T *in vitro* y la producción de IL-2. Se purificaron células T CD4⁺ de bazo de ratones Cbl-b^{-/-} y de tipo silvestre usando un kit de purificación de células T CD4⁺ (Accurate). Se estimularon las células T CD4⁺ purificadas (10⁵ células/pozo, placa de 96 pozos) ya sea con anticuerpo anti-CD3 solo unido a la placa (2C11, 5 µg/ml), o con anticuerpos anti-CD3 (unido a la placa) y anti-CD28 (soluble) (37,51, 2 µg/ml). Se determinó la proliferación celular y la secreción de IL-2 de acuerdo con un protocolo publicado (56, 60).
 10 La figura 6b muestra que la mutación de Cbl-b^{-/-} rescata la respuesta de anticuerpos dependiente de T en ratones CD28^{-/-}. Para el ensayo de proliferación de células T (izquierda), se purificaron células T CD4⁺ de bazo y se determinó la proliferación celular, después de la estimulación con anticuerpos anti-CD3, anti-CD3 y anti-CD28 o con PMA e ionomicina, como se describió anteriormente. Para las respuestas de anticuerpo dependientes de T (derecha), se inmunizaron ratones Cbl-b^{-/-} CD28^{-/-}, Cbl-b^{-/-}, CD28^{-/-} y de tipo silvestre con 100 µg de NP-KLH en adyuvante de alumbre por inyección intraperitoneal. Diez días después, se tomaron muestras de sangre de los ratones, y se determinaron los títulos de anticuerpos anti-NP de diversos isotipos de Ig por ELISA. Se presentaron arbitrariamente los títulos de anticuerpos anti-NP de diverso isotipos de Ig en ratones de tipo silvestre como 100%. Los datos representan valores medios de los títulos de anticuerpos de 5-8 ratones (de 2-3 meses de edad) de cada genotipo.

20 La Figura 7 muestra la activación independiente CD28 de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}. Se purificaron las células T de ganglios linfáticos de ratones C57BL/6 (B6) o Cbl-b^{-/-}, mediante MACS, estimuladas ya sea con anticuerpo anti-CD3 solo unido a la placa (5 µg/ml) o en combinación con anticuerpos anti-CD28 solubles (2 µg/ml). Veinte horas después, se añadieron 10 µg/ml de Brefeldina A en el cultivo para bloquear la secreción de citoquinas. Se cultivaron las células durante 3 horas adicionales. Después de la permeabilización, se tiñeron las células con anticuerpos anti-CD8 (PE) y anti-IL-2 (FITC) (Figura 7a) o anti-γ (FITC) (Figura 7b) y luego se analizaron en un LSR II. Se indican los porcentajes de células positivas para IL-2 e IL-γ CD8⁺ o CD8⁺. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

30 La figura 8 muestra la resistencia de ratones Cbl-b^{-/-} a tumores E.G7, EL4 o B16 implantados. La Figura 8a y la Figura 8b muestran el rechazo de los tumores E.G7 por ratones Cbl-b^{-/-}. Se inocularon aproximadamente 10⁶ células por ratón en forma subcutánea en ratones hembra compañeros de camada de tipo silvestre (TS) y Cbl-b^{-/-} (8 semanas de edad) en el día 0. Se determinaron las tasas de crecimiento de los tumores inoculados mediante los tamaños de los tumores y se graficaron en diámetro de acuerdo a (36) (Figura 8a). Las tasas de mortalidad representan el porcentaje de ratones que murieron ya sea dentro de las 5 semanas después de la inoculación del tumor o que se sacrificaron cuando el tamaño de los tumores se hizo más grande de 20 mm de diámetro (Figura 8b). Los resultados representan el 10 ratones C57BL/6 y 18 Cbl-b^{-/-}. La Figura 8c y la Figura 8d muestran el rechazo de los tumores EL4 y B16 por los ratones Cbl-b^{-/-}. <se inocularon 2,5 x 10⁴ células EL4 o 1,0 x 10⁴ células B16 en los costados de los ratones C57BL/6 o Cbl-b^{-/-} (8-10 semanas de edad) por inyección subcutánea.

35 La Figura 9 muestra que los ratones Cbl-b^{-/-} con reducida cantidad de células T son susceptibles a tumores E.G7. La Figura 9a muestra el agotamiento de las células T. Se inyectaron anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (100 µg/ratón) en ratones Cbl-b^{-/-} en forma diaria por inyección intravenosa durante 3 días consecutivos. Dos días después de la última inyección, se sacrificaron los ratones, y se analizaron las células del bazo y de los ganglios linfáticos mediante FACS. Se tiñeron las células con anticuerpos anti-CD3 (un marcador de células T) y anti-B220 (un marcador de células B) o con anti-CD4 y anti-CD8, respectivamente. La Figura 9b muestra el crecimiento de tumores E.G7 en ratones Cbl-b^{-/-} con cantidad reducida de células T. Se inyectaron aproximadamente 10⁶ células E.G7 en forma subcutánea en los costados de los ratones Cbl-b^{-/-} tratados con anticuerpo anti-CD4 y anti-CD8 (anti-CD4,8) (negro) (n = 3) y no tratados (NT) (rojo) (n = 5), respectivamente. La tasa de crecimiento de los tumores se documentó semanalmente.

40 La Figura 10 muestra la infiltración de células CD8⁺ en tejido tumoral de E.G7. Se inocularon 1x10⁶ células E.G7 en forma subcutánea en los costados de ratones Cbl-b^{-/-} y tipo silvestre. La Figura 10a muestra el análisis inmunohistológico de infiltrados de leucocitos infiltrantes en tejidos tumorales. Se sacrificaron los ratones 20 días después de la inoculación del tumor. Se recolectaron los tejidos tumorales de ratones de tipo silvestre (B6) y Cbl-b^{-/-} (Cbl-b^{-/-}) y se embebieron en Tissue-Tek (Sakura). Se tiñeron las células T CD8⁺ (verde) en las secciones criogénicas con anticuerpo anti-CD8 biotinilado seguido por estreptavidina-Alexa 488 (Molecular Probes). H&E: coloración de hematoxilina y eosina. La Figura 10b muestra el análisis de citometría de flujo de células T CD8⁺ que infiltran el tumor. Se recolectaron los tejidos tumorales de ratones C57BL/6 y Cbl-b^{-/-} el día 20 después de la inoculación de células tumorales. Se cortaron los tejidos en pequeños pedazos (menos de 2 mm de diámetro) y se digirieron con colagenasa (1 µg/ml) a 37°C durante 30 minutos. Después la digestión, se removieron las células muertas por centrifugación Ficoll. Se recolectaron las células viables de la interfase, se lavaron tres veces con medio DMEM que contenía FCS al 5%, se tiñeron con anticuerpos anti-CD8α (PE-Cy7), anti-TCRβ (PE), anti-CD62L (FITC), y anti-CD44 (APC), y luego se analizaron en un LSR II para FACS. En la parte superior se muestran las coloraciones con CD8 y TCRβ de las células de tumores de ratones C57BL/6 (B6) o Cbl-b^{-/-}. Los porcentajes de
 55
 60

células T CD8⁺ (cerrado) se muestran en las gráficas. Los histogramas inferiores muestran respectivamente la expresión de TCRβ, CD62L o CD44 o en las células T CD8⁺ cerradas.

5 La Figura 11 muestra el rechazo de los tumores E.G7 establecidos por las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} transferidas de forma adaptiva. Para generar ratones que tengan tumores E.G7, se inocularon ratones C57BL/6 (8-10 semanas de edad) en forma subcutánea 10⁶ células E.G7, que produjeron tumores subcutáneos con un volumen aproximado de 5 x 5 x 5 mm³ en dos semanas. Dos semanas después de la inoculación, se transfirieron 3 x 10⁶ células T CD8⁺ purificadas ya sea de ratones C57BL/6 de tipo silvestre o Cbl-b^{-/-} por inyección intravenosa. Se purificaron las células T CD8⁺ mediante MACS hasta un 95% de pureza. En las siguientes semanas, se hizo seguimiento a los tamaños de los tumores con un microcalibrador y se documentado como volumen (mm³). Se muestran las estadísticas de los tamaños de los tumores de ratones con tumores que recibieron células T CD8⁺ de tipo silvestre (izquierda) o Cbl-b^{-/-} (derecha).

15 La Figura 12 muestra que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta. Se purificaron las células T CD8⁺ de los ganglios linfáticos de ratones de tipo silvestre y Cbl-b^{-/-} mediante MACS, utilizando un protocolo de enriquecimiento de células CD8 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Para examinar la proliferación celular, se marcaron primero las células con CFSE de acuerdo con las e instrucciones del fabricante (Molecular Probe). Se estimularon las células marcadas con anti-CD3 unido a la placa (5 µg/ml) y anti-CD28 soluble (2 µg/ml) en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de TGF-beta. Después de 3 días de cultivo, se recolectaron las células, se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 (PE), y luego se analizaron en un LSR II. La tinción intracelular de IFN-γ se realizó como se describe en la presente memoria. La Figura 12a muestra histogramas de intensidad de CFSE de las células T CD8⁺ cerradas. Figura 12b, estadísticas de la proliferación celular medida con base en tres experimentos independientes de marcación con CFSE. Figura 12c tinción intracelular de IFN-γ en células T CD8⁺ cultivadas en ausencia o en presencia de TGF-beta.

25 La Figura 13 muestra la desactivación de la expresión de Cbl-b por ARNpi e infección retroviral de células T primarias cultivadas. La Figura 13a muestra un mapa esquemático del vector retroviral basado en hCD2 para la expresión de ARNpi. Se indican los elementos de un 5'-LTR viral, un promotor H1 (Pro (H1)), ARNpi, un promotor de ubiquitina (Pro (Ubi)), y un 3'LTR. La Figura 13b muestra un análisis de transferencia tipo Western de la expresión de Cbl-b en células 293 T transfectadas en forma transitoria. Se lisaron las células 293T transfectadas con ARNpi de Cbl-b, se sometieron a transferencia tipo Western las Cbl-b en los lisados y se detectaron mediante un anticuerpo anti-Cbl-b. Se cuantificó la carga de proteína mediante un anticuerpo anti-actina. La Figura 13c muestra la infección retroviral de células T cultivadas. Se activaron las células T de ganglio linfático de ratones C57BL/6 de tipo silvestre *in vitro* y se infectaron con un vector retroviral vacío de expresión de ARNpi con base en hCD2 como se describe en el texto. Las células infectadas por retrovirus se visualizaron por FACS después de tinción de las células con anticuerpo anti-CD2 humano. El porcentaje de células hCD2⁺ se indica en los histogramas.

35 La Figura 14 muestra la restauración de la relación de células T CD8⁺ con respecto a las CD4⁺ en timocitos doblemente desactivados c-Cbl y Cbl-b (c-Cbl Cbl-b dKO) que expresan un transgén c-Cbl de tipo silvestre. Los timocitos c-Cbl Cbl-b dKO exhibieron un aumento en células de linaje CD8⁺ (células GFP⁺). Para introducir un c-Cbl de tipo silvestre en células madre hematopoyéticas, se cultivaron células c-Cbl Cbl-b dKO BM tratadas con 5-FU durante dos días en presencia de factor células madre de ratón (50 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml) e IL-6 (50 ng/ml). Mientras tanto, se prepararon los sobrenadantes virales, y se infectaron las células madre hematopoyéticas cultivadas de acuerdo con un protocolo publicado (70). Las células madre infectadas con virus (Ly9.1⁺) se transfirieron luego a los ratones Rag2^{-/-} (Ly9.1⁺) para generar quimeras c-Cbl Cbl-b dKO Rag2^{-/-} BM. Un mes después, se evaluó el desarrollo de los timocitos derivados del donante (Ly9.1⁺) en las quimeras BM mediante FACS. Se muestran las células Ly9.1⁺ cerradas (derivadas del donante). Se cerraron luego las células GFP⁻ (dKO) y GFP⁺ (que expresan c-Cbl transgénico) y se presentaron, respectivamente, como graficas de puntos de la tinción CD4 y CD8. Se indican los porcentajes de cada población. Aproximadamente 20-40% de los timocitos que expresan al transgén infectado retroviral (GFP⁺) pueden ser obtenidos por este enfoque (Tabla 1). Los timocitos que expresan al transgén (TS c-Cbl) (GFP⁺) exhibieron una relación normal de células de linaje CD4⁺ con respecto a CD8⁺ con una reproducibilidad consistente (véase la Tabla 1), lo que indica que la expresión de un c-Cbl de tipo silvestre transgénico restableció completamente la relación de timocitos CD4⁺ con respecto a CD8⁺.

50 La Figura 15 muestra los mecanismos hipotéticos de la dependencia de CD28 de la activación de células T. La activación de células T, tal como la proliferación de células y la secreción de IL-2, requiere la señalización específica de TCR así como la señalización coestimuladora mediada por CD28, esto último principalmente a través de la ruta de señalización de Vav. Cbl-b puede suprimir específicamente la activación de Vav inducida por TCR pero no la inducida por CD28. En presencia de Cbl-b, es necesaria coestimulación de CD28 para activar una cantidad suficiente de Vav para la respuesta de células T, estableciendo de este modo la dependencia de CD28 de la activación de células T. Sin embargo, en ausencia de Cbl-b, no es necesaria la coestimulación de CD28 ya que la sola estimulación de TCR puede inducir suficiente cantidad de actividad de Vav.

La Figura 16 muestra la resistencia de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} a la supresión de TGF-beta. Se purificaron las células T CD8⁺ usando una columna de enriquecimiento de CD28. Luego se marcaron las células con CFSE,

estimuladas con anti-CD3 unido a la placa en presencia o en ausencia de 5 µg/ml de TGF-beta. La figura 16a muestra un análisis de citometría de flujo de la intensidad de CFSE de las células T CD8⁺ después de tres días de estimulación. Las células en división mostraron menor intensidad de CFSE en comparación con las células no estimuladas. La figura 16b muestra la supresión dependiente de la dosis de TGF-beta de la proliferación de células T. Se muestran los resultados de la incorporación de 3H-timidina de la proliferación de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}. Figura 16c producción de INF-gama. Se muestra la tinción intracelular de la producción de INF-gama en células T CD8⁺ TS y Cbl-b^{-/-} en presencia o en ausencia de la supresión de TGF-beta. Los porcentajes de células positivas para INF-gama se indican en las gráficas.

La Figura 17 muestra una realización para generar células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} para inmunoterapia tumoral. Los tejidos tumorales contienen una gran cantidad de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). Estas células se enriquecen en linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ específicos del tumor. Para aislar los CTL específicos del tumor, se pueden activar los TIL *in vitro* por estimulación de anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2. Para generar los CTL de Cbl-b^{-/-}, la función de Cbl-b endógena de la célula puede ser suprimida mediante la expresión de ARNi de Cbl-b o una forma negativa dominante de Cbl-b usando un vector retroviral. Las células con ablación de Cbl-b pueden ser identificadas con base en la expresión de GFP, que es codificada por el mismo vector retroviral. Los CTL sometidos a ablación de Cbl-b específica del tumor pueden ser luego expandidos adicionalmente *in vitro* utilizando antígeno tumoral o células tumorales como estímulos. Las células expandidas pueden ser utilizadas para la transferencia adoptiva terapéutica.

Descripción detallada

Definiciones

Las "células T súper asesinas" son células T CD8⁺ que pueden montar una respuesta inmune en ausencia de una señal coestimuladora.

El término "deficiencia de Cbl-b" se usa indistintamente con el término "ablación de Cbl-b" para indicar deficiencia de Cbl-b debida a la desactivación del gen *cbl-b*, y la reducción en la actividad de la proteína Cbl-b debida a la desactivación de la función de Cbl-b por el ARNi, o por la expresión de la forma negativa dominante, que incluye, pero no se limita al mutante negativo dominante, o por un agente que dirige a Cbl-b, o por cualquier otro método adecuado.

La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ es un método para inmunoterapia celular, que comprende la administración de efectores específicos de inmunidad a un organismo huésped del sujeto, evitando así obstáculos en el organismo huésped que puedan impedir la generación de una respuesta inmune efectiva *in vivo*. La transferencia adoptiva puede comprender la eliminación de una población que comprende células T CD8⁺ de un sujeto, enriqueciendo la población de células T CD8⁺, ya sea por aislamiento de células T CD8⁺ o eliminación de otros tipos de células de esta población, expandiendo opcionalmente la población de células T CD8⁺, y administrando la población enriquecida de células T CD8⁺ a un sujeto. La transferencia adoptiva puede comprender la administración de una población de células T CD8⁺ de una línea celular, incluyendo una línea celular clonal de las células T CD8⁺. La transferencia adoptiva permite el uso de un gran número de células T efectoras, aisladas de un sujeto, o derivadas de clones y/o líneas con especificidad y función definidas.

Los términos células T CD8⁺ y CTL se utilizan indistintamente en toda la memoria descriptiva. Es bien conocido en la técnica, que la activación inmunitaria de las células T CD8⁺ genera una población de células efectoras con capacidad lítica denominada linfocitos T citotóxicos, o CTL. Estas células efectoras tienen un papel importante en el reconocimiento y la eliminación de las células malignas y patógenas. En general, los CTL son CD8⁺ y están, por lo tanto, restringidas al MHC clase I, aunque en raras ocasiones las células T restringidas a CD4⁺ clase II han demostrado que funcionan como CTL. Dado que virtualmente todas las células nucleadas en el cuerpo expresan moléculas del MHC clase I, los CTL pueden reconocer y eliminar casi cualquier célula corporal alterada. Las células T CD8⁺ reconocen el antígeno presentado en moléculas HLA clase I de células tumorales a través de receptores de células T. La respuesta inmune mediada por CTL puede dividirse en dos fases, lo que refleja los diferentes aspectos de la respuesta de células T citotóxicas. La primera fase consiste en la activación y diferenciación de células T CD8⁺ en CTL efectoras funcionales. En la segunda fase, los CTL, reconocen los complejos antígeno-MHC clase I en células objetivo específicas, iniciando una secuencia de eventos que culmina con la destrucción de la célula objetivo. Una discusión más detallada del proceso se encuentra en el capítulo 15 de la segunda edición de "Immunology" por Janis Kuby, W. H. Freeman and Company (1991).

Aunque la estimulación de las células T a través de los receptores TCR y receptores coestimuladores, tales como CD28, conduce a la activación de células T, la activación de células T a través solamente de TCR trae como resultado un estado no sensible (anergia) de estas células (Schwartz, R. H. 1992). La importancia de la coestimulación para una respuesta inmune antitumoral ha sido demostrada por experimentos en los cuales la expresión reforzada en células tumorales de B7 o ICOS/B7h, ligandos para CD28, resulta en una erradicación eficiente de los tumores inoculados (Townsend, S.E. y J.P. Allison 1993; Chen y colaboradores, 1994; Wallin y

colaboradores, 2001; Liu, X. y colaboradores, 2001; Yu X., R y colaboradores, 1998). Sin embargo, este enfoque para inmunoterapia es difícil en la práctica debido a la falta de una forma eficiente para expresar una molécula coestimuladora en todas las células tumorales. Una alternativa a este enfoque es la generación de células T que pueden evitar el requerimiento de la coestimulación de CD28 durante la activación. Tal enfoque puede permitir la activación directa de los CTL específicos de tumores por las células tumorales en ausencia de ligandos coestimuladores, lo que representa una poderosa herramienta terapéutica contra el cáncer.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos que implican el uso de los CTL que son deficientes en la función de Cbl-b y tienen un TCR específico para un antígeno tumoral. Tales CTL pueden tener por ejemplo un transgén que codifica un TCR específico para un antígeno tumoral. En ciertos aspectos, tales CTL pueden derivarse de una población policlonal de tejido tumoral (Ramarithanam y colaboradores, 2003). En una realización, los CTL de Cbl-b^{-/-} específicos del tumor pueden ser generados por desactivación de la función de Cbl-b usando un ARNpi de Cbl-b o una forma dominante negativa de Cbl-b en los CTL derivados de tumores.

Proteínas Cbl-b

Las proteínas Cbl son ubiquitina ligasas E3 que contienen un dominio de dedo RING involucradas en diversos eventos de señalización de los receptores de membrana (Lupher y colaboradores, 1999; Joazeiro y colaboradores, 1999; Liu, Y.C. 2004). Experimentos anteriores han demostrado que Cbl-b, un miembro de la familia de proteínas Cbl, juega un papel crítico en la activación de las células T periféricas (Chiang y colaboradores, 2000; Bachmaier y colaboradores, 2000). En forma notable las células T CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} han evitado la dependencia de señales coestimuladoras, para su activación, ya que proliferan vigorosamente y secretan grandes cantidades de IL-2 después de la estimulación de TCR en ausencia de coestimulación de CD28. Estos resultados ponen de relieve por lo tanto el papel de Cbl-b como regulador clave de la señalización coestimuladora de CD28 y sugieren que los CTL deficientes en Cbl-b pueden responder a y montar una respuesta eficiente contra tumores que carecen de señales coestimuladoras.

Las proteínas Cbl pertenecen a una familia de moléculas de múltiples adaptadores involucradas en diversas señalizaciones de receptores de membrana (46-48). En células de mamíferos, hay tres miembros de la familia de proteínas Cbl, c-Cbl, Cbl-b, y Cbl-3. Entre estos miembros, c-Cbl y Cbl-b se coexpresan en linfocitos (49-51). Estructuralmente, c-Cbl y Cbl-b comparten una alta homología de secuencia en la región terminal C que contiene un dominio PTB conservado (enlazado a fosfotirosina) y un motivo dedo RING, este último puede estar asociado con enzimas que se conjugan con ubiquitina E2 (52, 53). En la porción terminal N, tanto c-Cbl como Cbl-b contienen múltiples motivos ricos en prolina, así como varios residuos de tirosina que se fosforilan tras la activación por diversos receptores (52). Las secuencias de proteína de la región terminal N entre c-Cbl y Cbl-b son significativamente diferentes, lo que sugiere que estas dos moléculas pueden ejercer distintas funciones a través de esta región.

La importancia de c-Cbl y Cbl-b en la señalización de TCR, el desarrollo y activación de células T ha sido demostrado recientemente por varios grupos utilizando ratones con genes manipulados (54-58). Al menos dos estudios han mostrado que la deficiencia de c-Cbl (c-Cbl^{-/-}) mejora significativamente la señalización de TCR en timocitos, pero no en células T periféricas (54, 57). Por el contrario, el análisis de ratones deficientes en Cbl-b (Cbl-b^{-/-}) revela que Cbl-b juega un papel crítico en la activación de células T periféricas, pero no en el desarrollo de timocitos, ya que pueden responder eficientemente a una baja estimulación de antígeno (55, 56). Notablemente, las células T CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} han perdido la dependencia de las señales coestimuladoras para la activación, ya que ellas proliferan vigorosamente y secretan grandes cantidades de IL-2 después de la estimulación de TCR en ausencia de coestimulación de CD28 (55, 56). Es importante destacar que, células T de Cbl-b^{-/-} no están energizadas bajo las condiciones que normalmente inducen anergia en células T (no sensibles). Como resultado, los ratones Cbl-b^{-/-} se vuelven susceptibles a enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, estos resultados subrayan a Cbl-b como un regulador clave para señalización coestimuladora de TCR y CD28 y la activación de células T, y sugiere que la modulación de la ruta de Cbl-b puede ser un enfoque poderoso para generar las células T "súper asesinas" que son sensibles a la estimulación por antígenos de baja afinidad e independientes de la coestimulación de CD28 (Rangachari y Penninger, Current Opinion in Pharmacology 2004, 4, 415-422).

No existe evidencia clara que demuestre que la función biológica de las proteínas Cbl esté ligada a su actividad de ubiquitina ligasa, a pesar de que Cbl promueve la ubiquitinación de diversas proteínas. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para determinar si la contribución de Cbl-b con el fenotipo de doble desactivación (DKO) es, en realidad, debida a la actividad de la ubiquitina ligasa. En otros aspectos, la invención proporciona un vector retroviral que porta una Cbl-b deshabilitada en ubiquitina. En otra aspectos, la invención proporciona clones de células ES con la mutación KI de Cbl-b deshabilitada en ubiquitina.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona métodos para determinar el papel de la función de la ubiquitina ligasa de Cbl-b en las respuestas de células T antitumorales. En otras realizaciones, la descripción proporciona métodos para determinar si la supresión de la función de la ubiquitinación de la ligasa de Cbl-b, proporciona células T CD8⁺ con la capacidad para rechazar los diversos tumores. La identificación del dominio de Cbl-b crítico para su

función biológica, es importante para el desarrollo de fármacos que pueden suprimir la función de Cbl-b. Cbl-b es una ubiquitina ligasa E3 y promueve la ubiquitinación de diversas proteínas de señalización tales como p85 PI-3 quinasa y Vav en células T, lo que sugiere que Cbl-b regula la respuesta antitumoral de células T a través de la función de ubiquitinación. En ciertos aspectos, la descripción establece que la interrupción de la función de la ubiquitinación de Cbl-b es suficiente para volver sensibles a las células T al antígeno tumoral. La función de la ubiquitinación de Cbl-b es un fármaco objetivo potencial para inactivar la función de Cbl-b. En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para determinar si se requiere la función de ubiquitina ligasa de Cbl-b para señales de coestimulación durante la activación de células T. En otros aspectos, la invención proporciona métodos para determinar si la inactivación de la actividad de ubiquitina ligasa de Cbl-b vuelve sensibles a las células T contra los tumores.

Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} no requieren coestimulación

Anteriormente, se demostró que la activación de células T CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} es independiente de la coestimulación de CD28 (Chiang y colaboradores, 2000; Bachmaier y colaboradores, 2000). En ciertos aspectos, la descripción establece que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} responden eficientemente a la estimulación antigénica, incluso sin coestimulación de CD28. En ciertas realizaciones, la descripción establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} producen grandes cantidades de interleuquina 1 (IL-2) e interferón gamma (IFN-γ) después de estimulación solamente por el anticuerpo anti-CD3, lo que indica que los CTL de Cbl-b^{-/-} pueden ser completamente activados mediante la activación de TCR sin coestimulación de CD28 y ayuda de células T CD4⁺. En ciertos aspectos, la descripción establece que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} evitan la dependencia de la señalización de CD28. En ciertos aspectos, la descripción establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} eliminan de manera eficiente tumores singénicos. En ciertos aspectos, la descripción establece que células las T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son responsables de la erradicación de los tumores.

En ciertos aspectos, la invención proporciona células T CD8⁺ aisladas de Cbl-b^{-/-}. La descripción establece que la respuesta *in vitro* de células T de Cbl-b^{-/-} es hiperactivo, independiente de la coestimulación, y no es inhibida por TGF-beta. La descripción establece, además, que los ratones Cbl-b^{-/-} montan una respuesta inmune normal *in vivo*, incluso en ausencia de CD28. La descripción también establece que Cbl-b regula la sensibilidad de las células T a través de un mecanismo que depende de la ubiquitinación.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una población clonal de las células T CD8⁺ Cbl-b^{-/-}, en donde todas las células T en la población tienen la misma especificidad de TCR. En un aspecto, la población clonal comprende los CTL que son Cbl-b^{-/-} y expresan un TCR específico para un antígeno tumoral. En ciertos aspectos, la descripción establece además que las células T de Cbl-b^{-/-} montan una respuesta antitumoral eficiente *in vivo*. En un ejemplo no limitante, esto se demuestra mediante la inhibición del crecimiento de tumores E.G7, EL4 y B16 en ratones Cbl-b^{-/-}. La mayoría de los ratones Cbl-b^{-/-}, o bien no permiten en absoluto el crecimiento del tumor o exhiben regresión tumoral dentro del mismo lapso de tiempo. Además, existe una infiltración masiva de células T CD8⁺ en los tejidos tumorales de ratones Cbl-b^{-/-}. En ciertas realizaciones, la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ purificadas de Cbl-b^{-/-} erradica los tumores establecidos de E.G7. La descripción establece que las células T CD8⁺ deficientes de Cbl-b específicas del tumor, por ejemplo, pero no limitado a, células CD8⁺ T de Cbl-b^{-/-}, pueden ser usadas como células T "súper asesinas" para terapia tumoral.

En ciertos aspectos, la descripción establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son responsables del rechazo del tumor. Además, las células T de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta, lo que sugiere que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden rechazar tumores a través del rompimiento de múltiples obstáculos que los tumores utilizan generalmente para evitar una respuesta inmune antitumoral. En ciertas formas de realización la descripción proporciona métodos para determinar cuantitativamente si los CTL de Cbl-b^{-/-} pueden montar respuestas inmunes contra diversos tumores, y para examinar cuantitativamente la eficiencia de las células T CD8⁺ específicas del tumor requerida para el rechazo del tumor, y el efecto a largo plazo de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en la erradicación de tumor establecido. La descripción proporciona métodos para examinar si los CTL de Cbl-b^{-/-} pueden erradicar tumores que impiden la respuesta de las células T a través de TGF-beta, y la barrera del tumor. La descripción también establece que los ratones Cbl-b^{-/-} rechazan de manera eficiente tanto los tumores antigénicos fuertes como los débiles, y la transferencia adoptiva de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} erradica los tumores establecidos. La descripción también proporciona métodos que determinan los mecanismos por los cuales los CTL de Cbl-b^{-/-} montan respuestas inmunes contra tumores inmunogénicos. La descripción también establece que la ablación de Cbl-b en los CTL específicos de tumores los hace sensibles contra diversos tumores.

La descripción también establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta, una característica que puede ser útil para superar el efecto negativo de cierto entorno del tumor. En otros aspectos, la descripción establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta, lo que sugiere que estas células pueden responder a tumores que están protegidos por TGF-beta producido ya sea por el tumor mismo o células inmunes tales como células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. Diversas realizaciones demuestran que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} se puede utilizar como "súper asesinas" contra diversos tipos de cáncer. En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para determinar el efecto a largo plazo de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}

en terapia tumoral mediante el uso de sistemas transgénicos bien estudiados, así como diversos modelos de tumores que impiden la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. Otros métodos pueden determinar la memoria inmune contra las células tumorales, en donde se puede analizar el efecto a largo plazo de la respuesta antitumoral en ratones con regresión tumoral.

5 En ciertos aspectos, la descripción establece que la ablación de Cbl-b impide espontánea de tumores en células deficientes de ATM^{-/-}, incluyendo ratones ATM^{-/-}. La descripción establece además, que la ablación de línea germinal de Cbl-b en ratones ATM^{-/-} da como resultado una marcada reducción de tumores espontáneos, y consecuentemente un período de vida más largo. En ciertos aspectos, la descripción establece que la inhibición sistémica de la función de Cbl-b es un enfoque efectivo para reducir la incidencia de tumores. La descripción establece además que los ratones Cbl-b^{-/-} son resistentes a tumores E.G7 y EL4 inoculados y los ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} muestran una incidencia significativamente menor de linfomas espontáneos que los ratones que expresan Cbl-b. En otros aspectos, la descripción establece que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} es suficiente para erradicar los tumores E.G7 establecido en ratones receptores de tipo silvestre.

Métodos para inducir una respuesta inmune en ausencia de coestimulación para tratar tumores

15 En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona métodos para utilizar CTL deficientes en Cbl-b, incluyendo, pero sin limitarse a CTL de Cbl-b^{-/-}, como células T "súper asesinas" para terapia de cáncer. En ciertas realizaciones, los ratones Cbl-b^{-/-} rechazan tumores inmunogénicos de alta y baja inoculación, y las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son suficientes para mediar la respuesta inmune antitumoral en ratones portadores de tumores. La descripción establece que las células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b son herramientas efectivas en el tratamiento de cánceres, incluyendo cáncer humano.

20 En ciertos aspectos, la descripción está dirigida a métodos para utilizar las células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b en inmunoterapia tumoral, incluyendo pero sin limitarse a métodos de transferencia adoptiva, para inducir una respuesta inmune antitumoral en un sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende proporcionar una población de células, que comprende células T CD8⁺ con especificidad de tumor, reducir la actividad de Cbl-b, y administrar las células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b a un sujeto. La población de células utilizadas en los métodos de la descripción comprende al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de células T CD8⁺. En ciertas realizaciones, El método comprende proporcionar una población de células, que consiste esencialmente de células T CD8⁺, reducir la actividad de Cbl-b, y administrar r las células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b a un sujeto.

30 Una limitación potencial en los métodos adoptivos es la necesidad de generar y transferir mediante infusión a un sujeto, un número suficiente de células T CD8⁺. El número de células T CD8⁺ que pueden producir una respuesta inmune efectiva o suficiente depende de múltiples factores, tales como la carga de antígeno tumoral, la capacidad de replicación de las células transferidas, y la capacidad de la células transferidas a persistir en el huésped. En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para determinar el número de células T CD8⁺ necesarias para inducir una respuesta inmune en un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos pueden transferir en un sujeto aproximadamente 5x10⁵ células T CD8⁺, 1x10⁶ células T CD8⁺, 5x10⁶ células T CD8⁺, 1x10⁷ células T CD8⁺, 5x10⁶ células T CD8⁺. Otras realizaciones pueden incluir múltiples transferencias de células T CD8⁺ en un sujeto.

35 En ciertas realizaciones, la población de células que comprende células T CD8⁺ se puede obtener a partir de células T de infiltrados tumorales. Los métodos para obtener, aislar y purificar las células T de infiltrados tumorales son conocidos en la técnica

40 La obtención de células T CD8⁺ de infiltrados tumorales que comprenden células T es ventajoso porque las células T en la masa del tumor pueden reconocer el antígeno tumoral presentado por las células tumorales. Sin embargo, la mayoría de los tumores antigénicos no son rechazados de manera eficiente por estas células T. Los mecanismos críticos que impiden el rechazo tumoral mediado por células T incluyen la falta de señales adecuadas del TCR o de receptores coestimuladores de células tumorales y/o anergia o supresión de células T específicas del tumor por el ambiente del tumor o el tumor mismo. Por lo tanto, una tarea retadora en la inmunoterapia tumoral es desarrollar estrategias que puedan activar los CTL específicos del tumor dentro de los tumores con un daño mínimo o sin un daño severo a los tejidos normales. Las células T CD8⁺ derivadas de infiltrados tumorales pueden ser modificadas mediante la reducción de la actividad de Cbl-b proporcionando así células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b. La capacidad de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} para rechazar tumores antigénicos proporciona una nueva ruta en inmunoterapia tumoral, en donde la administración de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, derivadas de infiltrados tumorales, pueden inducir respuestas inmunes antitumorales específicas.

45 En ciertas realizaciones, los métodos para utilizar células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b en inmunoterapia tumoral para inducir una respuesta inmune antitumoral en un sujeto, comprenden el aislamiento y/o purificación de células T CD8⁺ de infiltrados tumorales de los sujetos. El método puede comprender opcionalmente una etapa de estimular la expansión y proliferación de las células T CD8⁺ aisladas. En ciertas realizaciones, la etapa de expansión y la proliferación pueden realizarse antes de la reducción de la actividad de Cbl-b. En otras formas de realización, la

etapa de expansión y proliferación puede hacerse después de reducir la actividad de Cbl-b. Los métodos para inducir expansión y proliferación de células T CD8⁺ en un cultivo celular son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, la expansión y proliferación pueden ser estimuladas por tratamiento de las células con anticuerpo anti-CD3, y/o en presencia de IL-2.

- 5 En otros aspectos, la descripción está dirigida a métodos para utilizar transferencia adoptiva de células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b, tales como células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, como una herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ purificadas de Cbl-b^{-/-} en ratones de tipo silvestre que portan tumores E.G7 erradica al tumor establecido. En otro ejemplo, los ratones Cbl-b^{-/-} también rechazan tumores fisiológicos tales como EL4 y B16.
- 10 En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para inducir una respuesta antitumoral en un sujeto mediante transferencia adoptiva de las células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b. El enfoque de transferencia adoptiva tiene varias ventajas. En ejemplos no limitantes, las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden ser ampliamente efectivas contra una gran clase de tumores somáticos, la mayoría de los cuales no expresan ligandos coestimuladores. La capacidad de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} para producir respuestas sustanciales de citoquinas y para funcionar independiente de la coestimulación de CD28 y de la ayuda de células T CD4⁺ puede evitar la necesidad de administrar grandes cantidades de citoquinas o inmunizar pacientes con vacunas diseñadas para mejorar la señalización coestimuladora y las respuestas de células T auxiliares. En ciertas realizaciones, el uso clínico de los linfocitos que infiltran el tumor (TIL) en la inmunoterapia adoptiva, se podría mejorar mediante la ablación de Cbl-b. La ablación de la función de Cbl-b se puede lograr por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo pero sin limitarse a ARNi o la expresión de la forma negativa dominante del gen *cbl-b*.

25 En un ejemplo no limitante de un método de transferencia adoptiva de la presente descripción, las células T CD8⁺ se aíslan y purifican a partir de infiltrados tumorales de un sujeto que padece un tumor. Los niveles de Cbl-b se reducen en estas células T CD8⁺ aisladas y purificadas, por ejemplo, por transfección estable con un vector retroviral que expresa ARNpi que manipula Cbl-b, para producir células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b. En ciertas realizaciones, el vector retroviral que expresa al ARN inhibidor puede comprender un marcador fluorescente, tal como, pero sin limitarse a GFP o cualquiera de sus variantes. Tal marcador fluorescente puede permitir la detección de células T CD8⁺, que se han vuelto deficientes en Cbl-b. Las células T CD8⁺ aisladas y purificadas deficientes en Cbl-b pueden ser expandida *ex vivo* a un número de células adecuadas para infusión al sujeto que sufre de un tumor. En ciertas realizaciones, La células T CD8⁺ aisladas y purificadas deficientes en Cbl-b pueden ser expandidas y/o enriquecidas por células T CD8⁺ específicas del tumor mediante exposición y estimulación con células tumorales derivadas del tumor del sujeto.

35 La presente descripción contempla diversas vías de administración de los CTL en cualquiera de los métodos de la presente invención para el tratamiento de un sujeto que padece de un tumor. En ciertos aspectos, los CTL pueden ser administrados mediante suministro intravenoso. En otros aspectos, los CTL pueden ser administrados directamente a un sitio tumoral. En ciertas realizaciones, se contemplan múltiples infusiones de tales células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b.

40 *In vivo*, la falta de capacidad de respuesta de los CTL a los tumores puede implicar supresión activa de los CTL o la falta de un reconocimiento apropiado de las células tumorales por los CTL. En ciertas realizaciones, la activación independiente de la coestimulación de células T de Cbl-b^{-/-} es responsable por la respuesta antitumoral observada. En otras formas de realización, los mecanismos diferentes a la activación de células T CD8⁺ independientes de CD28 pueden contribuir al rechazo del tumor. En ciertas realizaciones, la infiltración masiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en masas tumorales puede resultar de la adhesión y migración de células alteradas. Además, se ha demostrado que las células T de Cbl-b^{-/-} pueden escapar del destino anérgico bajo condiciones que normalmente inducen tolerancia inmune *in vivo* (Jeon M.S. y colaboradores, 2004). Las células T de Cbl-b^{-/-} pueden ser resistentes a la inducción de tolerancia por las células tumorales, proporcionando por lo tanto una mejor supervisión inmune contra las células tumorales recientemente transformadas o inoculadas. Finalmente, se ha demostrado que la respuesta de CTL contra los tumores pueden ser inhibida por las células T reguladoras CD25⁺ (T_{reg}) (Somasundaram y colaboradores, 2002). Las T_{reg} CD25⁺ pueden ejercer una supresión inmune a través de la secreción de TGF-β (Kronenberg M. y A. Rudensky, 2005). En ciertas realizaciones, la descripción establece que células T de Cbl-b^{-/-} son menos sensibles a la supresión de TGF-β. En ciertas realizaciones, la falta de supresión inmune de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} por T_{reg} CD4⁺ podría ser también un factor que conduce a las respuestas inmunes antitumorales mejoradas.

55 La inmunoterapia tumoral es un enfoque prometedor que puede resultar en la regresión de un cáncer inmunogénico invasivo voluminoso en algunos pacientes. Los enfoques disponibles actualmente siguen siendo menos éxitos de lo deseado. Un obstáculo importante que sin embargo tiene que ser superado, es el desarrollo de un enfoque efectivo que pueda iniciar, amplificar y mantener respuestas de CTL contra tumores que carecen de señales coestimuladoras. En ciertos aspectos, la presente descripción establece que los ratones Cbl-b^{-/-} rechazan en forma efectiva tumores inoculados en ausencia de inmunización previa. La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} erradica los tumores E.G7 establecidos, demostrando que los CTL por sí solos de Cbl-b^{-/-} son suficientes

para mediar una respuesta antitumoral efectiva. Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} también son resistentes a la supresión de TGF-beta, lo que indica un papel mucho más amplio de las células T de Cbl-b^{-/-} en el rechazo de los tumores, que puede prevenir la respuesta de células T a través de otros mecanismos tales como la producción de TGF-beta. En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para la modulación de la ruta de Cbl-b en los CTL específicos del tumor, en donde tal modulación puede ser utilizada para generar CTL específicos del tumor que puede ser utilizado en inmunoterapia del cáncer.

En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para determinar los mecanismos mediante los cuales los ratones Cbl-b^{-/-} montan respuestas antitumorales. En otros aspectos, la descripción proporciona métodos para el uso de los CTL deficientes en Cbl-b, por ejemplo pero no limitado a los CTL de Cbl-b^{-/-}, como una herramienta terapéutica para el tratamiento de tumores establecidos. En ciertas realizaciones, la eficiencia de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas del tumor en el rechazo del tumor puede ser cuantificada por diversos métodos conocidos en la técnica. En ciertos aspectos, la descripción establece que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} erradican un tumor metastásico y tumores con ambiente supresor tales como TGF-beta, la barrera del tumor, y las células NKT. En otros aspectos, la descripción establece que la desactivación (Kd) de la función de Cbl-b en CTL que infiltran al tumor por ARNpi, una forma negativa dominante de Cbl-b, o cualesquiera otros agentes adecuados, conducen a una reducción en tamaño, y/o erradicación de tumores establecidos. En otros aspectos, la descripción establece que la transferencia adoptiva de los CTL kd de Cbl-b conduce a la reducción de tamaño, y/o erradicación de los tumores establecidos. En otros aspectos, la descripción establece que los CTL kd de Cbl-b erradican tumores metastásicos y tumores con ambiente supresor, tales como TGF-beta, la barrera del tumor, y las células NKT.

Métodos para elaboración de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}

Las células T CD8⁺ utilizadas en el método de transferencia adoptiva de la presente invención pueden ser aisladas de diversas fuentes. En ciertas realizaciones, las células T CD8⁺ pueden ser aisladas de infiltrados tumorales que comprenden CTL. En otras realizaciones, células T CD8⁺ pueden ser aisladas de sangre periférica, y/o órganos linfáticos. En otras realizaciones, la fuente de células T CD8⁺ puede ser una línea celular clonal que expresa TCR específicos para el antígeno tumoral. En ciertas realizaciones, la línea celular clonal preferiblemente hace coincidir moléculas MHC clase I con una molécula MHC clase I de un sujeto en un método de transferencia adoptiva.

Los métodos y condiciones para aislar, purificar, estimular y expandir CTL sin modificar de memoria o efectores, son bien conocidos en la técnica, y son contemplados por los métodos para elaborar poblaciones de células T CD8⁺ para uso en los métodos de la descripción. En ciertas realizaciones, las células T CD8⁺ clonales que expresan un TCR específico pueden ser generadas por rondas repetidas de estimulación de células T CD8⁺ purificadas con células dendríticas pulsadas con un antígeno tumoral mutado.

El tipo de antígeno tumoral mencionado en la descripción puede ser un antígeno específico del tumor (TSA) o un antígeno asociado al tumor (TAA). Un TSA es único para las células tumorales y no se produce en otras células en el cuerpo. Un antígeno asociado TAA no es único para una célula tumoral y en vez de eso también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor se puede producir en condiciones que le permitan al sistema inmune responder al antígeno. Los T AA pueden ser antígenos que se expresan en las células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmune es inmaduro e incapaz de responder o pueden ser antígenos que están normalmente presentes en niveles extremadamente bajos en las células normales, pero que son expresados en niveles mucho más altos en células tumorales.

Ejemplos no limitantes de antígenos grandes, con base en proteínas incluyen los siguientes: antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos de linaje múltiple específicos del tumor tales como as MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores del tumor mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos únicos del tumor que resultan de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, tales como antígenos EBVA del virus de Epstein Barr y los antígenos del virus de papiloma humano (HPV) E6 y E7. Otros antígenos grandes con base en proteína incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NYCO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 que se enlazan a la proteína\proteína ciclofilina asociada a C, TAAL6, TAG72, TLP, y TPS. Estos antígenos con base en proteínas y sus secuencias son conocidos y se encuentran disponibles para aquellos expertos en la técnica en la literatura o comercialmente. Antígenos adicionales, que en ciertas realizaciones pueden ser reconocidos por los TCR transgénicos autólogas expresados por líneas de células CD8⁺ T clonales, pueden encontrarse en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos 2006/0153858.

- La atenuación de la actividad Cbl-b, por ejemplo la atenuación de la actividad Cbl-b en infiltrados de CTL específicos del tumor, promueve una respuesta antitumoral. La invención contempla una variedad de métodos para atenuar y/o suprimir la actividad de Cbl-b en células T CD8⁺. En ciertas realizaciones, la actividad de Cbl-b se atenúa en una forma transitoria. En otras realizaciones, la actividad de Cbl-b se atenúa en forma continua y/o en forma permanente.
- 5 En ciertas realizaciones, la actividad de Cbl-b puede ser reducida, o eliminada mediante la introducción de cualquier agente que sea un antagonista para la actividad Cbl-b, tal como, pero sin limitarse a molécula(s) de ARN de interferencia (ARNi). En ciertas realizaciones, la actividad de Cbl-b puede ser atenuada y/o suprimida mediante el uso de compuestos polinucleótidos, tales como, pero sin limitarse a, polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, polinucleótidos de triple hélice y similares, donde la secuencia de nucleótidos de
- 10 tales compuestos está relacionadas con las secuencias de nucleótidos de ADN y/o ARN del gen de Cbl-b. En ciertos aspectos, los niveles o actividad de Cbl-b, se reducen hasta aproximadamente un 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% de los niveles o actividad de Cbl-B en células que no son tratadas con un antagonista de Cbl-b, por ejemplo ARNpi que dirige a Cbl-b.
- La tecnología de nucleótidos antisentido ha sido el enfoque más comúnmente descrito en los protocolos para lograr una interferencia específica de genes. Para estrategias antisentido, pueden introducirse cantidades estequiométricas de ácido nucleico monocatenario complementario al ARN mensajero para el gen de interés, en la célula. Las estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice también son útiles para interferencia manipulada genéticamente. Este enfoque se basa en la rara capacidad de ciertas poblaciones de ácido nucleico para adoptar una estructura de triple cadena. Bajo condiciones fisiológicas, los ácidos nucleicos son virtualmente todos monocatenarios o bicatenarios, y
- 15 raramente, si acaso, forman estructuras de cadena triple.
- En ciertas realizaciones, se usa una molécula de ARN de interferencia (ARNi) para disminuir o inhibir la expresión del ácido nucleico contra el cual se dirige el ARNi. ARNi se refiere al uso de moléculas de ARN de interferencia (ARNi), por ejemplo, pero sin limitarse a, ARN bicatenario (ARNbc) o ARN pequeño de interferencia (ARNpi) para suprimir la expresión de un gen que comprende una secuencia relacionada de nucleótidos. ARNi también se denomina como silenciamiento génico post-transcripcional (o PTGS).
- 25 ARNi regula la expresión génica a través de un mecanismo ubicuo por degradación de ARNm objetivo en una forma específica de la secuencia. McManus y colaboradores, 2002, Nat Rev Genet 3: 737-747. En células de mamíferos, el ARN de interferencia (ARNi) puede ser activado por dúplex de 21 a 23 nucleótidos de ARNpi. Lee y colaboradores, 2002, Nat Biotechnol 20: 500-505; Paul y colaboradores, 2002, Nat Biotechnol. 20: 505-508; Miyagishi y colaboradores, 2002, Nat Biotechnol. 20: 497-500; Paddison y colaboradores, 2002, Genes Dev. 16: 948-958. La expresión de ARNpi o ARN de horquilla corta (ARNhc) dirigido por el promotor U6, media efectivamente la degradación del ARNm objetivo en células de mamífero. Los dúplex sintéticos de ARNpi y los ARNpi derivados del plásmido pueden inhibir la infección y replicación del VIH-1 degradando específicamente el ARN genómico del VIH. McManus y colaboradores, J. Immunol. 169: 5754 a 5760; Jacque y colaboradores, 2002 Nature 418: 435-438; Novina y colaboradores, 2002, Nat Med 8: 681-686. También, el ARNpi que dirige al ARN genómico de VHC inhibe la replicación del VHC. Randall y colaboradores, 2003, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100: 235-240; Wilson y colaboradores, 2003, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100: 2783-2788. Fas dirigida por ARNpi protege al hígado de hepatitis y fibrosis fulminante. Song y colaboradores, 2003, Nat Med 9: 347-351.
- 30 Se puede usar ARNbc para interferir con la expresión de genes en muchos organismos, incluyendo, pero sin limitarse a mamíferos. ARNbc se utiliza como ARN inhibidor o ARNi de la función de una molécula de ácido nucleico de la invención para producir un fenotipo que es igual a aquel de un mutante nulo de una molécula de ácido nucleico de la descripción (Wianny y Zernicka-Goetz, 2000, Nature Cell Biología 2: 70-75).
- Se han desarrollado muchos métodos para elaborar ARNpi, por ejemplo, síntesis química o transcripción *in vitro*. Una vez elaborado, el ARNpi puede introducirse directamente en una célula para mediar la interferencia de ARN
- 45 (Elbashir y colaboradores, 2001, Nature 411: 494-498; Song, E. y colaboradores, RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat. Med. 2003; 9: 347-351; y Lewis, D L, y colaboradores., Efficient delivery of ARNpi for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat. Genet. 2002; 32: 107-108). Alternativamente, el ARNpi p puede ser encapsulado en liposomas para facilitar el suministro a una célula (Sorensen, DR y colaboradores, Gene silencing by systemic delivery of synthetic ARNpis in adult mice. J Mol Biol. 2003; 327: 761-766). Los ARNpi pueden ser introducidos también en las células a través de transfección transitoria.
- 50 Se han desarrollado también una serie de vectores de expresión para expresar continuamente Los ARNpi en células de mamífero transfectadas en forma estable y transitoria (Brummelkamp y colaboradores, 2002, Science 296: 550-553; Sui y colaboradores, 2002, PNAS 99 (6): 5515-5520; Paul y colaboradores, 2002, Nature Biotechnol. 20: 505-508). Algunos de estos vectores han sido manipulados genéticamente para expresar los ARN de horquilla pequeña (ARNhp), que se procesan *in vivo* en moléculas como ARNpi capaces de llevar a cabo silenciamiento específico de genes. En ciertas realizaciones, un ARNhp contiene plásmido bajo el control de un promotor, preferiblemente un promotor U6 (Paul, C P y colaboradores, Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nat Biotechnol 2002; 20: 505-508). Otro tipo de vector de expresión de ARNpi codifica las cadenas sentido y antisentido de ARNA bajo el control de promotores pol III separados (Miyagishi y Taira, 2002, Nature Biotechnol. 20: 497-500). Las
- 55

- 5 cadenas de ARNpi de este vector, como los ARNhp de los otros vectores, tienen las señales de terminación timidina 3'. El gen de ARNhp puede ser suministrado a través de un sistema de vector adecuado, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), o retrovirus (Xia, H y colaboradores, ARNpi-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. Nat. Biotechnol. 2002; 20: 1006-1010; y Barton, G M, y colaboradores Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2002; 99: 14943-14945). En ciertas realizaciones, la descripción contempla el uso de vectores de ARNi que permiten la transfección estable y la atenuación continua de la actividad de Cbl-b en células T CD8⁺.
- 10 En ciertas realizaciones, el ARN puede comprender una o más cadenas de ribonucleótido polimerizadas. Puede incluir modificaciones ya sea de la cadena principal de fosfato-azúcar o del nucleósido. Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster o el ARN natural pueden ser modificados para incluir al menos uno entre un heteroátomo de nitrógeno o azufre. Las modificaciones en la estructura del ARN pueden ser hechas para permitir una inhibición genética específica mientras se evita una respuesta general de pánico en algunos organismos, que se generan por ARNbc. Igualmente, las bases pueden ser modificar para bloquear la actividad de la adenosina desaminasa. El ARN puede ser producido enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total, cualquier ribonucleótido modificado puede ser introducido enzimática u orgánica *in vitro*.
- 15 La estructura bicatenaria puede estar formada por una cadena sencilla de ARN autocomplementaria o dos cadenas de ARN complementarias. La formación del dúplex de ARN puede ser iniciada ya sea dentro o fuera de la célula. El ARN puede ser introducido en una cantidad que permite el suministro de al menos una copia por célula. Dosis mayores (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) de material bicatenario puede producir una inhibición más efectiva; también pueden ser útiles dosis menores para aplicaciones específicas. La inhibición es específica de la secuencia ya que las secuencias de nucleótidos correspondientes a la región del dúplex del ARN están destinadas a inhibición genética. La molécula de ARN puede ser al menos de 10, 12, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 30 nucleótidos de longitud.
- 20 En ciertas realizaciones, el ARN que contiene secuencias de nucleótidos idénticas a una porción de un gen de Cbl-b es adecuado para o atenuación y/o inhibición de la actividad de Cbl-b. En ciertas realizaciones, la secuencias de ARN con inserciones, supresiones, y mutaciones puntuales únicas con relación a la secuencia objetivo de Cbl-b pueden ser efectivas para inhibición. Por lo tanto, no se requiere una identidad de secuencia del cien por ciento entre el ARN y la secuencia objetivo de Cbl-b para atenuar y/o inhibir la actividad de Cbl-b. La una identidad de secuencia de aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92% o 91% es contemplada por los métodos de la presente descripción.
- 25 El ARN puede ser sintetizado ya sea *in vivo* o *in vitro*. La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción *in vivo*, o se puede usar ARN polimerasa clonada para transcripción *in vivo* o *in vitro*. Para transcripción de un transgén *in vivo* o un constructo de expresión, se puede usar una región reguladora (por ejemplo, promotora, reforzadora, silenciadora, donadora y aceptora de empalme, poliadenilación) para transcribir la cadena de ARN (o cadenas). La inhibición puede ser controlada por una transcripción específica en un órgano, tejido, o tipo de célula; la estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, estrés, temperatura, inductores químicos); y/o la transcripción por ingeniería genética en una etapa o edad de desarrollo. Las cadenas de ARN pueden o no estar poliadeniladas; las cadenas de ARN pueden o no ser traducidas en un polipéptido por un aparato de traducción de la célula. El ARN puede ser sintetizado químicamente o enzimáticamente por reacciones manuales o automatizadas.
- 30 Los ARN pueden ser sintetizados por una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa de bacteriófago (por ejemplo, T3, T7, SP6). Cualquier método adecuado para uso y producción de un constructo de expresión que sea conocido en la técnica es contemplado por la presente descripción como un método para atenuar y/o reducir la actividad de Cbl-b.
- 35 En otras realizaciones, la actividad de Cbl-b puede ser atenuada y/o eliminada por desactivación génica dirigida por mutaciones, incluyendo pero sin limitarse a supresiones de exones, en la copia genómica de Cbl-b. Los métodos para desactivación génica dirigida son bien conocidos en la técnica y se contemplan en la presente descripción.
- 40 En ciertas realizaciones, la interrupción del gen de Cbl-b puede ser inducida por rompimientos de la cadena doble de ADN específica del sitio (DSB) que puede ser creada en la secuencia genómica de Cbl-b. Las nucleasas específicas del sitio pueden ser modificadas por ingeniería genética como proteínas de fusión que portan un dominio de enlazamiento de ADN, que reconoce una secuencia específica de ácido nucleico en el gen de Cbl-b, fusionado a un dominio de nucleasa. Tales nucleasas específicas del sitio pueden crear DSB en secuencias de nucleótidos específicas predeterminadas. La reparación de tales DSB mediante rutas de reparación de ADN endógeno generalmente conduce a un error, supresión o sustitución de nucleótidos, lo que conduce efectivamente a la interrupción del gen objetivo de Cbl-b.
- 45 En otra realización, se puede atenuar y/o reducir la actividad de Cbl-b mediante cualquier agente que maneje la actividad de la proteína Cbl-b, incluyendo pero sin limitarse a la actividad de Ub-ligasa de Cbl-b.
- 50
- 55

5 En otros aspectos, la descripción proporciona un método para elaborar células T CD8⁺ deficientes de Cbl-b^{-/-} por ablación de Cbl-b en infiltrados de CTL específico de tumor. Los tejidos tumorales a menudo contienen grandes cantidades de leucocitos infiltrantes que son enriquecidos por los CTL específicos de tumor. Estas células usualmente no pueden responder a los tumores. La descripción proporciona métodos, que demuestran que la inactivación de Cbl-b en infiltrados de CTL específicos de tumor restablece su sensibilidad a los tumores, ya que las células T de Cbl-b^{-/-} responden a una estimulación débil del antígeno y no dependen de coestimulación para activación. En ciertas realizaciones, los métodos pueden utilizar ARNpi o una forma negativa dominante de Cbl-b para determinar si la inhibición de la función de Cbl-b en CTL infiltrantes de tumor devuelve a estos CTL los caracteres de las células T de Cbl-b^{-/-}. En otras realizaciones, la descripción proporciona métodos para determinar si los infiltrados de CTL específicos tumor erradican eficientemente los tumores establecidos.

15 En ciertos aspectos, la descripción está dirigida a métodos para la elaboración de los CTL "súper asesinos" que pueden ser completamente activados y ejercen la función efectora independiente de la coestimulación. Este método comprende la subregulación de la actividad de Cbl-b en las células T CD8⁺. En otros aspectos, la descripción está dirigida a métodos para el uso de estos "súper asesinos" para obtener una respuesta inmune contra los tumores. En ciertas realizaciones, la descripción está dirigida a métodos para el uso de estos "súper asesinos" en inmunoterapia para el cáncer. Estos métodos permiten dirigir la activación de los CTL específicos del tumor por células tumorales que se caracterizan ya sea con antigenicidad fuerte o débil, y no expresan ligandos coestimuladoras.

20 En otros aspectos, los métodos para elaborar células T CD8⁺ que no requieren coestimulación, también denominadas como CTL "súper asesinos", en donde los CTL se pueden aislar de infiltrados específicos del tumor. Los infiltrados tumorales se enriquecen de CTL contra los antígenos tumorales, y la inmunoterapia usando estos CTL podría restringir la citotoxicidad para las células tumorales sin provocar una amplia autoinmunidad. En la actualidad, un gran desafío a lo largo de esta dirección es la identificación de las rutas moleculares que controlan las señales coestimuladoras. La modulación de estas rutas debe ser un medio poderoso para eliminar el requisito de coestimulación de la activación de células T inducida por TCR, permitiendo en consecuencia la función efectora y de cebado de los CTL específicos del tumor, en forma independiente de las señales de coestimulación. La citotoxicidad de los CTL requiere la activación de los CTL. Sin embargo, los datos proporcionados en este documento indican que la transferencia de los CTL de Cbl-b^{-/-} no activados también puede rechazar tumores, por ejemplo tumores E.G7. Estos resultados demuestran que la ablación de Cbl-b mejora la activación de las células T.

Métodos para la selección de agentes que inhiben la actividad de Cbl-b

30 En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos de selección para identificar agentes, incluyendo, pero no limitado a compuestos químicos, que pueden atenuar y/o inhibir la actividad de Cbl-b, incluyendo pero no limitado a la actividad de Ub-ligasa de Cbl-b. En una realización, el método de selección puede utilizar un ensayo para medir la actividad de Ub-ligasa de Cbl-b para determinar si un agente afecta la actividad de Cbl-b. En otras realizaciones, los métodos pueden utilizar un ensayo para medir la activación independiente de CD28 de los CTL, la subregulación desmejorada de TCR inducida por la estimulación anti-TCR, o la pérdida de supresión de TGF-beta de la proliferación de CTL, o cualquier combinación de los mismos. Cualquiera de estos ensayos se puede utilizar para determinar si un agente modula o altera la función de Cbl-b.

40 En ciertas realizaciones, un método para identificar un agente que afecta la expresión o actividad de Cbl-b comprende: la estimulación de una célula con un anticuerpo anti-CD3 en ausencia de coestimulación con anticuerpo anti-CD28, poner en contacto la célula con un agente candidato, la medición de los niveles de estimulación o proliferación celular, en donde un agente que conduce a la estimulación o la proliferación celular es indicativo de un agente que subregula la actividad o expresión de Cbl-b. Los ejemplos no limitantes de células adecuadas que se pueden utilizar en los métodos para identificar un agente, que afectan la expresión o actividad de Cbl-b, son células T CD4⁺ y T CD8⁺. Los ensayos para medir la estimulación y proliferación de las células T son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, ensayos que miden el nivel de expresión de citoquinas, por ejemplo, pero no limitado a IL-2, INF-γ, e IL-10.

50 En ciertas realizaciones, la descripción proporciona métodos para identificar un agente que afecta la actividad de Cbl-b, que comprende: poner en contacto una fuente de Cbl-b con un agente, la determinación de si el agente disminuye la actividad de Cbl-b. Los ensayos que se puede utilizar para medir la subregulación de la actividad de Cbl-b incluyen, pero no se limitan a, la determinación de los niveles de proliferación de células T inducida por TCR, ubiquitinación de p85, submodulación de TCR inducida por antígeno, y la supresión de TGF-beta de la proliferación celular, en donde un agente que mejora la proliferación de células T en presencia o en ausencia de TGF-beta, o disminuye la submodulación de TCR inducida por antígeno (Naramura M y colaboradores, 2004), o disminuye la ubiquitinación de p85 (Fang D. y colaboradores, 2001) es indicativo de un agente que disminuye la actividad de Cbl-b. En ciertas realizaciones, los métodos para identificar un agente que afecta la actividad de Cbl-b también pueden comprender una etapa de determinación de si el agente se une a Cbl-b.

En ciertos aspectos, la descripción establece que las células T de Cbl-b^{-/-} juegan un papel esencial en el rechazo del tumor. En ciertos aspectos, la descripción establece que ratones Cbl-b^{-/-}, son resistentes a la inoculación del tumor.

En ciertas realizaciones el agotamiento o reducción del número de células T en ratones Cbl-b^{-/-} permite un crecimiento vigoroso de los tumores inoculados. En otros aspectos, la descripción establece que existen infiltrados masivos de T CD8⁺ en los tejidos tumorales de ratones Cbl-b^{-/-}. En otros aspectos, la descripción establece que las células T CD8⁺ de ratones Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta y producen altos niveles de IL-2 e IFN- γ y después de la activación de TCR incluso en ausencia de coestimulación de CD28. En otros aspectos, la descripción establece que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} aisladas o purificadas en ratones portadores de tumores es suficiente para erradicar los tumores E.G7 establecidos. En otros aspectos, la descripción establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} responden a la estimulación antigénica tumoral y ejercen actividad citotóxica contra las células tumorales independiente de las señales coestimuladoras. Los CTL específicos del tumor se pueden identificar, aislar, y/o enriquecer a partir de tejidos tumorales por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación de células fluorescentes, o por perlas magnéticas. Tales procedimientos generalmente producen una población de células que comprende al menos aproximadamente 85% a 89%, 90% a 95% de los CTL. El enriquecimiento por rondas sucesivas de purificación puede producir una población de células que comprende al menos aproximadamente 95%-99% de los CTL. En ciertos aspectos, la invención proporciona una población de células que comprenden alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% de los CTL. En ciertos aspectos, la descripción proporciona métodos para la modulación de la ruta de Cbl-b en células T CD8⁺, en donde en ciertas formas de realización las células T CD8⁺ pueden aislarse de los infiltrados tumorales. Los métodos de la presente descripción se pueden utilizar para generar CTL "súper asesinos" que se pueden utilizar en inmunoterapia del cáncer.

Ejemplos y ejemplos hipotéticos

Ratones y células. Los ratones con desactivación de Cbl-b (Cbl-b^{-/-}) y desactivación de ATM (ATM^{-/-}) se generaron como se describió anteriormente (Chiang y colaboradores, 2000; Barlow y colaboradores, 1996). Los ratones Cbl-b^{-/-} fueron sometidos a retrocruzamiento con ratones C57BL/6 durante 12 generaciones. Los ratones C57BL/6, Cbl-b^{-/-}, ATM^{-/-}, Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} doblemente desactivados se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos de conformidad con los lineamientos y protocolos para el cuidado de animales. Se mantuvieron células EL4 (ATCC, Rockville, MD) y E.G7 en RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, glutamina, y ácido 2-mercaptoetanol.

Proliferación de células T *in vitro* y ensayos de producción de citoquina. Se purificaron células T totales o células T CD8⁺ a partir del bazo por MACS utilizando una célula T o un kit para el enriquecimiento de células T CD8⁺ (Miltenyi Biotech). Para el ensayo de proliferación de células T, se estimularon las células T CD8⁺ purificadas con diversas concentraciones de anti-CD3 ϵ unido a la placa y anti-CD28 soluble (5 μ g/ml) durante 72 h. Después de pulsar las células con [³H]-timidina (1 μ Ci/ml) durante las 12 h, se recolectaron las células y se determinó la absorción de [³H]-timidina utilizando un contador β . Para la tinción intracelular con IL-2 e IFN- γ , se estimularon las células durante 12 horas con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 + anti-CD28. Después de una incubación adicional con Brefeldina A (5 μ g/ml) durante 6 horas, se tiñó la superficie de las células estimuladas con anticuerpo anti-CD8, se fijaron y permeabilizaron en solución de Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen), y luego se tiñeron intracelularmente con anticuerpos anti-IFN- γ y anti-IL-2. Se analizaron las células teñidas en un LSR II (BD Bioscience) utilizando el software FlowJo (TreeStar, Inc.). Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD28, anti-CD4, anti CD8, anti-IL-2, anti-IFN- γ , anti-TCR β , anti-CD44, y anti-CD62L conjugados con fluorocromo o purificados eran de BD PharMingen. El análisis ELISA de la producción de IL-2 se realizó de acuerdo a un protocolo anterior (Chiang y colaboradores, 2000).

Inmunohistoquímica y análisis de los linfocitos que infiltran el tumor. Siete y diecinueve días después de la inoculación del tumor, se recogieron los tejidos tumorales, se congelaron en medio Tissue-Tek OCT (Sakura Finetech), y se crioseccionaron. Se tiñeron las secciones ya sea con hematoxilina o con eosina (H/E) o con anticuerpo FITC-anti-CD8. Se registraron los resultados de la tinción por microscopía normal o de fluorescencia. Para analizar los infiltrados tumorales por citometría de flujo, se prepararon los linfocitos que infiltran el tumor a partir de tejidos tumorales 14 días después de la inoculación. Se cortaron los tumores de ratones sacrificados, se lavaron en PBS, y se cortaron en piezas de 2-3 mm de tamaño. Las piezas de tumor resultantes se digirieron luego a 37°C con colagenasa D (1,5 mg/ml, Sigma) en DMEM complementado con 2% de suero bovino fetal y 50 unidades/ml de ADNasa I (Sigma). Después de la digestión durante 40 minutos, se pasaron las células a través de un filtro de 70 μ m y se lavó la suspensión celular recogida con PBS, se tiñó con una combinación diferente de anticuerpos, y se analizaron en un LSR II. Los anticuerpos utilizados para la tinción fueron anti-TCR β , anti-CD8, anti-CD44 y anti-CD62L (BD PharMingen).

Experimentos *in vivo*. Las células tumorales que crecieron en fase logarítmica se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en PBS. Después de afeitar el costado derecho, se realizó la inyección subcutánea con los números indicados de células en 100 μ l de PBS. Se hizo seguimiento al crecimiento del tumor semanalmente o dos veces por semana usando un calibrador. Para la transferencia adoptiva, el día 7 después del establecimiento del tumor en ratones C57BL/6, los ratones fueron inyectados con 3×10^6 células T CD8⁺ purificadas aisladas a partir de células de ganglios linfáticos de tipo silvestre y ratones Cbl-b^{-/-} utilizando un kit de enriquecimiento de células T CD8⁺ (Miltenyi Biotech). Luego se hizo seguimiento al crecimiento del tumor cada tres días utilizando un calibrador. El crecimiento

del tumor en ratones Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} se midió semanalmente. Los volúmenes tumorales se aproximaron multiplicando la longitud medida por el ancho medido por el promedio calculado de la longitud medida y los valores de anchura, como se describió previamente (Helmich, B. K., y R. W. Dutton. 2001. The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors. *J Immunol* 166: 6.500 - 6.508).

Secreción y/o proliferación de citoquina de células T CD8⁺ purificadas: la secreción y/o proliferación de citoquina de células T CD8⁺ purificadas de ratones Cbl-b^{-/-} y de tipo silvestre se comparó después de la estimulación a través del TCR solo o coestimulación a través del TCR y del receptor coestimulador CD28. Las células T CD8⁺ de tipo silvestre generaron respuestas de IFN-γ e IL-2 después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 solo (Fig. 1a). Las células T CD8⁺ de tipo silvestre produjeron aproximadamente 6 veces más IL-2 y 2-3 veces más IFN-γ cuando se proporcionó coestimulación de CD28. La estimulación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} con anticuerpo anti-CD3 solo, provocó niveles mucho más altos de IL-2 e IFN-γ incluso en comparación con las respuestas de células de tipo silvestre coestimuladas por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. La adición de señalización coestimuladora por el anticuerpo anti-CD28 también mejoró ligeramente la producción de IL-2 por las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}; sin embargo, el nivel de IFN-γ no aumentó (Fig. 1a).

La inactivación de Cbl-b por cualquier método adecuado superó en gran medida el requisito de coestimulación de CD28 en respuestas de citoquina de las células T CD8⁺. Cuando se estimularon los cultivos que contienen tanto células T CD8⁺ como CD4⁺, mejoró notoriamente la producción de IFN-γ, pero no la de IL-2 por las células T CD8⁺ de tipo silvestre; sin embargo, la producción de IFN-γ por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} fue comparable a la de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} (Fig. 5), lo que sugiere que la ayuda de las células T CD4⁺ no tiene un efecto aditivo sobre la respuesta de IFN-γ de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}. En consonancia con los efectos observados sobre las respuestas de IL-2, el anticuerpo anti-CD3 solo indujo una proliferación significativamente mayor de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} purificadas que aquella de las células T de tipo silvestre (Fig. 1b). Además, aunque la respuesta proliferativa de las células T CD8⁺ de tipo silvestre mejoró notablemente cuando se coestimularon las células con anti-CD3 y anti-CD28, alcanzando un nivel equivalente a la respuesta de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} estimuladas por anti-CD3 solo, no se elevó dramáticamente la proliferación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} por coestimulación de CD28 (Fig. 1b). En otros aspectos, la invención establece que la ablación de la actividad de Cbl-b vuelve a las células T CD8⁺ capaces de responder a la estimulación de TCR sin el requisito de coestimulación de CD28 y ayuda de células T CD4⁺. Figura 1c muestra que aunque la presencia de TGF-β suprimió notablemente la proliferación y producción de IFN-γ de células T CD8⁺ de TS, el mismo TGF-β ejerció poco efecto sobre las células T CD8⁺ Cbl-b^{-/-} (Figura 1C). Este resultado indica que la susceptibilidad a la supresión de TGF β se ve comprometida en células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}.

Rechazo de tumores trasplantados en ratones Cbl-b^{-/-}

La pérdida de la dependencia en la señalización CD28 para la activación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} sugiere que células T de Cbl-b^{-/-} pueden ser activadas por células tumorales en ausencia de ligandos coestimuladoras. Los ratones Cbl-b^{-/-} montan una respuesta inmune eficiente contra células tumorales que carecen de expresión de moléculas coestimuladoras B7. Los ratones Cbl-b^{-/-} son resistentes a los timomas EL4 y E.G7 inoculado de murino. Las células EL4 se derivan de un linfoma de linaje T que se desarrolló en un ratón negro C57 tratado con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno. Las células EL4 representan un modelo tumoral con inmunogenicidad débil (Gorer P.A., 1950. Studies in antibody response of mice to tumor inoculation. *Br J Cancer* 4: 372-379). Las células E.G7 son transfectantes de EL4 que expresan un transgén que codifica ovoalbúmina de pollo (OVA) y, por lo tanto, se considera que son tumores altamente inmunogénica en los cuales la OVA sirve como el antígeno específico del tumor (Moore , M.W., F.R. Carbone, y M.J. Bevan, 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54: 777-785). Ni los linfomas de EL4 ni los de E.G7 expresan B7.1 o B7.2 en la superficie de la célula. Tanto los linfomas de EL4 como de E.G7 crecen progresivamente ratones C57BL/6 después de inoculación subcutánea, mientras que por el contrario las células EL4 transfectadas B7, son rechazadas, demostrando un papel crítico de la coestimulación en la respuesta antitumoral de ratones de tipo silvestre (Yu y colaboradores, 1998).

Se inyectaron células E.G7 (1X 10⁶ células/ratón) en los costados de ratones C57BL/6 y Cbl-b^{-/-} de tipo silvestre y luego se hizo seguimiento al crecimiento del tumor (Fig. 2a). Los tumores crecieron progresivamente en el 83% de los ratones de tipo silvestre (n = 19). Sólo el 23% de los ratones Cbl-b^{-/-} desarrollaron tumores, mientras que el resto, o bien no desarrolló tumores o exhibió regresión tumoral después del crecimiento inicial (n = 34). Por lo tanto los ratones Cbl-b^{-/-} rechazaron los tumores E.G7.

Se inyectó una dosis baja de células EL4 (5 x 10⁴ células/ratón) en los costados de ratones C57BL / 6 y Cbl-b^{-/-} de tipo silvestre, luego se hizo seguimiento al del crecimiento del tumor. Los tumores crecieron rápidamente y mataron al 85% (17/20) de los ratones de tipo silvestre. La misma dosis de tumor fue completamente rechazada en ratones Cbl-b^{-/-} (Figura 2b.). La inoculación de ratones con una alta dosis de células EL4 (2,5 x 10⁵ células/ratón) dio como resultado el crecimiento del tumor en todos los ratones de tipo silvestre (n = 10). La misma dosis alta de células EL4 (2,5 x 10⁵ células/ratón) creció a una tasa mucho más lenta en siete ratones Cbl-b^{-/-} y no crecieron para nada en 3

ratones Cbl-b^{-/-} (figura 2c). Por lo tanto, la ablación de Cbl-b confiere la capacidad de rechazar o atenuar el crecimiento de tumores que expresan ya sea antígenos tumorales fuertes o débiles *in vivo*. La Figura 2e muestra que el rechazo tumoral fue independiente de CD28 ya que los ratones doble mutantes Cbl-b^{-/-} CD28^{-/-} también rechazaron eficientemente los tumores EL4 inoculados (Figura 2e).

5

Tabla 1. Restablecimiento del desarrollo de timocitos c-Cbl Cb-b dKO por c-Cbl

	Timocitos totales	%			CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Relaciones
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	
Ej. 1	(35 x 10 ⁶)				
GFP ⁻	42%	61	15	12	1,2
GFP ⁺	38% @	82	12	3	4,0
Ej. 2*	(60 x 10 ⁶)				
GFP ⁻	48%	55	16	18	0,88
GFP ⁺	21% @	87	10	3	3,33
	(100 x 10 ⁶)				
GFP ⁻	58%	51	17	20	0,85
GFP ⁺	18% @	80	14	4	3,5

@: Las células que expresan un nivel intermedio de GFP no fueron incluidas
 *: Resultados de dos ratones receptores independientes.

10

Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} erradicaron eficazmente tumores singénicos. Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} responden a la estimulación antigénica en forma independiente de la coestimulación de CD28 y la ayuda de células T CD4⁺. La resistencia de ratones Cbl-b^{-/-} a los tumores inoculados está principalmente mediada por células T CD8⁺. En ciertas realizaciones, la infiltración de células T CD8⁺ en tejidos tumorales se examinó mediante inmunohistología (Fig. 3a). Se inocularon aproximadamente 10⁶ células E.G7 en los costados de ratones C57BL/6 y ratones Cbl-b^{-/-} por inyección subcutánea. Siete días después de la inoculación, no había infiltrados detectables de células CD8⁺ en tejidos tumorales ni en ratones de tipo silvestre ni Cbl-b^{-/-}. Dos semanas después de la inoculación, se encontró un aumento marcado de infiltrados de leucocitos CD8⁺ en tumores en ratones Cbl-b^{-/-}, pero no de tipo silvestre. Los infiltrados de CD8⁺ permanecieron abundantes en los tumores en regresión en ratones Cbl-b^{-/-} 19 días después de la inoculación (Fig. 3a.), en donde, la infiltración fue mínima en tumores en ratones de tipo silvestre. Los análisis de citometría de flujo revelaron que, a diferencia de los infiltrados de CD8⁺ en tumores en ratones de tipo silvestre, que subregularon la superficie de TCRβ, los infiltrados de CD8⁺ en tumores de ratones Cbl-b^{-/-} expresaron receptores TCRαβ en un nivel comparable a aquel en las células T no modificadas de ganglio linfático (Fig. 3b). Estas células T CD8⁺ también expresaron un alto nivel de CD44 (Fig. 3b), lo que sugiere que eran células T CD8⁺ activadas.

15

20

25

30

35

Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son responsables de la erradicación de los tumores. Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} de tipo silvestre purificadas (3 x 10⁶ células/ratón) fueron transferidas a ratones portadores de tumor E.G7 por inyección intravenosa, y se hizo seguimiento al crecimiento del tumor. Los tumores E.G7 establecidos, que fueron inoculados 8 días antes de la transferencia de células T CD8⁺, fueron eficientemente erradicados en el lapso de 4-5 semanas en un 65% (20/30) y los tumores crecieron a una tasa mucho más lenta en el resto de los ratones que recibieron células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}. Al menos el 90% (23/26) de los ratones que recibieron las células T CD8⁺ de tipo silvestre tuvieron un rápido crecimiento tumoral (Fig.3c). En ciertos aspectos, la invención establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son suficientes para montar una respuesta inmune eficiente contra los tumores establecidos. La Figura 3d muestra que los análisis de citometría de flujo revelaron que a diferencia de los infiltrados de CD8⁺ en los tumores en ratones TS, que subregularon la superficie de TCRβ, los infiltrados de CD8⁺ en tumores de ratones Cbl-b^{-/-} expresaron receptores TCRαβ a un nivel comparable a aquel en células T no modificadas de ganglios linfáticos (Figura 3d). Estas células T CD8⁺ también expresaron un alto nivel de CD44 (Figura 3d), lo que sugiere que se activaron. Además de las células T CD8⁺, los tumores tanto en ratones TS como en Cbl-b^{-/-} también contenían células T CD4⁺ e infiltrados CD4⁺ FoxP3⁺ Treg (Figura 3d). Hubo significativamente más infiltrados Treg en tumores en ratones Cbl-b^{-/-} que en ratones TS (P <0,005).

40

45

Para determinar si células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} eran responsables por la erradicación de los tumores, se transfirieron células T CD8⁺ purificadas de TS o Cbl-b^{-/-} (3 x 10⁶ células por ratón) en ratones portadores de tumor E.G7 inyección intravenosa y se hizo seguimiento al crecimiento del tumor. Se observó que los tumores E.G7 establecidos, que fueron inoculados 7 días antes de la transferencia de células T CD8⁺, fueron de manera eficiente erradicados en un lapso de 4-5 semanas o crecieron a una tasa mucho más lenta en a ratones que recibieron células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en comparación con los ratones que recibieron células T CD8⁺ de TS (Figura 3e, paneles de la izquierda). En total, 70% de los ratones (n = 13) adoptivamente transferidos con células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} erradicaron tumores y sobrevivieron. Por el contrario, más del 90% de los ratones (n = 11) que recibieron células T CD8⁺ de TS tuvieron un rápido crecimiento del tumor y murieron (Figura 3e, panel derecho). Para determinar si el rechazo observado de tumores E.G7 fue medido por células T CD8⁺ específicas del tumor, se cruzaron ratones Cbl-b^{-/-} con ratones transgénicos OT1 TCR, que expresaron un TCR transgénico que reconoce un péptido OVA en el contexto de H-2Kv.

La mayoría de las células T CD8⁺ desarrolladas en ratones OT1 expresan este transgén TCR y por tanto son capaces de reconocer un péptido OVA expresado por el tumor E.G7. Se encontró que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ OT1 purificadas de TS (3 x 10⁶ células por ratón) en ratones portadores de tumores E.G7 (n = 5) no pudieron prevenir ningún crecimiento tumoral. Por el contrario, la transferencia de células T CD8⁺ en OT1 de Cbl-b^{-/-} en ratones portadores del tumor dio como resultado una regresión completa de los tumores en todos los ratones (n = 5) (Figura 3e). Tomados estos datos en conjunto, indican que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden producir una respuesta inmune eficiente contra tumores establecidos en un huésped TS que de otra forma es incapaz de rechazar el tumor.

La ablación de Cbl-b evita la aparición espontánea de tumores en ratones ATM^{-/-}. El reconocimiento efectivo y la eliminación de tumores E.G7 y EL4 trasplantados por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} indica que la mutación de Cbl-b^{-/-} facilita la vigilancia eficiente y la protección contra tumores espontáneos. En ciertas realizaciones, se cruzaron ratones Cbl-b^{-/-} con ratones ATM^{-/-}, y se analizó la incidencia de linfomas de células T, y la esperanza de vida de los ratones doblemente mutantes resultantes. En forma consistente con los hallazgos anteriores (Barlow C., S. Hirotsune, R. Paylor, M. Liyanage, M. Eckhaus, F. Collins, Y. Shiloh, J.N. Crawley, T. Ried, D. Tagle, y A. Wynshaw-Boris. 1996. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. Cell 86: 159-171), aproximadamente 50% de los ratones ATM^{-/-} murieron a los 6-7 meses de edad, y la mayoría de estos ratones desarrollaron linfoma de células T (Fig. 4). En contraste, no se observaron linfomas en ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} (n = 21 ratones) de 6-7/meses de edad, y aparecieron linfomas en menos del 10% (2/21) de los ratones de 9 meses de edad. En ciertos aspectos, la invención establece que la ablación de la función Cbl-b retrasa y/o evita el inicio de al menos algunos tumores espontáneos.

La erradicación de los tumores E.G7 por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} adoptivamente transferidas puede aparecer menos eficiente que la erradicación de los tumores E.G7 en ratones Cbl-b^{-/-}. En ciertos casos, esto puede ser debido a la cantidad relativamente menor de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en los ratones adoptivamente transferidos que en los ratones Cbl-b^{-/-} (3 x 10⁶ versus > 1-2 x 10⁷/ratón). En otros casos, las células T CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} y/o las células presentadoras de antígeno tales como las células dendríticas, pueden interactuar con células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en rechazo tumoral. Los experimentos utilizando diferentes combinaciones de células T monoclonales CD8⁺ y CD4⁺ específicas del tumor y APC purificadas como células donantes, pueden ayudar a aclarar esta cuestión.

La ablación de línea germinal de Cbl-b en ratones ATM^{-/-} dio como resultado una marcada reducción de tumores espontáneos, y en consecuencia aumentó la esperanza de vida. Dada la observación de que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden montar respuestas inmunes eficientes a tumores E.G7 y EL4 trasplantados, la incidencia reducida de linfomagénesis en ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} pueden resultar de la vigilancia inmunológica mejorada de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} contra los tumores espontáneos que surgen en estos ratones. Debido a que la tumorigénesis es un proceso muy complejo, otra posibilidad es que la mutación de línea germinal Cbl-b^{-/-} disminuye la tumorigénesis en sí misma, en vez de mejorar el rechazo de los tumores que surgen en ratones Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-}. La inhibición sistémica de la función de Cbl-b es un enfoque efectivo para reducir la incidencia de tumores.

Modelos animales portadores de tumores inmunogénicos

En las últimas décadas, los modelos animales portadores de tumores han sido ampliamente utilizados para analizar los mecanismos moleculares y celulares implicados en las respuestas inmunotumorales. Muchos de estos modelos son generados por transferencia adoptiva de diversas células tumorales en animales singénicos con el mismo MHC. Los siguientes tumores son ejemplos no limitantes de modelos animales que pueden ser utilizados en diversas realizaciones de la presente invención. Otros modelos de tumores también pueden ser adecuados para su uso en diversas realizaciones de la invención.

Células tumorales E.G7 y EL4 y ratones transgénicos OT1 TCR (Tg): las células EL4 son una línea tumoral H-2^b negativa para B7 derivada de linfoma de linaje T de un ratón C57BL/6 tratado con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno. Estas células expresan únicamente antígenos propios no mutados y quizás algunos mutados, que representan por lo tanto un modelo de tumores con antigenicidad débil. La línea de células tumorales E.G7 es un derivado de EL4 que expresa un transgén de ovoalbúmina de pollo (OVA). Muestra al epítipo inmunodominante de Ova en su superficie, identificado como el péptido de ocho residuos Ova 257-264 (SIINFEKL) (41). Debido a que Ova no se expresa en células de murino, sirve como un antígeno específico del tumor. Por lo tanto, E.G7 representa un modelo de tumor que refleja tumores antígenicos fuertes tales como células transformadas con virus. Tanto las células EL4 como E.G7, cuando se inocula en forma subcutánea en ratones C57BL/6, desarrollan de forma progresiva tumores sólidos locales de una forma dependiente de la dosis, y eventualmente mata a los ratones receptores después de 4 semanas (42). En el tejido tumoral E.G7, se pueden detectar CTL específicos de Ova, sin embargo, son anérgicos a la estimulación del antígeno tumoral (Ova) (42). Los ratones OT1 son ratones transgénicos TCR en los cuales las células T CD8⁺ que expresan al transgén, expresan un transgén de TCR Vβ8 y Vα2 y específicamente reconocen al péptido Ova (SIINFKL) en el contexto de MHC clase I Kb (43, 44). La inoculación de células G-7 en ratones Tg OT1 también da como resultado crecimiento del tumor, lo que sugiere que la presencia de grandes cantidades de CTL específicos del tumor no es suficiente para rechazar el tumor. Las células E.G7 se pueden utilizar como un modelo

de tumor de células que expresan antígeno específico del tumor, y se pueden utilizar ratones OT1 TCR Tg como la fuente de células T CD8⁺ monoclonales específicas del tumor.

5 Células tumorales B16 y los ratones transgénicos Pmel-1 TCR: el melanoma B76 es pobremente inmunogénico y altamente agresivo en ratones C57BL/6 (45). Las células de melanoma B16 expresan la homología de ratón (pmel-17) de gp100 humana, una enzima involucrada en la síntesis de pigmento en melanocitos normales (34). En este modelo de tumor gp100 representa antígenos propios no mutados que se expresan normalmente en la mayoría de las células tumorales (34). Los ratones Tg Pmel-1 son ratones transgénicos TCR en los cuales las células T CD8⁺ expresan un TCR que reconoce complejos gp100 (gp100₂₅₋₃₃) H-2D^b. A pesar del mayor número de células T CD8⁺ específicas del antígeno, los melanomas B16 se desarrollan a la misma velocidad de crecimiento en ratones Tg Pmel-1 que aquella en ratones C57BL/6 de tipo silvestre, ya que esencialmente todas las células T CD8⁺ restringidas en H-2D^b específicas de gp100 son anérgicas (34). En el estado anérgico de gp100, los CTL restringidos en H-2D^b pueden ser reversados por melanomas inoculados que expresan un ligando B7 (35), o por administración *in vivo* de altas dosis de IL-2 y vacunación con una variante del péptido gp100 (34), resultando en una erradicación completa y duradera de las cargas tumorales. Ya que un vitiligo gradual, limitado causado por autoinmunidad contra melanocitos normales también se presenta en la mayoría de los ratones Tg Pmel-1 donde se observa destrucción del tumor (34), este sistema permite la investigación de posibles efectos secundarios de la inmunoterapia tumoral, tales como autoinmunidad, causada por una respuesta inmune antitumoral contra antígenos asociados a tumores que también son expresados por el tejido normal.

Células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden ser eficientemente activadas en ausencia de coestimulación de CD28

20 Se generaron ratones Cbl-b^{-/-} por manipulación génica (56). La mutación Cbl-b^{-/-} no afecta el desarrollo de órganos linfoides principales. El desarrollo tanto de linfocitos T como B en ratones Cbl-b^{-/-} parece ser normal. Los ratones Cbl-b^{-/-} pueden ser altamente susceptibles a enfermedades autoinmunes. La mutación Cbl-b^{-/-} no afecta la activación de células B inducida por antígeno. Por el contrario, la activación de células T CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} ya no requiere la coestimulación de CD28, en llamativo contraste con las células T de tipo silvestre para las cuales la coestimulación de CD28 fue necesaria para inducir una respuesta productiva, tal como la proliferación celular riguroso y producción de IL-2. Para determinar si la mutación Cbl-b^{-/-} sustituye la coestimulación de CD28 en la respuesta inmune, se cruzaron ratones Cbl-b^{-/-} con ratones CD28^{-/-}, y se examinaron la proliferación de células T *in vitro* y las respuestas de anticuerpos anti-NP que dependen de células T *in vivo* de ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} CD28^{-/-} (59). Aunque las células T de CD28^{-/-} no pueden montar ninguna proliferación detectable después de la estimulación del anticuerpo anti-CD3, las células T de Cbl-b^{-/-} CD28^{-/-} proliferan normalmente bajo la misma condición. Aunque los ratones CD28^{-/-} no pudieron producir ningún anticuerpos anti-NP detectable en suero, los ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} CD28^{-/-} provocan respuestas normales de anticuerpos anti-NP de diferentes isotipos de Ig. Las respuestas de anticuerpo anti-NP en ratones Cbl-b^{-/-} no fueron mejoradas en comparación con la provocadas en ratones de tipo silvestre, lo que sugiere que la mutación Cbl-b^{-/-} apenas resulta en la sustitución de la señalización de CD28 en lugar de una mejora general de las respuestas dependientes de T durante la activación de células T.

40 Por lo tanto, en ausencia de Cbl-b, la activación de células T CD4⁺ es independiente CD28. La activación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} no depende de CD28. En ciertas realizaciones, la producción de IL-2 e IL-gamma en células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} estimuladas con anticuerpo anti-CD3 se mide por tinción intracelular seguida de análisis FACS (61). Mientras que la producción de estas citoquinas por las células T CD8⁺ de tipo silvestre claramente requiere la coestimulación de CD28, las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} estimuladas por anticuerpo anti-CD3 solamente, produce niveles IL-2 e IL-gamma tan altos como los niveles en células T CD8⁺ de tipo silvestre coestimuladas con anti-CD3 y anti-CD28. Por lo tanto, las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden ser activadas de manera eficiente en ausencia de coestimulación de CD28.

Ratones Cbl-b^{-/-} rechazaron eficientemente tumores inoculados con antigenicidad fuerte o débil

45 La mayoría de los tumores inmunogénicos no expresan ligandos para moléculas coestimuladoras. Esto ha sido considerado como uno de los mecanismos mediante los cuales los tumores rompen la vigilancia inmune y disminuye la efectividad de la inmunoterapia tumoral. Ya que las células T de Cbl-b^{-/-} no requieren la coestimulación de CD28 para activación, los ratones Cbl-b^{-/-} son resistentes a la implantación de tumores E.G7, EL4, o B16. Las células tumorales E.G7 son células EL4 que expresan ovoalbúmina de pollo (Ova), una línea celular de timoma derivada de ratones C57BL/6. Esta línea celular ha se utilizada como modelo de tumores antigénicos fuertes que expresan un antígeno específico del tumor, ya que Ova de pollo no se expresa en ratones normales. Por contraste con células E.G7, las células de melanoma EL4 y B16 se derivan directamente de tumores primarios, representando así tumores que expresan ya sea antígenos débiles específicos del tumor o solamente antígenos propios. Para evitar respuestas alogénicas contra los tumores implantados, se hicieron retrocruzamientos de ratones Cbl-b^{-/-} con ratones C57BL/6 singénicos para estos tumores durante 12 generaciones. La inoculación de células E.G7 (10⁶/ ratón) en forma subcutánea en el costado de los ratones C57BL/6 de tipo silvestre da como resultado un rápido crecimiento de tumores sólidos, lo que indica que estos ratones no pueden montar una respuesta inmune contra el tumor E.G7 inoculado. Por el contrario, la inoculación de la misma cantidad de células E.G7 en ratones Cbl-b^{-/-} da como resultado incidencias mucho menores de tumores. En algunos ratones Cbl-b^{-/-}, crecieron inicialmente tumores, y

luego retrocedieron uno a dos semanas después. Ya que las células B7 no se expresan en células E.G7 (36), este resultado indica, por lo tanto, que la ablación de Cbl-b puede volver al animal resistente a los tumores antigénicos fuertes inoculadas que no expresan las B7.

5 Para determinar si los ratones Cbl-b^{-/-} montan respuestas inmunes contra tumores que expresan antígenos débiles o antígenos propios, se examinó la susceptibilidad de ratones Cbl-b^{-/-} a los tumores EL4 y B16 implantados. Aunque los ratones de control de tipo silvestre desarrollaron tumores después de la inoculación con números bajos de células EL4 (2,5 x10⁴) o B16 (1,0 x10⁴)/ratón, los ratones Cbl-b^{-/-} que recibieron la misma cantidad de células tumorales no desarrollaron ningún tumor durante el mismo período. La inoculación de altas dosis de células EL4 (1,25 x 10⁵) o B16 (1,25 x 10⁵) dio como resultado el crecimiento de tumores tanto en ratones de tipo silvestre como en Cbl-b^{-/-}. El deterioro de la capacidad de los ratones Cbl-b^{-/-} para rechazar las altas dosis de células tumorales puede reflejar el hecho de que la frecuencia de células T específicas del tumor en el repertorio de células T naturales es demasiado bajo para anular el crecimiento rápido de las células tumorales. Esta posibilidad puede ser cuantitativamente evaluada por ejemplo mediante el uso de células T específicas de tumor de ratones transgénicos TCR. Por lo tanto los ratones Cbl-b^{-/-} producen respuestas inmunes contra tumores que expresan ya sea antígenos tumorales fuertes o débiles.

El rechazo de tumores E.G7 implantados es mediado por células T

20 Experimentos previos han demostrado que el rechazo de tumores inmunogénicos es principalmente mediado por células T. De forma consistente con este resultado, estudios inmunohistológicos y de citometría de flujo revelaron que tejidos tumorales E.G7 fueron infiltrados por grandes cantidades de células CD8⁺. Para determinar el papel de las células T en el rechazo de tumores E.G7 en ratones Cbl-b^{-/-}, se examinó la tasa de crecimiento de tumores E.G7 ratones Cbl-b^{-/-} con cantidades reducidas de células T. La reducción de las células T se logró mediante inyección intravenosa repetida de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD4 (100 µg/ratón/inyección). Este tratamiento eliminó la mayoría de las células T CD4⁺ y CD8⁺ tanto del bazo como de los ganglios linfáticos de los ratones tratados. Para determinar si los ratones Cbl-b^{-/-} con cantidades reducidas de células T fueron capaces de montar una respuesta antitumoral eficiente, se inocularon 1x10⁶ células E.G7 en ratones Cbl-b^{-/-} y luego se hizo seguimiento semanalmente al crecimiento de los tumores. En forma contraria a los ratones Cbl-b^{-/-} no tratados, en los cuales fueron rechazados los tumores, los tres ratones Cbl-b^{-/-} con cantidades reducidas de células T portaban tumores mayores a 20 mm de diámetro al final de las 5 semanas después de la inoculación. Por lo tanto, las células T CD8⁺ son responsables del rechazo tumoral en ratones Cbl-b^{-/-}.

30 Infiltración masiva de células T CD8⁺ en tejido tumoral E.G7

35 La masa tumoral a menudo contiene grandes cantidades de infiltrados de células T CD8⁺. Estos infiltrados usualmente no son sensibles a la estimulación del antígeno tumoral, a pesar del hecho de que los infiltrados están enriquecidos por CTL específicos del tumor. Para determinar si los tejidos tumorales E.G7 contienen células T CD8⁺ infiltradas, se inocularon células E.G7 en forma subcutánea en el costado de ratones Cbl-b^{-/-} y C57BL/6. Las células T CD8⁺ que infiltran el tumor en secciones de tejido tumoral fueron identificadas mediante tinción inmunohistológica usando anticuerpo anti-CD8. En tumores recolectados aproximadamente el día 20 después de la inoculación, se detectan las células CD8⁺ (CD8α⁺) en muestras tumorales tanto de ratones de tipo silvestre como de Cbl-b^{-/-} portadores de tumores, con significativamente más infiltrados de CD8⁺ en tumores de ratones Cbl-b^{-/-}.

40 Para determinar cuantitativamente si las células CD8α⁺ observadas eran células T CD8⁺, se digirieron tejidos tumorales con colagenasa para generar suspensiones celulares individuales. Se analizaron luego las células CD8⁺ en los tejidos tumorales mediante citometría de flujo después de tinción de las células con anticuerpos anti-TCRβ, CD8α⁺, CD44 y CD62L. Las células CD8⁺ en tejidos tumorales expresaron la cadena de TCR, lo que indica que eran realmente células T CD8⁺. Además, de acuerdo con el análisis inmunohistológico, el tejido tumoral de ratones Cbl-b^{-/-} contenía en promedio 10 veces más células T CD8⁺. Estas células T de Cbl-b^{-/-} también exhibió fenotipos de células T activadas, incluyendo un alto nivel de CD44 y un bajo nivel de CD62L. Por el contrario, aunque las células T CD8⁺ de tumores de ratones de tipo silvestre también expresaron niveles similares de CD44 y CD62L, expresaron un nivel bajo de TCRβ, lo que sugiere que estas células T CD8⁺ de ratones de tipo silvestre son células anérgicas. En ciertos aspectos, la presente invención establece que existe una expansión extensiva de células T CD8⁺ en tumores de ratones Cbl-b^{-/-}. Las células T CD8⁺ tejidos tumorales pueden ser usadas como fuente de CTL CD8⁺ específicos del tumor, que pueden ser usados en terapia de transferencia adoptiva.

La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ purificadas en ratones C57BL/6 portadores de tumores E.G7 dio como resultado la regresión de tumores establecidos.

55 Las respuestas antitumorales en ratones Cbl-b^{-/-} son mediadas por células T CD8⁺. La respuesta inmune antitumoral contra células tumorales puede ser provocada por transferencia adoptiva de células T CD8⁺. El método puede comprender proporcionar y/o aislar células T CD8⁺ purificadas a partir de ratones Cbl-b^{-/-} o de tipo silvestre, en donde en ciertas realizaciones la purificación de células T CD8⁺ puede hacerse mediante clasificación celular magnética (MACS), transfiriendo las células T CD8⁺ purificadas (3 x 10⁶ células/ratón) en ratones C57BL/6

portadores de tumores E.G7 por inyección intravenosa, y haciendo seguimiento semanal al crecimiento del tumor. La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de tipo silvestre en los ratones portadores de tumores no afectó el crecimiento del tumor. Por el contrario, 5 de los 6 ratones que recibieron células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} exhibieron regresión tumoral cuatro semanas después de la transferencia. La invención establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son suficientes para mediar las respuestas antitumorales. En ciertas realizaciones, las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} incluyen células T CD8⁺ en las cuales la actividad de Cbl-b ha sido reducida por cualquier agente o método adecuado conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a desactivación mediante el uso de ARNpi, ARNhp, transfección con una forma negativa dominante de Cbl-b, desactivación de la copia genómica de Cbl-b, son suficientes para mediar las respuestas antitumorales. Un polipéptido, que se espera que funcione como forma negativa dominante contra Cbl-b, es un polipéptido que contiene únicamente el dominio PTB de Cbl-b, posiciones 1-377 en la secuencia de aminoácidos de Cbl-b.

Las células T de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta

TGF-beta producido por tumores o células reguladoras es uno de los mecanismos que puede evitar la vigilancia inmune antitumoral mediada por células T. Un informe previo sugirió que las células T CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} eran resistentes a la supresión mediada por TGF-beta. Para determinar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} responden a la estimulación antigénica en presencia de TGF-beta, se examinaron *in vitro* la proliferación inducida por anti-CD3 y la producción de IFN-γ de las células T CD8⁺ purificadas de tipo silvestre y ratones Cbl-b^{-/-} en presencia o en ausencia de TGF-beta. CD8⁺ de tipo silvestre exhibió una supresión de la proliferación dependiente de la dosis TGF-beta, como se evidencia mediante una disminución reducida de la intensidad de CFSE en presencia de TGF-beta, la proliferación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} no se vio afectada, incluso en presencia de las dosis más altas (5 μg/ml) de TGF-beta. La presencia de TGF-beta (5 μg/ml) no afectó las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} con respecto a la producción de IFN-γ. Por el contrario, la producción de IFN-γ fue completamente suprimida en células de tipo silvestre por la misma concentración de TGF-beta. En ciertos aspectos, la invención establece que las células T CD8⁺ deficientes en Cbl-b, que incluyen, pero no se limitan a las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, responden a los tumores, incluso en el entorno donde está presente TGF-beta.

Cuantificación de la capacidad de los CTL de Cbl-b^{-/-} para montar respuestas eficientes contra diversos tumores

Las células tumorales pueden escapar de la vigilancia inmune por diversos mecanismos, incluyendo antigenicidad débil, la falta de señales coestimuladoras, y la prevención de respuestas de células T por TGF-beta, células T reguladoras, y barrera del tumor. Los ratones Cbl-b^{-/-} rechazan de manera eficiente al tumor antigénico fuerte (E.G7). Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son responsable del rechazo del tumor. En otros aspectos, la invención establece que los tumores antigénicos débiles tales como EL4 y B16 son rechazados únicamente cuando estos tumores se inoculan a bajas dosis, sugiriendo que, o bien la activación de células T específicas del tumor por estos tumores es menos eficiente o que existe una frecuencia baja de células T CD8⁺ específicos del tumor. Ya que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son sin embargo activadas por estos tumores, la transferencia adoptiva de un gran número de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas del tumor pueden aumentar significativamente las respuestas inmunes contra estos tumores.

En ciertos aspectos, la invención proporciona métodos para determinar cuantitativamente la eficiencia de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas del antígeno tumoral en la erradicación de los tumores antigénicos fuertes y débiles utilizando células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} transgénicas del TCR. Para explorar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden responder a los tumores bajo diversas condiciones de supresión, la determinación puede incluir si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden eliminar tumores que pueden impedir que las células T respondan a través de la secreción de TGF-beta, reclutamiento de células NKT, o barrera del tumor usando diversos modelos tumorales. Los resultados de estos estudios proveen no solamente una medición cuantitativa acerca de la eficiencia de los CTL de Cbl-b^{-/-} específico del tumor contra tumores antigénicos fuertes o débiles, sino que también demuestra que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden ser usadas para tratar tumores con otra regulación negativa contra respuestas inmunes.

Modelos de tumores y ratones transgénicos TCR de CD8⁺

Las células tumorales pueden expresar antígenos "foráneos", tales como componentes virales o proteínas propias mutadas que no existen en individuos sanos. La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ que reconocen estos antígenos puede provocar respuestas inmunes específicamente contra las células tumorales. Sin embargo, en muchos casos, las células tumorales expresan únicamente antígenos propios no mutados nativos (1). Las células T que reconocen estos antígenos son usualmente anérgicas, y las respuestas inmunes contra estos antígenos, si son provocadas, también podrían dañar los tejidos normales. Los modelos de ratones transgénicos (Tg) TCR de tumores que expresan ya sea un antígeno tumoral nativo o uno "foráneo" pueden ser usados para recapitular las situaciones de los tumores que portan ya sea un antígeno "foráneo" específico del tumor o un antígeno "propio" no mutado. Una ventaja de utilizar de células T transgénicas TCR para este estudio, es que la cantidad de células T específicas del antígeno tumoral puede ser fácilmente determinada con base en la expresión del TCR transgénico.

Tumor antigénico fuerte y ratones Tg TCR OT1

Los tumores E.G7 (MHC H-2^b) son timomas de EL4 que expresan un transgén, ovoalbúmina de pollo (OVA). En ratones C57BL/6 ratones (H-2^b), se pueden utilizar células E.G7 como un modelo de tumor que expresa un antígeno-Ova "foráneo". Las células T CD8⁺ específicas de OVA pueden ser obtenidas de ratones Tg TCR OT1 (H-2^b), que específicamente reconocen un péptido Ova en el contexto de H-2K^b. Bajo circunstancias normales, los ratones OT1 no inmunizados no rechazan tumores E.G7 inoculados, y la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ OT1 no modificadas no pueden erradicar tumores E.G7 establecidos, lo que sugiere que las células T CD8⁺ OT1 que responde contra células E.G7 son suprimidas. Sin embargo, las células tumorales E.G7 que expresan un transgén B7 pueden ser eficientemente rechazados por ratones Tg OT1 incluso en ausencia de inmunización con Ova, lo que sugiere que las señales coestimuladoras son críticas para el cebado y la función efectora de las células T Tg OT1. Los ratones Tg OT1 Cbl-b^{-/-} (en un ambiente de C57BL/6) pueden ser usados para elucidar la eficiencia de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas del tumor en la erradicación de los tumores E.G7 establecidos.

Melanoma B16 y ratones Tg TCR Pmel-1

El melanoma B16 es un modelo de tumor inmunogénico débil. B16 expresa un antígeno propio nativo, el antígeno de diferenciación de melanocitos gp100. La inoculación subcutánea de B16 en ratones C57BL/6 resulta en el crecimiento de tumores sólidos. Las células T CD8⁺ contra el tumor B16 pueden ser obtenidas de ratones Tg TCR Pmel-1 que expresan un TCR que reconoce al antígeno gp100, en el contexto de complejos de H-2D^b. Se ha encontrado que, en ausencia de inmunización, los ratones Pmel-1 no rechazan al melanoma B16 inoculado debido a la tolerancia de las células T por el antígeno propio gp100. Sin embargo, una se puede inducir una respuesta robusta de rechazo tumoral ya sea por la expresión forzada de B7 en las células tumorales, o después de vacunación con una variante del péptido gp100 y la administración de una alta dosis de IL-2. Se generaron ratones Tg Pmel-1 Cbl-b^{-/-} mediante reproducción.

Las células T CD8⁺ específicas del tumor de Cbl-b^{-/-} transferidas adoptivamente pueden erradicar la carga tumoral establecida en ratones huésped

El desarrollo de Ova y células T CD8⁺ específicas de gp100 en ratones OT1 Cbl-b^{-/-} y Pmel-1 Cbl-b^{-/-} puede ser examinado por citometría de flujo. Las células T de ratones Tg Pmel-1 y OT1 de tipo silvestre pueden ser utilizadas como controles. Las células T CD8⁺ transgénico TCR de Pmel-1 de OT1 pueden ser identificadas por tinción de las células con una combinación de anticuerpos anti-CD8 y anti-TCR Vβ8 y Vα2 o anti-TCR Vβ13 y Vα1, respectivamente. El desarrollo de células T CD8⁺ no debe ser alterado en ratones Tg TCR Cbl-b^{-/-}, debido a que la dosis de la mutación Cbl-b^{-/-} no tiene ningún impacto medible en el desarrollo de células T CD4⁺ y CD8⁺ (55, 56).

En ciertas realizaciones, se puede determinar si la activación de las células T CD8⁺ Cbl-b^{-/-} Tg Pmel-1 Cbl-b^{-/-} y OT1 requieren coestimulación de CD28. Las células T CD8⁺ pueden ser purificadas a partir del bazo y los ganglios linfáticos de ratones Pmel-1 Cbl-b^{-/-} y OT1 Cbl-b^{-/-} usando una columna MACS de acuerdo con el protocolo de purificación de células T CD8⁺ (Miltenyi Biotec). Las tasas de proliferación celular y los niveles de citoquinas producidas por las células T CD8⁺ activadas, tales como IL-2 e IFN-γ, pueden ser determinados respectivamente, por la incorporación de ³H-timidina, citometría de flujo, y ELISA después de estimulación de células con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28. Células T CD8⁺ Tg TCR de Cbl-b^{-/-} proliferan vigorosamente y producen grandes cantidades de citoquinas, incluyendo IL-2 e IFN-γ, en respuesta a la estimulación de anticuerpos anti-CD3 únicamente. Por el contrario, una fuerte activación de células T CD8⁺ Tg de Pm-1 y OT1 de tipo silvestre depende estrictamente de la coestimulación de CD28. Para determinar si células T CD8⁺ específicas de gp100 y Ova de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión TGF-beta, se puede medir la proliferación y la producción de IFN-gamma en las células T CD8⁺ Tg TCR de Cbl-b^{-/-} purificadas por marcación con CFSE y tinción intracelular, después de que las células se activan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de diversas concentraciones de TGF-beta. Las células T CD8⁺ Tg TCR de Cbl-b^{-/-} deben exhibir una resistencia similar a la supresión de TGF-beta como células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} transgénicas no TCR.

Las células T CD8⁺ de ratones Tg TCR Cbl-b^{-/-} se comportan en forma similar a las células T de Cbl-b^{-/-} Tg no TCR. Los ratones Cbl-b^{-/-} Tg TCT rechazan los tumores inoculados más eficientemente que los ratones Cbl-b^{-/-} transgénicos no TCR. Esto se puede determinar por inyección subcutánea de diversas cantidades de células E.G7 o B16 (1 x10⁴-10⁶)/ratón en ratones Tg Pmel-1 Cbl-b^{-/-} o OT1 Cbl-b^{-/-}, respectivamente. El crecimiento de los tumores inyectados puede ser supervisado como se describe en la presente memoria. Se usarán ratones Tg Pm-1 o OT1 de tipo silvestre, C57BL/6, como controles. También se puede determinar si las células T CD8⁺ están implicadas en el rechazo de tumores mediante el examen de la frecuencia y el estado de activación de las células T CD8⁺ que infiltran el tumor en los tejidos tumorales que hacen regresión mediante inmunohistología y citometría de flujo.

Para determinar cuantitativamente la eficiencia de células T CD8⁺ TCR de Cbl-b^{-/-} en la erradicación de tumores establecidos, se pueden transferir en forma intravenosa células T CD8⁺ Tg TCR PM-1 OT1 Cbl-b^{-/-} en los correspondientes ratones portadores de tumores y se puede hacer seguimiento a la cinética de regresión de los tumores establecidos. Para establecer los modelos de ratón portadores de tumores, se pueden inocular en forma subcutánea ratones C57BL/6 de tipo silvestre (n = 5-10 ratones/grupo) con 1-3x10⁶ células tumorales E.G7 o B16. El crecimiento de los tumores puede ser seguido de cerca hasta que el tamaño de los tumores alcanza 5 x 5 mm² de

diámetro. Para examinar la eficiencia de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas del tumor en las respuestas antitumorales, se pueden transferir diversas cantidades (en el intervalo desde aproximadamente 1x10³ hasta aproximadamente 10⁷) de células T CD8⁺ de ratones Tg Pmel-1 Cbl-b^{-/-} o OT1 Cbl-b^{-/-} en los ratones portadores de tumores. Las células T CD8⁺ de ratones Tg Pmel-1 o OT1 Cbl-b^{-/-}, de tipo silvestre, serán utilizados respectivamente como controles. Las células T CD8⁺ pueden ser purificadas por MACS (Miltenyi Biotec). Después de transferencia adoptiva de células T CD8⁺, se puede medir el tamaño del tumor con un micro calibrador semanalmente se pueden documentar las tasas de crecimiento de los tumores como se describió. Los ratones pueden ser sacrificados una vez que los tumores alcanzan un tamaño de 20 x 20 mm² o superior.

El rechazo efectivo de tumores por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} podría ser el resultado de un cebado más eficiente o una función efectora mejorada, o ambos. Este es un aspecto importante en la elucidación de cómo las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} rechazan n células tumorales, ya que esto puede determinar qué tipo de células pueden estar en terapia clínica contra el cáncer. Para determinar si las células T CD8⁺ específicas del tumor son más eficientemente activadas por tumores *in vivo*, se puede hacer seguimiento *in vivo* mediante cebado y activación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en ratones portadores de tumores mediante un enfoque de marcación por CFSE (67). En ciertas realizaciones, se pueden marcar células T CD8⁺ Tg TCR de Cbl-b^{-/-} purificadas sin modificar (1x10⁶) con CFSE *in vitro* y transferidas en los correspondientes ratones Rag2^{-/-} portadores de tumores mediante inyección intravenosa. Los ratones Rag2^{-/-} pueden ser adecuados como receptores de tumores, ya que no tienen linfocitos, ya que las células T del donante pueden ser fácilmente identificadas. Adicionalmente, usando de ratones Rag2^{-/-} como receptores se puede excluir el efecto de cualquier ayuda de las células T CD4⁺ ya que los ratones Rag2^{-/-} no tienen células T CD4⁺. Para determinar la activación y proliferación de las células T CD8⁺ transferidas, se puede preparar una suspensión individual de células de tejidos tumorales mediante digestión con colagenasa y se puede examinar la intensidad de CFSE (un parámetro para la división celular) en células T CD8⁺ del donante por citometría de flujo. El estado de activación de las células T CD8⁺ infiltradas puede ser determinado con base en los marcadores de activación de la superficie celular tal como CD69, CD44, CD25 y CD62L por citometría de flujo. El aumento en la división celular, así como la cantidad total de células que expresan los marcadores de activación de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} comparado con los cantidades medidas en células de tipo silvestre puede indicar que mutación Cbl-b^{-/-} mejora el cebado de las células T CD8⁺ por las células tumorales.

La mutación Cbl-b^{-/-} aumenta la función efectora de los CTL. En ciertos casos, la transferencia adoptiva de las mismas cantidades de células T CD8⁺ Tg TCR de Cbl-b^{-/-} activadas *in vitro* puede conducir a una erradicación más eficiente de los tumores establecidos comparado con la erradicación de los tumores por las células T CD8⁺ Tg TCR activadas de tipo silvestre. Las células T CD8⁺ activadas *in vitro* pueden ser obtenidas mediante estimulación de células CD8⁺ Pmel-1 o OT1 y de tipo silvestre y de Cbl-b^{-/-} purificadas, ya sea con anticuerpo anti-CD3 unido a la placa o las APC más Ova o el péptido gp100 (100 μM) en presencia de IL-2. Adicionalmente, para medir directamente si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} efectoras son asesinas más potentes que las células T CD8⁺ de tipo silvestre, se puede comparar la citotoxicidad de células T CD8⁺ Tg de Pmel-1 y OT-1 Cbl-b^{-/-} con aquella de las células CD8⁺ Tg TCR de tipo silvestre correspondientes a las células tumorales como objetivos utilizando un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

Para determinar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} proporcionan una protección a largo plazo, y montar una memoria eficiente de respuesta contra los tumores, se puede hacer seguimiento a la recurrencia de tumores en ratones Cbl-b^{-/-} inoculadas con tumor E.G7 y B16 durante un periodo de tiempo extendido, por ejemplo, pero sin limitarse a más de 1,5 años. En ciertas realizaciones, la presencia de células T CD8⁺ de memoria CD8⁺ específicas del tumor en ratones Cbl-b^{-/-} con regresión tumoral, puede ser determinadas retando a los ratones con el mismo tumor y luego comparando la cinética de crecimiento del tumor. La frecuencia de las células T de memoria CD8⁺ específicas del tumor en ratones con regresión tumoral puede ser determinada mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando las correspondientes células tumorales como objetivos.

Una vacunación combinada y administración de IL-2 se ha demostrado que mejora la erradicación del tumor B16 por ratones Tg TCR Pmel-1 después de la vacunación con el péptido pmel-17 (34). Para determinar el efecto de este procedimiento para el rechazo del tumor mediado por células T CD8⁺ Tg de Pmel-1 Cbl-b^{-/-}, se pueden vacunar ratones portadores del tumor B16 y tratarlos con IL-2 (100.000 U/ratón, de N.P. Restifo) después de la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ Tg de Pmel-1 de tipo silvestre y Tg de Pmel-1 Cbl-b^{-/-}, y se puede hacer seguimiento a la regresión del tumor. El resultado de este experimento puede demostrar que un tratamiento combinado de vacuna, IL-2, y Los CTL específicos del tumor de Cbl-b^{-/-} tienen un efecto aditivo en el rechazo del tumor.

Los ratones Cbl-b^{-/-} montan una respuesta eficiente contra: un tumor antigénico resistente implantado (E.G7), y bajas dosis de tumores antigénicos débiles (EL4 y B16). La transferencia adoptiva células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} purificadas y/o aisladas es suficiente para erradicar tumores establecidos, por ejemplo un tumor E.G7 establecido. En otros aspectos, las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son asesinas tumorales potentes. La eficiencia de la erradicación de tumores puede ser mejorada con proporciones mayores de células T CD8⁺ específicas del tumor frente a las células tumorales objetivo. En ciertos casos, los ratones CD8⁺ Tg Pmel-1 o OT1 Cbl-b^{-/-} producen respuestas antitumoral más fuertes debido a que estos ratones poseen significativamente más células T CD8⁺ específicas de tumores que los ratones Tg no TCR Cbl-b^{-/-}. Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son responsables por provocar una respuesta

antitumoral, y la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ Tg de Pmel-1 Cbl-b^{-/-} o Tg de OT-1 Cbl-b^{-/-} en los correspondientes ratones portadores de tumores pueden erradicar eficientemente los tumores establecidos. Se puede determinar el tamaño máximo y la cinética de regresión de la carga tumoral que puede ser erradicada por las células T CD8⁺ Tg de Pmel-1 Cbl-b^{-/-} o Tg de OT-1 Cbl-b^{-/-} adoptivamente transferidos. En otras realizaciones, se pueden determinar las cantidades mínimas de células T CD8⁺ específicas del antígeno adoptivamente transferidas requeridas para la regresión del tumor. Además, se puede determinar si el mayor número de células T CD8⁺ conduce a una regresión más rápida de la carga tumoral.

Es posible que el rechazo del tumor B16 de baja dosis en ratones Cbl-b^{-/-} esté mediado por células T CD8⁺ que reconocen otro antígeno tumoral de alta afinidad diferente de gp100 que exhibe una baja afinidad con el TCR de Pmel-1. En ciertas realizaciones, la transferencia adoptiva de las células T CD8⁺ de Pmel-1 Cbl-b^{-/-} purificadas en ratones portadores del tumor B16 no pueden provocar una respuesta antitumoral fuerte. En este caso, ratones portadores del tumor B16 que reciben, ya sea células T CD8⁺ de Pmel-1 Cbl-b^{-/-} o de tipo silvestre pueden ser inmunizados con una vacuna que codifica una variante de gp100 en ausencia o presencia de una alta dosis de IL-2. Esta variante de gp100 proporciona un epítipo de mayor afinidad en el contexto de MHC H-2^b con el TCR de Pmel-1, proporcionando así una mejor oportunidad para activar células T de Pmel-1. Si la mutación Cbl-b^{-/-} entrega a las células T CD8⁺ una ventaja de la activación por las células tumorales sobre las células T de tipo silvestre, los ratones que reciben células T de Cbl-b^{-/-} pueden rechazar al tumor B16 en forma más eficientemente, incluso en ausencia de la administración de IL-2, que los ratones que recibieron las células de tipo silvestre.

En ciertos aspectos, la invención proporciona métodos para evaluar cuantitativamente la eficiencia de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} en la erradicación tanto de tumores antigénicos débiles como fuertes. La contribución a las respuestas antitumorales de las células T CD4⁺ de tipo silvestre y las células dendríticas de los ratones receptores, no puede ser excluida. Para evaluar el papel de las células T CD4⁺ y las células dendríticas en el rechazo tumoral mediado por células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, se pueden cotransferir diversas cantidades de células T CD4⁺ Cbl-b^{-/-} o de tipo silvestre con células T CD8⁺ Tg TCR de en ratones Rag2^{-/-}, portadores de tumores y se puede por lo tanto hacer seguimiento al crecimiento de los tumores. Para evaluar el papel de las células dendríticas, se pueden usar ratones con desactivación génica de células dendríticas condicionales (CD11c-DTR) como huéspedes portadores de tumores. Se pueden eliminar las células dendríticas en estos ratones mediante inyección de la toxina de la difteria (DT) justo antes de la transferencia adoptiva de células T CD8⁺. Si las células dendríticas de Cbl-b^{-/-} o CD4⁺ de Cbl-b^{-/-} contribuyen a la respuesta antitumoral, ciertas realizaciones de los métodos para provocar una respuesta inmune antitumoral pueden incluir células dendríticas en la transferencia adoptiva terapéutica.

Consecuencia autoinmune: La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} podría imponer una consecuencia autoinmune al huésped. Se puede reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune severa mediante la escogencia cuidadosa del antígeno objetivo, o mediante transferencia de células T monoclonales u oligoclonales que reconocen específicamente antígenos tumorales. Por ejemplo, las células T CD8⁺ de Pmel-1 reconocen al complejo péptido gap100-H-2D^b que también es expresado por los melanocitos normales de los huéspedes. La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} de ratones Pmel-1 puede dar como resultado la autoinmunidad contra melanocitos de huéspedes normales, conduciendo al vitiligo de los melanocitos en los ratones receptores, lo que es poco probable que sea peligroso para la vida. Para evaluar la consecuencia autoinmune de la transferencia adoptiva de las células T CD8⁺ de Pmel-1, se pueden determinar la correlación entre el grado de vitiligo y la eficiencia de la erradicación del tumor mediante el seguimiento simultáneo de la despigmentación de los ratones receptores y la regresión tumoral.

Los CTL de Cbl-b^{-/-} pueden erradicar tumores que previenen la respuesta de las células T a través de TGF-beta o la barrera del tumor

En ciertos aspectos, la invención establece que las células T CD8⁺ Cbl-b^{-/-} montan respuestas inmunes eficientes contra tumores que carecen de señales coestimuladoras. Ya que las células tumorales también pueden prevenir la respuesta inmunes a través de otros mecanismos, tal como la supresión por TGF-beta o la prevención de la infiltración de células T por barreras del tumor, se puede determinar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden superar estos mecanismos de regulación negativos en la vigilancia del tumor.

La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} puede erradicar tumores que producen un alto nivel de TGF-beta

TGF-beta es una citoquina potente que suprime las respuestas de las células T. Se ha reportado de que las células tumorales pueden escapar a la vigilancia inmunológica mediante la secreción de TGF-beta directamente o reclutando para el ambiente tumoral células inmunes que producen TGF-beta tal como las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺. Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión mediada por TGF-beta. Las células T de Cbl-b^{-/-} pueden erradicar tumores en presencia de un alto nivel de TGF-beta.

Para determinar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} montan una respuesta inmune contra los tumores en el ambiente de TGF-beta tal como el tumor que produce TGF-beta o la presencia de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺, se pueden

5 utilizar células TRAMP-C2 como modelo. TRAMP-C2 es una línea celular de cáncer de próstata de murino de pase temprano derivada de ratones TRAMP que espontáneamente desarrollan cáncer de próstata debido a la expresión del antígeno T grande del virus 40 de simio (SV) específico de la próstata. Las células TRAMP-C2 producen espontáneamente un título elevado de TGF-beta, tanto en un cultivo *in vitro* como en ratones trasplantados. Cuando se trasplantan en ratones C57BL/6 mediante inyección intravenosa, 21 días después del trasplante los ratones desarrollan cáncer metastásico pulmonar microscópico y macroscópico múltiple, lo que conduce eventualmente a la muerte. Las células TRAMP-C2 son resistentes a las células T CD8⁺ activadas específicas del tumor en un experimento de transferencia adoptiva; sin embargo, pueden ser eliminadas por células T CD8⁺ específicas del tumor que expresan una forma negativa dominante del receptor TGF-beta tipo II, lo que indica que las células T rechazan al tumor TRAMP-C2 cuando se altera la señalización de TGF-beta.

10 Para determinar si células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden responder a y erradicar el tumor que produce TGF-beta, se pueden generar células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas de TRAMP-C2. La transferencia adoptiva de estas células T CD8⁺ en ratones portadores de TRAMP-C2 puede determinar si estas células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas de TRAMP-C2 pueden controlar la metástasis del pulmón de cáncer TRAMP-C2. En resumen, para generar células T CD8⁺ específicas de TRAMP-C2, se pueden inmunizar ratones C57BL/6 de tipo silvestre, siendo ambos CD45.2⁺ con células TRAMP-C2 irradiadas (5 x 10⁶/ ratón) mediante inyección subcutánea cada 14 días para cinco inmunizaciones totales. Aproximadamente dos semanas después, se pueden purificar las células T CD8⁺ del bazo de ratones inmunizados y se estimulan con las APC, que son células esplénicas de ratón irradiadas, cargadas con lisados de TRAMP-C2 (1 x 10⁶ células/ml). Células pueden ser cultivadas en presencia de IL-2 (50 U/ml) y anticuerpo anti-CD3 (30 ng/ml), y se puede cambiar el medio de cultivo cada 3 días. Las células CD8⁺ pueden ser expandidas durante 10 días antes de otra ronda de estimulación. Los títulos de CD8⁺ específicos del antígeno en el cultivo final se pueden determinar por un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando células TRAMP-C2 como objetivo. Para evaluar si las células T CD8⁺ activadas específicas de TRAMP-C2 pueden erradicar las células las trasplantadas de TRAMP-C2, se pueden retar ratones SJL (CD45.1⁺) mediante administración intravenosa con 5 x 10⁵ células de TRAMP-C2. Aproximadamente veinte días después, se pueden transferir adoptivamente diversas cantidades (1-10 x 10⁵) de células T CD8⁺ de tipo silvestre o de Cbl-b^{-/-} específicas TRAMP-C2 en los ratones portadores de tumores. Cuarenta días después de la transferencia de células T CD8⁺, se pueden sacrificar los ratones y se pueden recolectar los pulmones de estos ratones para un examen histológico y macroscópico. La infiltración de células T CD8⁺ derivadas del donante (CD45.2⁺), así como células inmunes de otros receptores (CD45.1⁺), se pueden identificar mediante análisis inmunohistológico y cuantificar mediante citometría de flujo. La apoptosis de células tumorales se puede determinar por ejemplo mediante el ensayo TUNEL.

35 Se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ insensibles a TGF-beta impide la metástasis pulmonar del cáncer de TRAMP-C2. La prevención del crecimiento del tumor TRAMP-2C es el resultado de la activación de células T CD8⁺ insensible a TGF-beta que erradican células de TRAMP-C2 por apoptosis. Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta. En ciertos aspectos, la invención establece que la transferencia adoptiva de las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas de TRAMP-C2 pueden prevenir la metástasis del cáncer TRAMP-C2 en ratones portadores del tumor. El análisis de citometría de flujo e inmunohistológico puede revelar la infiltración masiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, así como la apoptosis de células de TRAMP-C2 en el pulmón. Por el contrario, la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de tipo silvestre no puede afectar el avance del tumor TRAMP-2C. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para determinar si las células T CD8⁺ transferidas de Cbl-b^{-/-}, proporcionan protección a largo plazo. La recurrencia del tumor TRAMP-2C puede ser controlada en ratones con regresión del tumor durante el resto de su vida.

45 Es posible que el esquema de inmunización para generar los CTL específicos de TRAMP-C2 puedan producir células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, con un amplio espectro de especificidad contra antígenos propios. Como consecuencia, la transferencia adoptiva de estas células T CD8⁺ pueden causar una grave enfermedad autoinmune. En ciertas realizaciones, se puede utilizar un protocolo modificado para generar células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} que reconocen solamente antígeno específico de TRAMP-C2, o antígeno T grande de SV40. Las células T CD8⁺ esplénicas de ratones Cbl-b^{-/-} inmunizados con TRAMP-C2 se estimulan y expanden *in vitro* con las APC cargadas con los péptidos T grande de SV40 o proteína, en vez de los lisados celulares de TRAMP-C2. Este enfoque puede generar una población de CTL CD8⁺ que reconoce al antígeno T grande de SV40 en el contexto de MHC H-2^b. Para garantizar que las células T CD8⁺ obtenidas sean específicas para las células de TRAMP-2C, se puede examinar la citotoxicidad *in vitro* de estas células contra TRAMP-2C y otras células objetivo H-2^b que no expresan antígeno T grande de SV40. La muerte específica de células de TRAMP-2C, pero no de las células de control sugiere que los CTL obtenidos son predominantemente específicas para el antígeno T grande de SV40 en el contexto de MHC H-2^b.

55 Si los tumores TRAMP-2C no son rechazados por las células T CD8⁺ transferidas de Cbl-b^{-/-}, existen dos posibles explicaciones que deben ser consideradas antes de la conclusión de que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} no pueden superar la supresión por TGF-beta derivado del tumor. En primer lugar, se puede determinar si el rechazo tumoral fallido es debido a que se utilizan cantidades insuficientes de células T CD8⁺ específicas del tumor en el experimento de transferencia. En ciertas realizaciones, se pueden transferir hasta 10 veces más (1-5 x 10⁷) células T CD8⁺ en los ratones portadores de tumores y luego se puede hacer seguimiento a la regresión tumoral. En trabajos previos que muestran que las células de TRAMP-2C son rechazadas por células T CD8⁺ insensibles a TGF-beta, las células T

CD8⁺ insensibles a TGF-beta utilizadas en el experimento son CTL específicos TRAMP-2C que sobreexpresan una forma negativa dominante del receptor TGF-beta II. Es posible que esta forma negativa dominante de receptor de TGF-beta II pueda ejercer otros efectos desconocidos sobre las células T CD8⁺ en además de la insensibilidad a TGF-beta. Para determinar que, este mutante del receptor de TGF-beta pueda ser sobreexpresado en células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas de TRAMP-2C, y estas células puedan ser examinadas para determinar si ellas pueden rechazar al tumor TRAMP-2C. El rechazo del tumor TRAMP-2C por estos transfectantes es indicativo de que otras alteraciones causadas por la expresión del receptor de TGF-beta, quizás junto con la insensibilidad de TGF-beta, son responsables por la prevención de la metástasis de TRAMP-2C.

Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden erradicar tumores protegidos por la barrera del tumor

Los modelos murinos han demostrado que los CTL específicos de antígeno tumoral, activados, abundantes, a menudo no logran erradicar grandes tumores sólidos, incluso cuando pueden rechazar de manera eficiente injerto de piel o tumores menos establecidos que expresan los mismos antígenos. Clínicamente, se ha documentado que la presencia de un alto número de células T CD8⁺ circulantes específicas de tumores no se correlaciona con la infiltración de células T en el parénquima de los tumores y la regresión del tumor. Los estudios indican que las barreras del tumor compuestas de estroma infiltrante del huésped pueden ser una de las razones que impide el cebado y expansión eficiente de células T tanto en los tejidos linfoides como en los sitios tumorales. La evidencia para apoyar esta idea se deriva del experimento en el que el reclutamiento de células T CD8⁺ en los tejidos tumorales por expresión forzada de LIGHT/ TNFSF-14, un miembro de la familia TNF que inducen expresión de quimoquinas tal como CCL21 en la barrera estromal, da como resultado el rechazo del tumor. En ciertos aspectos, la invención establece que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} rechazan los tumores E.G7 establecidos. En otros aspectos, la invención establece que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden rechazar los tumores que están protegidos por la barrera del tumor. Esto da una idea de los mecanismos por los cuales las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} montan respuestas antitumorales y muestra que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} se pueden usar para tratar grandes tumores establecidos.

El fibrosarcoma Ag104 que expresa H-2L^d murino (Ag104Ld) es altamente tumorigénico, con un 100% de excrecencia en ratones C3H xC57BL/6 F1 (C3B6F1) después de la inyección subcutánea de 10⁴ células. Los ratones portadores de tumores por lo general mueren en 3-4 semanas después de la inoculación. La transferencia de células T CD8⁺ Tg TCR 2C que reconocen H-2L^d no puede rechazar un tumor Ag104L^d debido a la falta de infiltración de células T a través de la barrera del tumor. Para determinar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} puede eludir la barrera del tumor Ag104Ld, los ratones Cbl-b^{-/-} pueden ser cruzados con los ratones Tg TCR 2C para generar ratones Tg TCR 2C Cbl-b^{-/-}. Las células T CD8⁺ pueden purificarse a partir ratones Tg TCR 2C Cbl-b^{-/-} y Tg TCR 2C de tipo silvestre, respectivamente, y estas células pueden ser transferidas a ratones portadores del tumor Ag104L^d mediante inyección intravenosa, y hacer seguimiento a la regresión del tumor. Los ratones portadores del tumor Ag104L^d con parénquima tumoral se puede obtener mediante inoculación subcutánea de 10⁴ células de Ag104L^d en ratones C3B6F1 una semana antes de la transferencia de células T. Para examinar directamente si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} puede infiltrarse y expandirse en el interior del tejido tumoral, se pueden marcar las células T CD8⁺ purificadas mediante CFSE, transferir las células marcadas a ratones portadores de tumores Ag104L^d mediante inyección intravenosa, y se sacrifican luego los ratones receptores en diferentes puntos de tiempo (12, 24, 48, y 72 horas más tarde) después de la transferencia. La infiltración de células T en los tejidos tumorales se puede cuantificar por histología y citometría de flujo. El estado de activación de las células infiltradas se puede determinar por citometría de flujo con base en la expresión de los marcadores de activación de la superficie de la célula, tales como CD44 y CD62L. Para determinar si el estado de activación de las células T se correlaciona con la eficiencia de la infiltración, se activarán las células T CD8⁺ purificadas *in vitro* mediante anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3 y se cultivaron durante 2-3 días en presencia de IL-2 (50 U/ml) antes de ser sometidas a marcación con CFSE y la transferencia. La apoptosis de las células Ag104L^d en tejido tumoral será determinada por un ensayo TUNEL. Para el control de la especificidad de la infiltración de células T CD8⁺, se puede examinar la infiltración de las células T CD8⁺ transferidas en otro tejido, incluyendo tejido de pulmón, riñón e hígado por análisis inmunohistológico.

Los tumores Ag104L^d están protegidos del sistema inmune por la barrera del tumor. Si la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ Tg TCR 2C de Cbl-b^{-/-} erradica el tumor Ag104L^d establecido, esto indica que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} puede eludir la barrera del tumor para provocar la respuesta antitumoral. En ciertas realizaciones, las células T CD8⁺ Tg TCR 2C de Cbl-b^{-/-} marcadas con CFSE se infiltran y expanden en el tejido tumoral, en donde las células T CD8⁺ están presentes en niveles mínimos y no se expanden en el pulmón, el riñón y el hígado, y las células T CD8⁺ Tg TCR 2C de tipo silvestre están excluidas del tejido tumoral. El análisis TUNEL puede revelar la apoptosis de células Ag104L^d en el tejido tumoral de los ratones que reciben las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, pero no en ratones que reciben células T CD8⁺ de tipo silvestre.

Es posible que células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} no puedan rechazar al tumor Ag104L^d establecido. Esto puede ser el resultado o bien del fracaso de penetrar la barrera del tumor o la incapacidad de reaccionar a la estimulación del tumor. La primera posibilidad puede ser verificada mediante la supervisión directa de la infiltración de células T CD8⁺ marcadas con CFSE en el tejido tumoral después de la transferencia. Para examinar la segunda posibilidad, se puede analizar el estado de activación y proliferación de células CD8⁺ que infiltran el tumor por citometría de flujo. Para evaluar si las células T CD8⁺ infiltrantes son funcionalmente competentes, se pueden aislar las células T CD8⁺

que infiltran el tumor mediante clasificación por FACS y después se analiza la citotoxicidad contra las células Ag104L^d mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

5 En realizaciones en las que las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} pueden penetrar la barrera del tumor, la invención proporciona métodos para determinar los mecanismos que permiten que las células T Cbl-b^{-/-} puedan eludir la barrera. Dado que la migración de las células T a través del parénquima del tumor está regulada por quimioquinas y moléculas de adhesión celular, se puede determinar si la mutación Cbl-b^{-/-} altera la quimiotaxis y adhesión de las células T CD8⁺.

La ablación de Cbl-b en los CTL que infiltran el tumor restaura su actividad asesina contra los tumores objetivo

10 La carga tumoral a menudo contiene un gran número de infiltrados de CTL. Estos CTL reconocen un amplio espectro de epítomos asociados a tumores. En condiciones normales, estos CTL infiltrantes existen en un estado anérgico funcional, ya que estos raramente dan como resultado la erradicación del tumor. La evidencia sugiere que la falta de señales de coestimulación de las célula tumorales atenúa o incluso anergiza la función efectora de los CTL. Las células T de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la inducción de anergia. La ablación de la actividad de Cbl-b en los CTL que infiltran el tumor puede convertir las células deficientes en Cbl-b en células T "súper asesinas" que responden a un repertorio de diversos antígenos asociados a tumores en forma independiente de las señales coestimuladoras. En ciertas realizaciones, la actividad de Cbl-b se reduce o elimina por la ablación de la expresión de Cbl-b en los CTL que infiltran el tumor. En ciertas realizaciones, la expresión de Cbl-b se reduce mediante el uso de ARN pequeño de interferencia (ARNpi). En otras realizaciones, se reduce la expresión de Cbl-b mediante el uso de una variante de Cbl-b negativa dominante, por la administración de un agente que inhibe la actividad de Cbl-b, o por supresión de Cbl-b en su locus genómico. Las células con ablación de Cbl-b se liberan de su estado de anergia, y son sensibles a los tumores, y a antígenos tumorales.

25 La transferencia adoptiva de los CTL que infiltran el tumor que expresan ARN pi de Cbl-b puede dar lugar a la erradicación de los tumores establecidos. Los CTL que infiltran el tumor son adecuados para uso en los métodos de transferencia adoptiva porque estas células se enriquecen por las células T CD8⁺ específicas del tumor, limitando así el riesgo de una respuesta autoinmune que pueda asociarse con la transferencia de células T con un repertorio diverso de TCR. En ciertos aspectos, la invención proporciona métodos para modificar por ingeniería genética los CTL "súper asesinos" para la terapia tumoral clínica.

La ablación de Cbl-b en los CTL que infiltran el tumor por ARNpi suprime su estado de anergia para la estimulación del antígeno

30 El enfoque de ARNpi se ha utilizado con éxito para la desactivación o el silenciamiento completo de la expresión de genes activamente transcritos en linfocitos primarios en ratones (68; WO2004/099388).

35 En ciertas realizaciones, la expresión de Cbl-b en los CTL se puede desactivar utilizando el enfoque de ARNpi. Se sintetizaron cuatro oligonucleótidos de ARNpi, incluyendo el ARN inhibidor de la SEQ ID NO: 1 (5'-CAGGAGTATGAGACAGAAG-3'), y se clonaron respectivamente en un vector retroviral que contiene un gen CD2 humano (hCD2) como reportero. En este vector, la expresión de ARNpi es conducida por un promotor de ARN polimerasa III (H1) (69). Para evaluar la eficiencia del bloqueo de la expresión de Cbl-b mediante diferentes ARNpi, se cotransfectaron 10 µg del vector de ADN de expresión de ARNpi que contiene diferentes oligonucleótidos de ARNpi de Cbl-b y 1 µg del ADN del vector que expresa Cbl-b en células 293T por precipitación con Ca⁺⁺. Cuarenta y ocho horas más tarde, se determinaron los niveles de expresión de Cbl-b en cada una de las muestras de células transfectadas mediante un análisis de transferencias tipo Western. La expresión de un oligonucleótido de ARNpi, denominado como ARNpi 1, dio lugar a más de un 95% de inhibición de la expresión de Cbl-b. Este resultado demostró por lo tanto que la expresión de Cbl-b puede ser sometida a ablación mediante el enfoque de ARNpi.

45 Los vectores que expresan ARNpi dirigidos a Cbl-b pueden ser introducidos y expresados en los CTL específicos del tumor por transferencia génica mediada por retrovirus. Una etapa en este proceso es infectar *in vitro* los CTL cultivados con una alta eficiencia. En ciertas formas de realización, se pueden generar un gran número de células T infectadas por virus *in vitro* por estimulación de las células T primarias con anticuerpos anti-CD3 unidos a la placa (5 µg/ml) y anti-CD28 solubles (5 µg/ml) en presencia de IL-2 (50 U/ml) durante 48 horas. Las células activadas pueden ser infectadas con un vector retroviral de ARNpi basado en hCD2. Las células infectadas por virus pueden ser cultivadas durante 5-10 días adicionales en presencia de IL-2. La eficacia de la infección viral se determina por FACS con base en la expresión de hCD2 de la superficie celular. El método produce típicamente 30-50% de células T infectadas por virus (hCD2⁺), en donde se pueden introducir ARNpi en los CTL cultivados para reducir la expresión de un gen objetivo, tal como Cbl-b.

50 La ablación de Cbl-b en los CTL que infiltran el tumor mejora su capacidad de respuesta a la estimulación con antígeno tumoral

5 Se ha demostrado que tanto los tejidos tumorales E.G7 como B16 contienen cantidades sustanciales de CTL que infiltran el tumor. Estos CTL están en un estado de anergia porque son incapaces de rechazar los tumores. Para determinar si la ablación de Cbl-b puede volver a estos CTL que infiltran el tumor sensibles a la estimulación con antígeno tumoral, se pueden aislar los CTL de la carga tumoral de E.G7 o B16 (17, 30). Los ratones Tg OT1 o Pmel-1 pueden ser inoculados en forma subcutánea con tumores E.G7 o B16 ($1-3 \times 10^6$ /ratón), respectivamente. Los ratones Tg OT1 y Pmel-1 son adecuados porque pueden tener abundantes células T CD8⁺ específicas del tumor. El tejido tumoral (cuando los tumores alcanzan el tamaño de ~5-10 mm de diámetro) se puede extirpar quirúrgicamente y cortar en trozos pequeños (2-3 mm de diámetro) y tratar con colagenasa a 37°C. Las células muertas se pueden remover mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los CTL que infiltran el tumor se pueden aislar mediante el protocolo de enriquecimiento MACS usando anticuerpos contra las células T de OT1 (Vβ8⁺) o Pmel-1 (Vβ13⁺). Para la ablación de Cbl-b en los CTL, se pueden activar *in vitro* las células T purificadas por coestimulación con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 (30 U/ml). Cuarenta y ocho horas después, se pueden infectar las células T activadas con vector retroviral que expresa ARNpi de Cbl-b como se describe en la presente memoria. Las células infectadas por virus pueden ser cultivadas durante otros 5-10 días en presencia de IL-2. La eficiencia de la infección por virus se puede determinar mediante análisis FACS. Para determinar la eficiencia de la ablación de Cbl-b por el ARNpi en los CTL, se pueden purificar los CTL infectados con ARNpi de Cbl-b (hCD2⁺) por MACS después de la tinción de las células con anticuerpo anti-CD2 humano. Los niveles de proteína Cbl-b en las células hCD2⁺ se pueden comparar con aquellas en las células de tipo silvestre (hCD2⁻) por análisis de transferencia tipo Western.

20 Para determinar si los CTL que expresan ARNpi de Cbl-b se asemejan funcionalmente a las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, se pueden estimular los CTL infectados con retrovirus (hCD2⁺) y no infectados (hCD2⁻) con diferentes dosis de anticuerpo anti-CD3 unido a la placa o una combinación de anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3 tal como se describe en la presente memoria. Las tasas de proliferación celular se pueden determinar mediante el análisis de las células marcadas con CFSE o el ensayo de incorporación de ³H-timidina. Los niveles de citoquinas tales como IL-2 e IFN-γ producidas por los CTL activados se pueden determinar mediante un ELISA o mediante tinción intracelular seguida por análisis FACS. La resistencia de las células T hCD2⁺ a la supresión de TGF-beta se puede examinar como se describe en la presente memoria. Para determinar cuantitativamente si la ablación de ARNpi de Cbl-b mejora la actividad asesina de los CTL, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, utilizando células E.G7 y B16 correspondientemente marcadas con ⁵¹Cr como los objetivos (71).

30 Se espera que los CTL infectados con retrovirus de ARNpi de Cbl-b (hCD2⁺) exhiban una expresión reducida de Cbl-b. Las células T CD8⁺ que expresan ARNpi de Cbl-b proliferen con más fuerza y produzcan mayores niveles de IL-2 e IFN-gamma después la estimulación con anti-CD3 de lo que lo hacen los CTL de tipo silvestre (hCD2⁻) o infectados con el vector retroviral vacío, ya que la ablación de Cbl-b abolirá el requisito de la coestimulación y bajará el umbral de señalización de TCR para la activación. Adicionalmente, la proliferación y la producción de IFN-gamma por las células T CD8⁺ que expresan ARNpi de Cbl-b también deben mejorarse significativamente. Un examen adicional puede incluir si estos CTL con ablación de Cbl-b pueden erradicar eficientemente los tumores establecidos.

40 Este enfoque se basa en la desactivación eficiente del Cbl-b endógeno en los CTL específicos del tumor. Un oligonucleótido de ARNpi de Cbl-b de la SEQ ID NO: 1 permite más de 95% de inhibición de las proteínas Cbl-b en células 293T. La expresión de este ARNpi en los CTL debe realizar la ablación de manera eficiente del Cbl-b endógeno. Si la eficiencia de la ablación de Cbl-b es de menos del 30-39%, 40-49%, 50-60% de inhibición, en los CTL por este ARNpi, se pueden diseñar y analizar oligonucleótidos adicionales de ARNpi para identificar los ARNpi que silenciarían la expresión del gen de Cbl-b de manera más eficiente en las células T. Actualmente, las estadísticas muestran que en los sistemas de mamíferos aproximadamente 25% de las secuencias objetivo seleccionadas de ARNpi son funcionales (72). Por lo tanto, pueden ser identificadas una o más secuencias de ARNpi que pueden desactivar eficientemente la expresión de Cbl-b (más del 90%) cuando se ponen a prueba más secuencias de ARNpi. Los ensayos funcionales, que incluyen, pero no se limitan a la proliferación independiente de CD28, la producción de IL-2 e IFN-γ, y la supresión insensible de TGF-beta, se pueden utilizar como marcadores para evaluar si las células T CD8⁺ que expresa un ARNpi particular puede imitar funcionalmente los CTL de Cbl-b^{-/-}. Ya que el enfoque de ARNpi ha sido utilizado para desactivar la expresión de muchos genes en las células T y en ratones, la ablación de la expresión de Cbl-b en los CTL se puede lograr por este enfoque.

55 Un enfoque alternativo que se puede utilizar para reducir la función de Cbl-b, es la expresión de una forma dominante negativa de Cbl-b en las células T CD8⁺ por transducción retroviral. Pueden hacerse y probarse una cantidad de diferentes variantes de la proteína Cbl-b, incluyendo mutaciones en el enlazamiento de tirosina, el dedo RING (RF) y el dominio rico en prolina, y varios residuos de tirosina del terminal C, para determinar si estas variantes de la proteína crean mutaciones que bloquean la función de Cbl-b en las células T. Pueden hacerse y probarse otras variantes de la proteína Cbl-b para identificar otros mutantes negativos dominantes de Cbl-b. Tales mutantes negativos dominantes de Cbl-b se pueden utilizar para realizar la ablación de la función de Cbl-b.

La transferencia adoptiva de los CTL que infiltran el tumor que expresan ARNpi de Cbl-b erradica el tumor establecido.

Las células T de Cbl-b^{-/-} puede provocar una respuesta inmune antitumoral eficiente. Debido a que los infiltrados tumorales aislados de tejido tumoral se enriquecen para los CTL que tienen un amplio espectro de especificidad contra antígenos tumorales, la inactivación de Cbl-b en estos CTL por el ARNpi de Cbl-b proporciona un enfoque adecuado para generar CTL *in vitro* específicos del tumor de Cbl-b. En ciertas realizaciones, la invención establece que la transferencia adoptiva de los CTL que infiltran el tumor con ablación de Cbl-b da como resultado la erradicación de los tumores establecidos. Un método de transferencia adoptiva de los CTL que infiltran el tumor con ablación de Cbl-b puede ser utilizado como una herramienta terapéutica para tratar cánceres en seres humanos.

En ejemplos no limitantes, los CTL que infiltran el tumor pueden aislarse o bien de ratones Tg OT1 o Pmel-1 de acuerdo con los protocolos publicados (17, 30), y se puede hacer ablación de Cbl-b en estas células por ARNpi utilizando un vector retroviral como se describe en la presente memoria. Los ratones Tg TCR son los elegidos porque tienen una alta frecuencia de células T CD8⁺ específicas del tumor. Para determinar si los CTL específicos del tumor con ablación de Cbl-b pueden erradicar los tumores establecidos, se pueden transferir 1-10x10⁶ de los CTL que expresan ARNpi de Cbl-b aislado ya sea de ratones Tg OT1 o Pmel-1, respectivamente, en ratones C57BL/6 que portan los correspondientes tumores establecidos, y luego hacer seguimiento a los tamaños de los tumores. Para determinar si los CTL transferidos se puede expandir *in vivo*, se puede examinar la proliferación de las células transferidas mediante el ensayo de marcación con CSFE. La infiltración de los CTL en el tejido tumoral puede determinarse mediante un ensayo inmunohistológico.

En los ratones no transgénicos, los infiltrados tumorales pueden ser enriquecidos por los CTL específicos del tumor. Los CTL de esta carga tumoral deben parecerse mucho a aquellos de los tejidos de cáncer humano. Para determinar si los CTL aislados a partir de tejidos tumorales de ratones portadores de tumores de tipo silvestre pueden ser convertidos en los CTL "súper asesinos" contra los tumores correspondientes, se pueden aislar los CTL a partir de tejidos tumorales de ratones C57BL/6 portadores de tumores E.G7 o B16 por digestión con colagenasa, y clasificación por FACS. En ciertas realizaciones, estas células pueden expandirse *in vitro* en presencia de IL-2 (50 U/ml), anticuerpo anti-CD3 soluble y APC (células esplénicas irradiadas) cargadas con lisado de E.G7 o B16 (10⁶ células/ml). Los medios pueden ser cambiados cada 10 días. Se ha demostrado que este protocolo produce un alto número de CTL específicos antitumorales (Ramarathinam y colaboradores, 1994). Para la ablación de Cbl-b en estos CTL, por ejemplo por ARNpi, estos CTL pueden ser infectados con retrovirales que expresan ARNpi de Cbl-b. Las células infectadas con virus se pueden purificar por MACS después de la tinción de las células con anti-hCD2. Para probar si estas células pueden rechazar al tumor establecido, se puede transferir los CTL con ablación de Cbl-b (1-10 x 10⁶ células/ratón) en ratones C57BL/6 que portan los correspondientes tumores. Se puede hacer seguimiento al tamaño y la regresión de los tumores establecidos como se describe en la presente memoria.

Para determinar si la regresión del tumor tiene memoria duradera, se puede hacer seguimiento a la recurrencia del tumor durante al menos 1,5 años en los ratones en los que el tumor retrocedió. Para determinar si los CTL transferidos se convierten en células T de memoria, se pueden volver a inocular varias dosis de las mismas células tumorales en ratones con regresión del tumor en diferentes puntos de tiempo después de la regresión del tumor, y luego hacer seguimiento al crecimiento del tumor en el ratón de tipo silvestre. Los ratones de tipo silvestre pueden ser inoculados con el mismo tumor como controles. Para determinar la frecuencia de los CTL con memoria específica del tumor en los ratones con regresión tumoral, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando células E.G7 y Pmel-1 como objetivos, respectivamente.

Diversas líneas de evidencia sugieren que los tumores clínicos pueden impedir la vigilancia inmune a través de TGF-beta y de la barrera del tumor. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para determinar si las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} específicas del tumor TRAMP-2C y Ag104Ld pueden sortear estos efectos negativos y montar una respuesta antitumoral eficiente. Clínicamente, las células T de Cbl-b^{-/-} se pueden obtener mediante la manipulación de células T CD8⁺ maduras. Por lo tanto, se puede determinar si se puede utilizar los CTL que expresan ARNpi de Cbl-b para erradicar tumores TRAMP-2C y Ag104Ld en ratones. Se pueden obtener células T CD8⁺ de tipo silvestre reactivas con TRAMP-2C de ratones de tipo silvestre mediante una inmunización repetitiva y un enfoque de estimulación *in vitro* como se describe en la presente memoria. Se pueden obtener células T CD8⁺ reactivas con el tumor Ag104Ld a partir de ratones portadores de tumores Ag104Ld de acuerdo con protocolos previamente publicados. En este protocolo, se pueden generar ratones portadores de tumores Ag104Ld mediante inyección subcutánea inyección de 10⁶ Ag104Ld en ratones C57BL/6. Dos semanas después, se puede inyectar LIHGT soluble (Yu P. y colaboradores, 2004) en el tumor Ag104Ld. Este tratamiento ha demostrado que induce infiltración masiva y expansión de células T CD8⁺ específicas Ag104Ld en el sitio del tumor, que pueden ser purificadas por citometría de flujo y expandidas *in vitro* por estimulación repetitiva y cultivo de IL-2. Cuando se obtienen células T CD8⁺ reactivas con el tumor TRAMP-2C y Ag104Ld, se puede desactivar la actividad de Cbl-b, por ejemplo, pero sin limitarse, por infección con el vector retroviral de ARNpi de Cbl-b. La capacidad y la eficiencia de estas células para rechazar al tumor que produce TGF-beta o para penetrar la barrera del tumor, se puede determinar de acuerdo con el diseño experimental y los métodos descritos en la presente memoria.

Diferentes CTL que expresan ARNpi de Cbl-b pueden presentar diferentes grados de actividades antitumorales. Como consecuencia, los CTL específicos del tumor que expresan diferentes ARNpi de Cbl-b pueden erradicar tumores con diferente eficiencia. Esto puede indicar que se puede aplicar el mismo enfoque a la terapia de cáncer

humano, usando ARNpi de Cbl-b que puede realizar la ablación de la expresión de Cbl b en las células T humanas. Ya que los CTL de Cbl-b^{-/-} son resistentes a la supresión de TGF-beta y la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} rechaza al tumor E.G7 establecido, la ablación de Cbl-b por ARNpi en los CTL que infiltran al tumor de tipo silvestre pueden volver a estas células CTL desactivadas en Cbl-b capaces de erradicar al tumor TRAMP-2C y Ag104L^d. Esto también puede determinar el perfil de los tumores que pueden ser tratados por los CTL con ablación de Cbl-b.

Si la expresión de un ARNpi particular en los CTL suprime la dependencia de CD28 para la activación de células T, sin embargo falla en mejorar la erradicación del tumor, esto puede sugerir que la frecuencia de los CTL específicos del tumor en las células adoptivamente transferidas es importante para una erradicación eficiente del tumor. Las frecuencias de los CTL específicos del tumor en células que infiltran al tumor de ratones de tipo silvestre, pueden ser determinadas mediante un ensayo de dilución limitante usando células tumorales marcadas con ⁵¹Cr como el objetivo (71). Si los CTL específicos del tumor en las células T transferidos que infiltran al tumor de ratones de tipo silvestre son realmente más bajos en comparación con aquellos de los ratones Tg TCR, se puede probar si la transferencia adoptiva de las cantidades mayores de CTL de ratones de tipo silvestre dan como resultado un rechazo tumoral más eficiente. Si la transferencia adoptiva de los CTL que expresan ARNpi de Cbl-b derivado de ratón Tg TCR también falla para erradicar los tumores establecidos, esto puede sugerir que este ARNpi particular también puede desactivar la expresión de otra(s) molécula(s), además de Cbl-b, que son críticas para CTL para ejecutar la función antitumoral. Se puede usar una secuencia diferente de ARNpi de Cbl-b para desactivar la expresión de Cbl-b, ya que es estadísticamente improbable que dos secuencias diferentes ARNpi supriman en forma cruzada la expresión del mismo conjunto de moléculas.

La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ con ablación-Cbl-b de infiltrados tumorales de ratones de tipo silvestre puede provocar enfermedad autoinmune si estas células T CD8⁺ expresan un repertorio diverso de TCR. Este problema puede ser superado mediante la expansión selectiva de CTL específico del tumor *in vitro* a través de la estimulación repetitiva de los CTL específicos del tumor con un antígeno o antígenos específicos del tumor tales como gp100 que son compartidos por el tumor y las células menos importantes.

La identificación de una forma(s) negativa(s) dominante(s) de Cbl-b utilizando un enfoque de mutagénesis puede proporcionar un enfoque alternativo para inhibir la función de Cbl-b en los CTL.

En ciertos aspectos, se pueden analizar la función de ubiquitina ligasa de Cbl-b en la activación de células T que depende de CD28 y el rechazo del tumor. La señal coestimuladora de CD28 está ligada a las rutas de señalización de PI-3 quinasa y Vav (55, 56, 73). Tanto p85 de la PI-3 quinasa y Vav son sometidas a ubiquitinación por Cbl-b, lo que sugiere que Cbl-b regula la señal coestimuladora de CD28 a través de la promoción de la ubiquitinación de p85 y Vav (73, 74). Dado que la función de ubiquitina ligasa de Cbl-b depende de su dominio de RF (75), es probable que la interrupción de este dominio puede dar como resultado la pérdida de la dependencia de CD28 y la sensibilidad hacia la supresión de TGF-beta, y torna la capacidad de respuesta de las células T contra los tumores en ausencia de la coestimulación. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para determinar si la expresión de un Cbl-b mutante del dominio de RF en células T permite la activación de las células T en forma independiente de la coestimulación de CD28 y la supresión de TGF-beta. Ciertas realizaciones también proporcionan métodos para determinar si los CTL que expresan un Cbl-b mutante del dominio de RF pueden montar respuestas inmunes contra diversos tumores como lo hacen los CTL de Cbl-b^{-/-}. Los resultados de este análisis pueden proporcionar información para diseñar y seleccionar un fármaco de un compuesto pequeño que pueda beneficiar la inmunoterapia tumoral. Ya que la introducción la mutación de Cbl-b^{-/-} en ratones con ATM^{-/-} disminuye marcadamente la incidencia de tumores espontáneos, y los ratones Cbl-b^{-/-} no desarrollan una enfermedad autoinmune espontánea, es probable que una supresión sistémica de la función de Cbl-b usando tal compuesto pueda beneficiar la prevención del tumor.

Determinación de si la actividad de ubiquitina ligasa de Cbl-b es requerida para la activación de células T que dependen de CD28

La actividad de ubiquitina ligasa de Cbl-b depende de la asociación de su dominio RF con una enzima de conjugación de ubiquitina-E2. Para inactivar la función de ubiquitinación de Cbl-b, se pueden generar formas mutantes de Cbl-b en donde los mutantes, o bien se suprime el dominio de RF completo, o se sustituyen los residuos clave en el dominio de RF ya sea solos o en combinación para garantizar la eliminación de la actividad de ubiquitina ligasa. Dado que la mayor parte de la información disponible sobre la estructura y la función de la ligasa de las proteínas Cbl provienen de la c-Cbl humana, esta información puede servir como guía para la mutagénesis de Cbl-b de murino. Una Cbl-b mutante puede ser creada para que tenga suprimido el dominio completo de RF, desde el aminoácido 273 hasta el aminoácido 312 de Cbl-b de murino (50). Este Cbl-b mutante será clonado en un vector retroviral bi-cistrónico (70), su función de ubiquitinación y la asociación con las moléculas conocidos que se enlazan con Cbl-b se pondrán a prueba en las células T cultivadas. Si esta mutación afecta la asociación normal de Cbl-b con otras moléculas de señalización, se pueden generar mutaciones puntuales, tales como Cbl-b (C376A), Cbl-b (W400A) y Cbl-b (C376A, W400A) mediante mutagénesis asistida por PCR. c-Cbl y Cbl-b comparten 98% de homología de secuencia en sus dominios de RF. Cbl-b (C376A) contiene una mutación que reemplaza un residuo

clave que se enlaza al zinc (cisteína 376) con una alanina. La mutación equivalente en c-Cbl humana interrumpe la formación de bucles de quelación de zinc que acomodan al contacto más significativo con UbC_{H7} (75). Para la mutación de Cbl-b (W400A) (triptófano 400 por alanina), la mutación equivalente en c-Cbl humana mantiene la capacidad de enlazamiento con el zinc pero interactúa pobremente con las enzimas que se conjugan con la ubiquitina E2 (76). Para el mutante (Cbl-b (C376A) y (W400A)), se ha demostrado que un equivalente de c-Cbl humana elimina completamente su actividad de ubiquitina ligasa tanto *in vitro* como *in vivo* (77). También se puede añadir una etiqueta FLAG a los terminales C de estos mutantes para permitir una detección específica. El ADNc mutante puede ser clonado en un vector retroviral bicistrónico y su función y asociación de ubiquitinación con componentes de señalización conocidos, tales como Zap70, Vav, y p85 (78), pueden ser probados primero en células T cultivadas de Cbl-b^{-/-}. Utilizando este enfoque retroviral, se pueden infectar células T primarias activadas *in vitro* con más de 30 - 50% de eficiencia.

El impacto de cualquiera de estos mutantes de Cbl-b con Ub inhabilitada en la señalización co-estimuladora de CD28 y la respuesta de las células T a la supresión de TGF-beta puede ser determinado como se describe en la presente memoria. Para excluir la posible interferencia de la Cbl-b endógena de tipo silvestre, se puede introducir al mutante de Cbl-b con Ub inhabilitada en las células madre de médula ósea (BM) de Cbl-b^{-/-}, donde las células madre infectadas pueden ser transferidas en ratones RAG2^{-/-}, y se puede analizar la activación de células T inducidas por TCR, la producción de IL-2, y la supresión de TGF-beta, en presencia o en ausencia de coestimulación de CD28, usando células T aisladas de estas quimeras. Se puede introducir Cbl-b con Ub inhabilitada en células madre c-Cbl Cbl-b dko BM por transducción retroviral usando un vector retroviral bicistrónico basado en hCD2 (o GFP). Se puede usar un vector viral que expresa al transgén de Cbl-b de tipo silvestre como control. Ciertas realizaciones utilizan quimeras de BM infectadas con retrovirus para demostrar la función de c-Cbl en el desarrollo de timocitos. Los resultados mostrados en la Figura 14 demuestran la factibilidad de usar tal sistema para expresar un transgén en células madre hematopoyéticas.

Después de la infección viral, se pueden introducir las células madre transducidas del retrovirus en ratones receptores Rag2 mediante inyección intravenosa para generar quimeras BM. De seis a ocho semanas después, se puede analizar el desarrollo de las células T que expresan la transgén (hCD2⁺ o GFP⁺) en los ratones receptores por FACS, utilizando anticuerpos contra CD4, CD8, y CD3. Ya que los ratones receptores son deficiente en Rag2, las células T generadas en estas quimeras BM deben derivarse exclusivamente de las células madre del donante.

Para investigar si Cbl-b con Ub inhabilitada afecta la coestimulación CD28 y la supresión de TGF-beta, se puede determinar la proliferación de células T CD8⁺ inducida por TCR en presencia o en ausencia de diferentes dosis de TGF-beta, y citoquinas (IL-2 e IFN-γ) mediante la incorporación de 3H-timidina y ELISA, respectivamente. Se pueden purificar CD8⁺ de Cbl-b^{-/-} (hCD2⁺ o GFP⁺) y con Ub inhabilitada (hCD2⁻ o GFP⁻) a partir de las quimeras de BM por FACS o clasificación por MACS con base en la expresión de GFP o hCD2.

Una proteína Cbl-b con Ub inhabilitada puede ser sobreexpresa en células T CD8⁺ de tipo silvestre como un supresor negativo dominante para la función de Cbl-b endógena. Esto puede hacerse mediante la introducción y expresión de una molécula de Cbl-b con Ub inhabilitada en células T CD8⁺ de ratones C57BL/6 por infección retroviral de acuerdo con el método descrito en la presente memoria. Las células infectadas por virus pueden ser purificar por MACS. Para determinar si las células T CD8⁺ que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada imitan funcionalmente a las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}, se pueden determinar las tasas de proliferación y la producción de IL-2 e IFN-γ, así como la resistencia a la supresión de TGF-beta después de la estimulación de TCR y CD28. Estas realizaciones pueden demostrar si se puede utilizar Cbl-b con Ub inutilizado como una proteína de forma negativa dominante para permitir la ablación de la función de Cbl-b endógena a las células T.

Se espera que la expresión de una Cbl-b de tipo silvestre en células T de Cbl-b^{-/-} restablezca completamente la dependencia de las células T en la coestimulación de CD28 para la activación y sensibilidad de TGF-beta. Si la función de ubiquitinación de Cbl-b es responsable por la dependencia de las células T en la coestimulación CD28 y la sensibilidad TGF-beta, las células T CD8⁺ que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada debe proliferar y secretar IL-2 e IFN-γ tan eficientemente como lo hacen las células T de Cbl-b^{-/-}. Adicionalmente, la proliferación de células T CD8⁺ inducidas por anti-CD3 no será bloqueada por TGF-beta. La restauración completa de la dependencia de las células T en la señal de CD28 para la activación o la sensibilidad de TGF-beta por la expresión de Cbl-b con Ub inhabilitada sugiere que los otros dominios de Cbl-b y las correspondientes proteínas asociadas son responsables de estos fenotipos de células T de Cbl-b^{-/-}. La mutagénesis de otras posiciones puede identificar estos dominios y moléculas.

Para determinar el impacto de la Cbl-b con Ub inhabilitada en la señalización de TCR, el estado de ubiquitinación de Cbl-b reguló los objetivos de señalización, por ejemplo, pero sin limitarse a, Vav y p85 PI 3-quinasa, pueden estar en el mutante de Cbl-b con Ub inhabilitada frente a las células T de tipo silvestre ya que las rutas de señalización que involucran Vav y p85 PI-3-quinasa están alteradas en las células T de Cbl-b^{-/-} (55, 56, 73). Si la activación, o fosforilación de una de estas proteínas de señalización en las células que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada es similar a aquella en las células de tipo silvestre, esto puede sugerir que la actividad de la ubiquitina ligasa de Cbl-b es prescindible para la activación de esta molécula. Por el contrario, si se requiere la función de ubiquitinación de Cbl-b para la activación de un componente particular de señalización, se puede esperar que el estado de

fosforilación de este componente en las células que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada será similar a la encontrada en células T Cbl-b^{-/-}. En este caso, se puede determinar si esta molécula particular de señalización, puede experimentar ubiquitinación células T de tipo silvestre y en células T de Cbl-b^{-/-}. La cinética de degradación de esta molécula puede ser determinada por hibridación de transferencia tipo Western.

5 Una posible complicación de esta serie de experimentos es que la Cbl-b con Ub inhabilitada complementa parcialmente los fenotipos de Cbl-b^{-/-}. Esto puede sugerir que, o bien el nivel de expresión del transgén es demasiado bajo para compensar completamente la función de Cbl-b o que mecanismos distintos a los de la ubiquitinación también están involucrados en la regulación. Para excluir la anterior posibilidad, se puede analizar la señalización coestimuladora en las células T de ratones mutantes con activación de Cbl-b con Ub inhabilitada. Tal modelo de ratón puede ser generado en donde en ciertas realizaciones, la expresión de la proteína Cbl-b con Ub inhabilitada es conducida por un promotor/ reforzador de Cbl-b endógeno en el locus endógeno. La expresión de la proteína Cbl-b con Ub inhabilitada es conducida por una secuencia de ADN promotora/reforzadora de Cbl-b endógeno localizada en una posición diferente del locus endógeno. Si las células T de estos ratones muestran una restauración parcial de la señalización de Cbl-b, esto puede sugerir que se Cbl-b puede utilizar otros mecanismos que regulan estas señales. Un análisis adicional de la mutagénesis de las proteínas Cbl puede ayudar a resolver este problema.

La inactivación de la actividad de ubiquitina ligasa de Cbl-b o la sobreexpresión de una Cbl-b con Ub inhabilitada en células T CD8⁺ aumenta el rechazo del tumor.

20 El papel de la función de la ubiquitinación de Cbl-b en el rechazo del tumor se puede estudiar utilizando células T transgénicas que expresan variantes de la proteína Cbl-b con Ub inhabilitada, en vez de o además de Cbl-b de tipo silvestre. Las células T que expresan únicamente variantes de proteína Cbl-b con Ub inhabilitada pueden imitar la situación en la que la función de la ubiquitina ligasa de Cbl-b endógena está bloquea por un agente, por ejemplo, pero sin limitarse a un fármaco de molécula pequeña. La variante de la proteína Cbl-b con Ub inhabilitada puede ser expresada en los CTL de tipo silvestre mediante un enfoque retroviral. En este caso, la Cbl-b mutante con Ub inhabilitada puede ser usada como una forma negativa dominante para suprimir la función de Cbl-b endógeno en células T. Estas células pueden rechazar potencialmente tumores como Las células T CD8⁺ de Cbl-b^{-/-}.

30 Para determinar si las células T CD8⁺ con rechazan tumores, se pueden generar ratones Tg TCR OT1 Cbl-b^{-/-} y Pmel-1. Para obtener células T CD8⁺ sin modificar que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada se puede introducir ácido nucleico que codifica variantes de proteína Cbl-b con Ub inhabilitada en células madre BM de estos ratones y generan una quimera BM como se describe en la presente memoria. Para obtener células T CD8⁺ efectoras con Ub inhabilitada, pueden estimular en forma repetitiva células T CD8⁺ sin modificar con Ub inhabilitada con CD3 y CD28, y se expanden en presencia de IL-2. Las células T efectoras o sin modificar que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada pueden ser aisladas de las quimeras de BM anteriores o de las células cultivadas *in vitro* por MACS o FACS utilizando hCD2 o GFP como marcadores de superficie celular. Una vez que se generan células t efectoras o sin modificar que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada específicas del tumor (Tg TCR OT1 o Pmel-1), estas células pueden ser transferidas (1-10x10⁶ células/ratón) en los correspondientes ratones C57BL/6 portadores de tumores por inyección intravenosa. Se pueden utilizar como controles células T CD8⁺ Tg TCR de OT1 o Pmel-1 Cbl-b^{-/-} de tipo silvestre purificadas. Se puede hacer seguimiento a la regresión de los tumores como se describe en la presente memoria. Si la células T CD8⁺ con Ub inhabilitada adoptivamente transferidas pueden generar protección y memoria inmune a largo plazo contra el tumor, también puede ser evaluado. Si las células T que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada pueden también erradicar tumores en presencia de TGF-beta o de una barrera de tumor pueden ser evaluadas mediante el uso de un modelo de tumor TRAMP-2C y Ag104L^d.

45 Si la función de la ubiquitina ligasa de Cbl-b es responsable por la inhibición de la respuesta de las células T contra los tumores en ratones normales, se espera que las células T que expresan Cbl-b con Ub inhabilitada puedan prevenir el crecimiento de los tumores inoculados en forma similar a las células T de a Cbl-b^{-/-}. Esto puede sugerir que la inhibición *in vivo* de la actividad de la ubiquitina ligasa de Cbl-b en células T es suficiente para provocar una respuesta inmune antitumoral contra los tumores. Los agentes que identifican tales compuestos químicos que pueden antagonizar la actividad de la ubiquitina ligasa de Cbl-b y examinan si el tratamiento de ratones con estos agentes mejora las respuestas inmunes antitumorales.

50 Un bloque sistémico de la función ubiquitina ligasa de Cbl-b puede tener un efecto adverso tal como el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, los ratones Cbl-b^{-/-}, no exhiben ninguna anomalía importante en otros tejidos y no desarrollan enfermedades autoinmunes espontáneas. Adicionalmente, los experimentos muestran que los ratones doblemente mutantes Cbl-b^{-/-} ATM^{-/-} exhiben una incidencia notablemente baja de linfomas espontáneos en comparación con los ratones ATM^{-/-} propensos a los tumores. Estas observaciones indican que el control de la función de Cbl-b por un compuesto químico podría ser beneficiosa tanto para inmunoterapia tumoral como para la prevención.

Si la interrupción de la función de la ubiquitina ligasa de Cbl-b no puede conferir la capacidad de respuesta de las células T contra los tumores, o simplemente provocar una respuesta antitumoral relativamente más débil en

5 comparación con las células T de Cbl-b^{-/-}, esto puede sugerir que otro(s) dominio(s) de Cbl-b y las correspondientes moléculas asociadas son importantes en la inmunidad de las células T contra los tumores. Otros estudios de mutagénesis como se describe en la presente memoria pueden identificar los dominios que están enlazados a la señal coestimuladora de CD28. La capacidad de estos mutantes para conferir inmunidad de células T a los tumores será examinada utilizando el diseño experimental anterior.

Es posible que el nivel de expresión de la Cbl-b con Ub inhabilitada en células T usando el enfoque anterior no sea comparable con aquel de la Cbl-b endógena. Los análisis anteriormente descritos también pueden ser hechos utilizando ratones con activación de Cbl-b con Ub inhabilitada.

10 En ciertas realizaciones, la descripción proporciona métodos para determinar los mecanismos mediante los cuales los ratones Cbl-b^{-/-} montan una respuesta inmune antitumoral eficiente y métodos para modular la ruta de señalización Cbl-b en células T para inmunoterapia tumoral. En ciertos aspectos, la descripción establece que los ratones Cbl-b^{-/-} son resistentes a la inoculación del tumor E.G7. La resistencia a la inoculación del tumor depende de las células T. La descripción también establece que células T de Cbl-b^{-/-} responden a la estimulación con antígeno independiente de la coestimulación de CD28. En otros aspectos, la descripción establece que Cbl-b puede controlar la señal coestimuladora de CD28 a través de su función de ubiquitina ligasa.

15 La descripción establece además que los CTL de Cbl-b^{-/-} son necesarios y suficientes para montar respuestas inmunes antitumorales en modelos animales. En cierto aspecto, la descripción establece que la ablación de Cbl-b en células T que infiltran al tumor, que están enriquecidas para los CTL específicos del tumor generados en forma natural, genera células T que pueden ser usadas como los "súper asesinas" para erradicar los tumores establecidos. En otros aspectos, la descripción establece que la inactivación de la actividad de ubiquitina ligasa de Cbl-b puede ser suficiente para volver células T sensibles contra los tumores.

20 En ciertas realizaciones, la descripción proporciona métodos que determinan los mecanismos subyacentes de la expansión de células B T1 deficientes en Cbl en el contexto de la tolerancia de células B. El análisis puede incluir la generación y maduración de las células B T1 *in vivo*. En otras realizaciones, se puede examinar la susceptibilidad de la muerte inducida por BCR de células B T1 Cbl-DKO. El análisis también puede incluir la evaluación del efecto potencial de las células T en la maduración y supervivencia de las células B T1 Cbl-DKO.

25 En otras realizaciones, la descripción proporciona métodos para determinar si la expansión de las células B T1 Cbl-DKO provoca el fracaso de la tolerancia de células B. Debido a que las células B T1 representan una etapa en el desarrollo de las células B cuando son susceptibles a anergia o muerte inducida por autoantígeno, la maduración acelerada de las células B Cbl-dKO podría acortar la ventana de desarrollo durante la cual se puede inducir la tolerancia de las células B por autoantígeno.

Referencias

- 35 1. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. 2001. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* 13: 134-40
2. Rosenberg SA. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411: 380-4
3. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337-65
4. Pardoll DM. 1998. Cancer vaccines. *Nat Med* 4: 525-31
- 40 5. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909-15
6. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15: 138-47
7. Boon T, van der Bruggen P. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183: 725-9
- 45 8. Rosenberg SA. 1999. A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance. *CA Cancer J Clin* 49: 70-3, 65
9. Restifo NP, Esquivel F, Asher AL, Stotter H, Barth RJ, Bennink JR, Mule JJ, Yewdell JW, Rosenberg SA. 1991. Defective presentation of endogenous antigens by a murine sarcoma. Implications for the failure of an anti-tumor immune response. *J Immunol* 147: 1453-9

10. Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. 2001. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol* 1: 209-19
11. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and Tcell activation. *Nature* 419: 734-8
- 5 12. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19: 565-94
13. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1: 515-20
- 10 14. Perdrizet GA, Ross SR, Stauss HJ, Singh S, Koeppen H, Schreiber H. 1990. Animals bearing malignant grafts reject normal grafts that express through gene transfer the same antigen. *J Exp Med* 171: 1205-20
15. Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1999. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2233-8
- 15 16. Singh S, Ross SR, Acena M, Rowley DA, Schreiber H. 1992. Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells. *J Exp Med* 175: 139-46
17. Ramarathinam L, Castle M, Wu Y, Liu Y. 1994. T cell costimulation by B7/BB induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells. *J Exp Med* 179: 1205-14
- 20 18. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7: 445-80
19. Janeway C. 1989. Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol Today* 10: 283-6
20. Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ, Warren HS. 1983. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol* 1: 143-73
- 25 21. Weaver CT, Unanue ER. 1990. The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol Today* 11: 49-55
22. Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR. 1995. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 7: 682-6
23. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *JExp Med* 173: 721-30
- 30 24. Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindsten T, Thompson CB, June CH. 1990. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood* 75: 1531-9
25. Schwartz RH. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71: 1065-8
- 35 26. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. 1992. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71: 1093-102
27. Greenberg PD. 1991. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49: 281-355
28. Melief CJ. 1992. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 58: 143-75
- 40 29. Ceredig R, Allan JE, Tabi Z, Lynch F, Doherty PC. 1987. Phenotypic analysis of the inflammatory exudate in murine lymphocytic choriomeningitis. *JExp Med* 165: 1539-51
30. Yu P, Lee Y, Liu W, Chin RK, Wang J, Wang Y, Schietinger A, Philip M, Schreiber H, Fu YX. 2004. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat Immunol* 5: 141-9

31. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Allen PM. 2000. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 13: 265-76
- 5 32. Wick M, Dubey P, Koeppen H, Siegel CT, Fields PE, Chen L, Bluestone JA, Schreiber H. 1997. Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *JExp Med* 186: 229-38 8
33. Sarma S, Guo Y, Guilloux Y, Lee C, Bai XF, Liu Y. 1999. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor rejection antigen PA: normal development but restrained effector function in vivo. *JExp Med* 189: 811-20
- 10 34. Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Antony PA, Spiess PJ, Palmer DC, Heimann DM, Klebanoff CA, Yu Z, Hwang LN, Feigenbaum L, Kruisbeek AM, Rosenberg SA, Restifo NP. 2003. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of selfreactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198: 569-80
35. Townsend SE, Allison JP. 1993. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259: 368-70
- 15 36. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE. 1994. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 179: 523-32
37. Wallin JJ, Liang L, Bakardjiev A, Sha WC. 2001. Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J Immunol* 167: 132-9
38. Liu X, Bai XF, Wen J, Gao JX, Liu J, Lu P, Wang Y, Zheng P, Liu Y. 2001. B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 194: 1339-48
- 20 39. Steinman RM. 2001. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 68: 106-66
40. Morisaki T, Matsumoto K, Onishi H, Kuroki H, Baba E, Tasaki A, Kubo M, Nakamura M, Inaba S, Yamaguchi K, Tanaka M, Katano M. 2003. Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-pulsed dendritic cell vaccine and activated T cells for cancer patients: rationale, current progress, and perspectives. *Hum Cell* 16: 175-82
- 25 41. Kedl RM, Rees WA, Hildeman DA, Schaefer B, Mitchell T, Kappler J, Marrack P. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 192: 1105-13
42. Helmich BK, Dutton RW. 2001. The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the E.G7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of T_H1 and T_H2 effectors. *J Immunol* 166: 6500-8
- 30 43. Kelly JM, Sterry SJ, Cose S, Turner SJ, Fecondo J, Rodda S, Fink PJ, Carbone FR. 1993. Identification of conserved T cell receptor CDR3 residues contacting known exposed peptide side chains from a major histocompatibility complex class 1-bound determinant. *Eur J Immunol* 23: 3318-26
- 35 44. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27
45. Finkelstein SE, Heimann DM, Klebanoff CA, Antony PA, Gattinoni L, Hinrichs CS, Hwang LN, Palmer DC, Spiess PJ, Surman DR, Wrzesinski C, Yu Z, Rosenberg SA, Restifo NP. 2004. Bedside to bench and back again: how animal models are guiding the development of new immunotherapies for cancer. *J Leukoc Biol* 76: 333-7
46. Rao N, Dodge I, Band H. 2002. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J Leukoc Biol* 71: 753-63
47. Liu YC, Gu H. 2002. Cbl and Cbl-b in T-cell regulation. *Trends Immunol* 23: 140-3
48. Thien CB, Langdon WY. 2001. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 294-307
49. Regnier DC, Kozak CA, Kingsley DM, Jenkins NA, Copeland NG, Langdon WY, Morse HC, 3rd. 1989. Identification of two murine loci homologous to the v-cbl oncogene. *J Virol* 63: 3678-82

50. Keane MM, Rivero-Lezcano OM, Mitchell JA, Robbins KC, Lipkowitz S. 1995. Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene. *Oncogene* 10: 2367-77
51. Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Banerjee P, Cuello M, Penninger J, Lipkowitz S. 1999. cbl-3: a new mammalian cbl family protein. *Oncogene* 18: 3365-75
- 5 52. Lupher ML, Jr., Andoniou CE, Bonita D, Miyake S, Band H. 1998. The c-Cbl oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 439-44
53. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. 1999. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286: 309-12
- 10 54. Murphy MA, Schnall RG, Venter DJ, Barnett L, Bertoncello I, Thien CB, Langdon WY, Bowtell DD. 1998. Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* 18: 4872-82
55. Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM. 2000. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 403: 211-6
- 15 56. Chiang YJ, Kole HK, Brown K, Naramura M, Fukuhara S, Hu RJ, Jang IK, Gutkind JS, Shevach E, Gu H. 2000. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 403: 216-20
57. Naramura M, Kole HK, Hu RJ, Gu H. 1998. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15547-52
58. Naramura M, Jang IK, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H. 2002. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* 3: 1192-9
- 20 59. Roes J, Rajewsky K. 1991. Cell autonomous expression of IgD is not essential for the maturation of conventional B cells. *Int Immunol* 3: 1367-71
60. Umlauf SW, Beverly B, Lantz O, Schwartz RH. 1995. Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics. *Mol Cell Biol* 15: 3197-205
- 25 61. Naramura M, Hu RJ, Gu H. 1998. Mice with a fluorescent marker for interleukin 2 gene activation. *Immunity* 9: 209-16
62. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850-4
- 30 63. Dudley ME, Rosenberg SA. 2003. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 666-75
64. Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkernagel RM, Ohashi PS. 1997. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *JExp Med* 186: 645-53
- 35 65. Nestle FO, Aljagac S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4: 328-32
66. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. 1999. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5: 677-85
- 40 67. Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H, Fu YX. 2003. Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *JExp Med* 197: 985-95
68. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401-6
- 45

69. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-3
70. Zou YR, Sunshine MJ, Taniuchi I, Hatam F, Killeen N, Littman DR. 2001. Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage. *Nat Genet* 29: 332-6
- 5 71. Ledbetter JA, Rouse RV, Micklem HS, Herzenberg LA. 1980. T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *JExp Med* 152: 280-95
72. Singer O, Yanai A, Verma IM. 2004. Silence of the genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5313-4
- 10 73. Fang D, Liu YC. 2001. Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells. *Nat Immunol* 2: 870-5
74. Miura-Shimura Y, Duan L, Rao NL, Reddi AL, Shimura H, Rottapel R, Druker BJ, Tsygankov A, Band V, Band H. 2003. Cbl-mediated ubiquitinylation and negative regulation of Vav. *J Biol Chem* 278: 38495-504
75. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP. 2000. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102: 533-9
- 15 76. Freemont PS. 2000. RING for destruction? *Curr Biol* 10: R84-7
77. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. 1999. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4: 1029-40
- 20 78. Tsygankov AY, Teckchandani AM, Feshchenko EA, Swaminathan G. 2001. Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters. *Oncogene* 20: 6382-402
79. Rosenberg, S.A. 1999. A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance. *CA Cancer J Clin* 49:70-73, 65.
- 25 80. Somasundaram, R., L. Jacob, R. Swoboda, L. Caputo, H. Song, S. Basak, D. Monos, D. Peritt, F. Marincola, D. Cai, B. Birebent, E. Bloome, J. Kim, K. Berencsi, M. Mastrangelo, and D. Herlyn. 2002. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 62:5267-5272.
81. Yu, X., R. Abe, and R.J. Hodes. 1998. The role of B7-CD28 co-stimulation in tumor rejection. *Int Immunol* 10:791-797.
- 30 82. Jeon; M.S., A. Atfield, K. Venuprasad, C. Krawczyk, R. Sarao, C. Elly, C. Yang, S. Arya, K. Bachmaier, L. Su, D. Bouchard, R. Jones, M. Gronski, P. Ohashi, T. Wada, D. Bloom, C.G. Fathman, Y.C. Liu, and J.M. Penninger. 2004. Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* 21:167-177.
83. Kronenberg, M., and A. Rudensky. 2005. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 435:598-604.

REIVINDICACIONES

1. Una población de células aisladas, sustancialmente purificada, que comprende células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b para uso como un medicamento, adecuado para uso en rechazo inmune de tumores.
- 5 2. Una población de células aisladas, sustancialmente purificada, que comprende células T CD8⁺ con actividad reducida de Cbl-b para uso en un método para el tratamiento del cáncer.
3. La población de células para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células T CD8⁺ provienen de sangre periférica, órganos linfáticos, o infiltrados tumorales.
4. La población de células para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la población de células se aísla de un sujeto.
- 10 5. La población de células para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las células T CD8⁺ se aíslan de infiltrados tumorales del sujeto.
6. La población de células para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las células T CD8⁺ son policlonales.
- 15 7. La población de células para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde las células T CD8⁺ han sido separadas de la población de células y estimuladas para proliferar.
- 8 La población de células para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde las células T CD8⁺ han sido separadas de la población de células y estimuladas con células tumorales aisladas de un sujeto, para aumentar el número de células T CD8⁺ específicas del tumor.
- 20 9. La población de células para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde las células T CD8⁺ específicas del tumor han sido puestas en contacto con un anticuerpo anti-CD3 o incubadas con IL-2 o una combinación de los mismos con el fin de aumentar adicionalmente el número de las células T CD8⁺ específicas del tumor.
- 25 10. La población de células para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde la actividad reducida Cbl-b ha sido lograda mediante uno o más de: (i) poner en contacto las células T CD8⁺ con un agente químico que inhibe expresión o actividad de Cbl-b, (ii) la introducción de un ARNi de la SEQ ID NO: 1 (5'-AGGAGTATGAGACAGAAG-3'), que dirige a Cbl-b en las células T CD8⁺, y (iii) desactivar el gen que codifica Cbl-b.
11. La población de células para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde un sujeto que va a ser tratado padece cualquiera de los siguientes tipos de tumores: melanoma, linfoma, o cualquiera de los tumores sólidos que expresan MHC-I con un antígeno que puede ser reconocidos por los CTL.
- 30 12. Un método para identificar un agente que afecta a la expresión o actividad de Cbl-b, comprendiendo el método:
 - (a) la estimulación de una célula T CD8⁺ con un anticuerpo anti-CD3 en ausencia de coestimulación con un anticuerpo anti-CD28,
 - (b) el contacto la célula T CD8⁺ con un agente candidato,
 - (c) la medición de los niveles de estimulación o proliferación de la célula T CD8⁺,
 en donde un agente que conduce a la estimulación o proliferación de la célula T CD8⁺ es indicativo de un agente que subregula actividad o expresión de Cbl-b.
- 35 13. Un agente que comprende una molécula de ARNi de la SEQ ID NO: 1 (5'-CAGGAGTATGAGACAGAAG-3') para uso como un medicamento.
- 40 14. Un agente que comprende una molécula de ARNi de la SEQ ID NO: 1 (5'-CAGGAGTATGAGACAGAAG-3') para uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, en donde el agente es capaz de disminuir la actividad de Cbl-b, y en donde el agente es capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral.

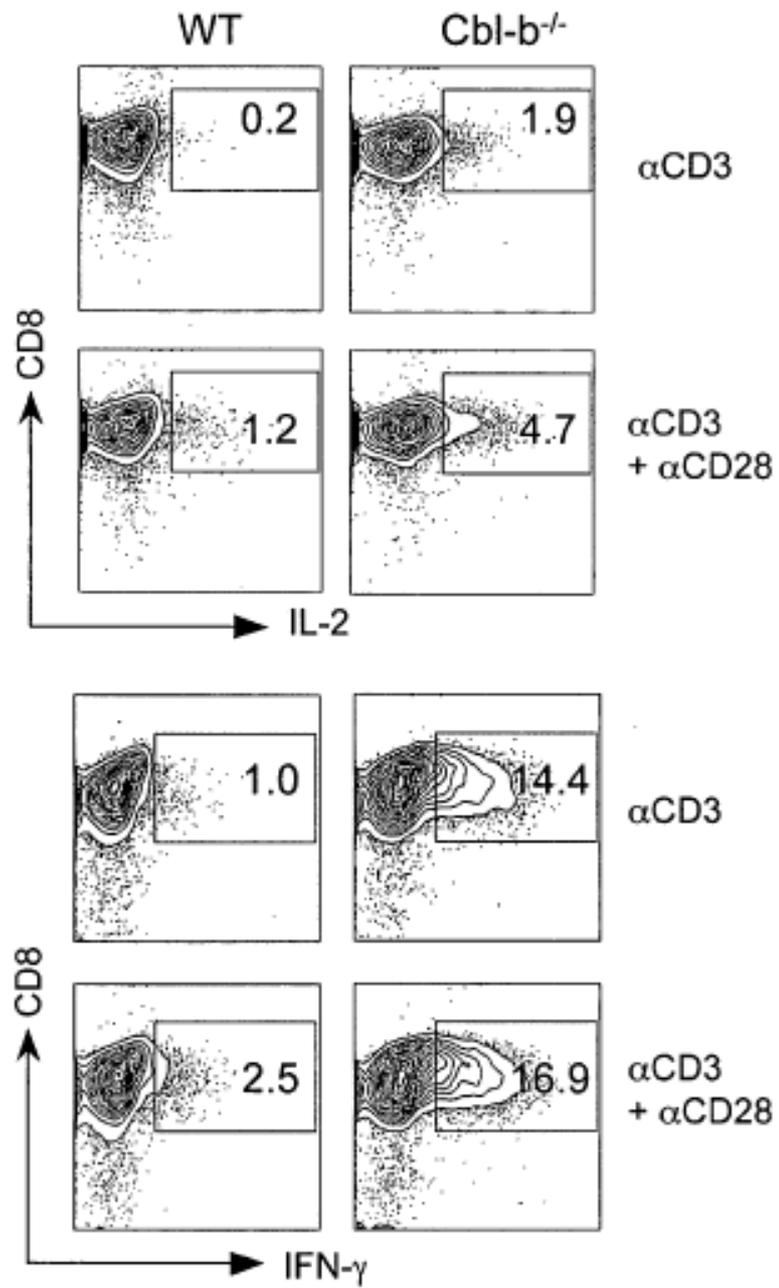


FIG. 1A

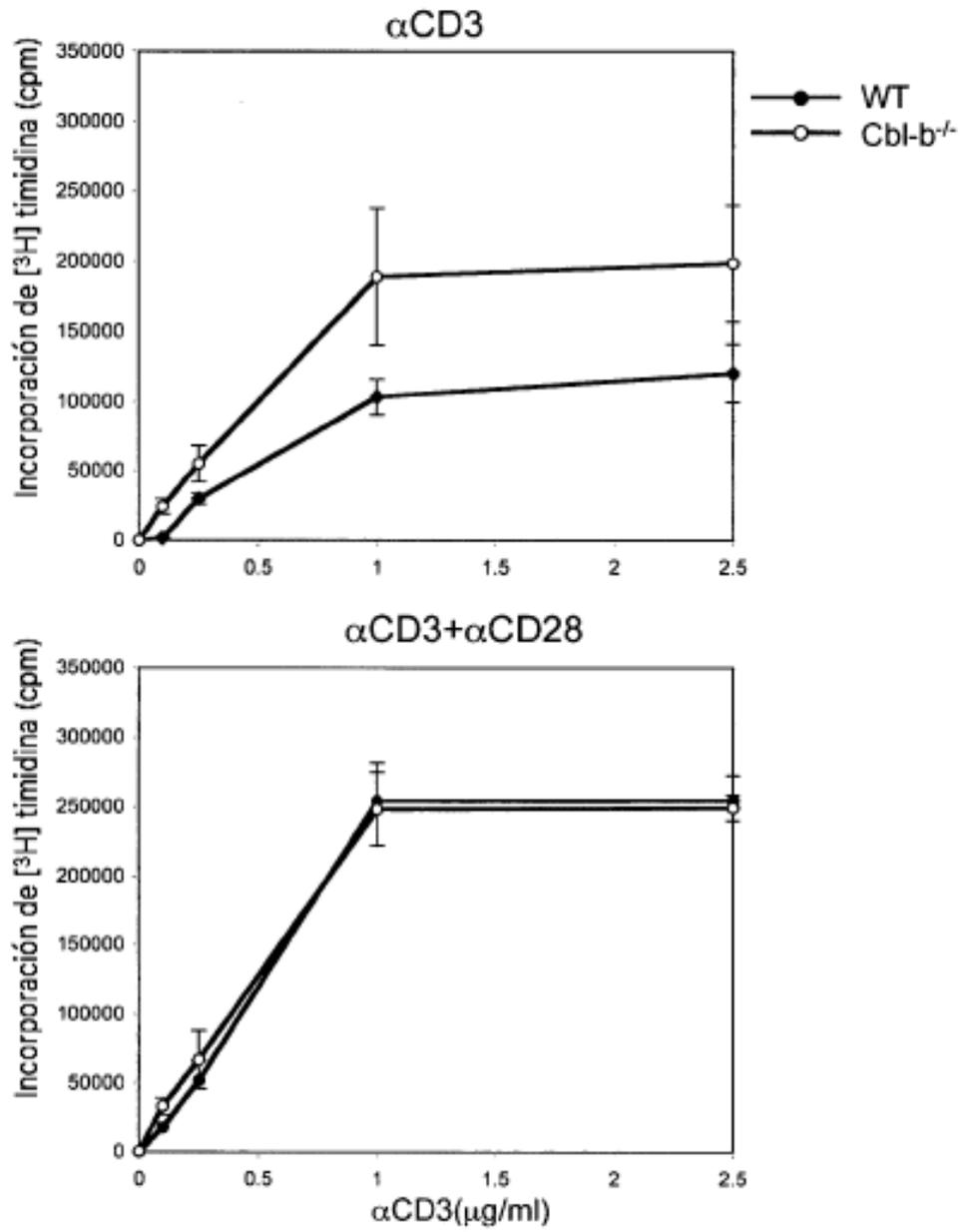


FIG. 1B

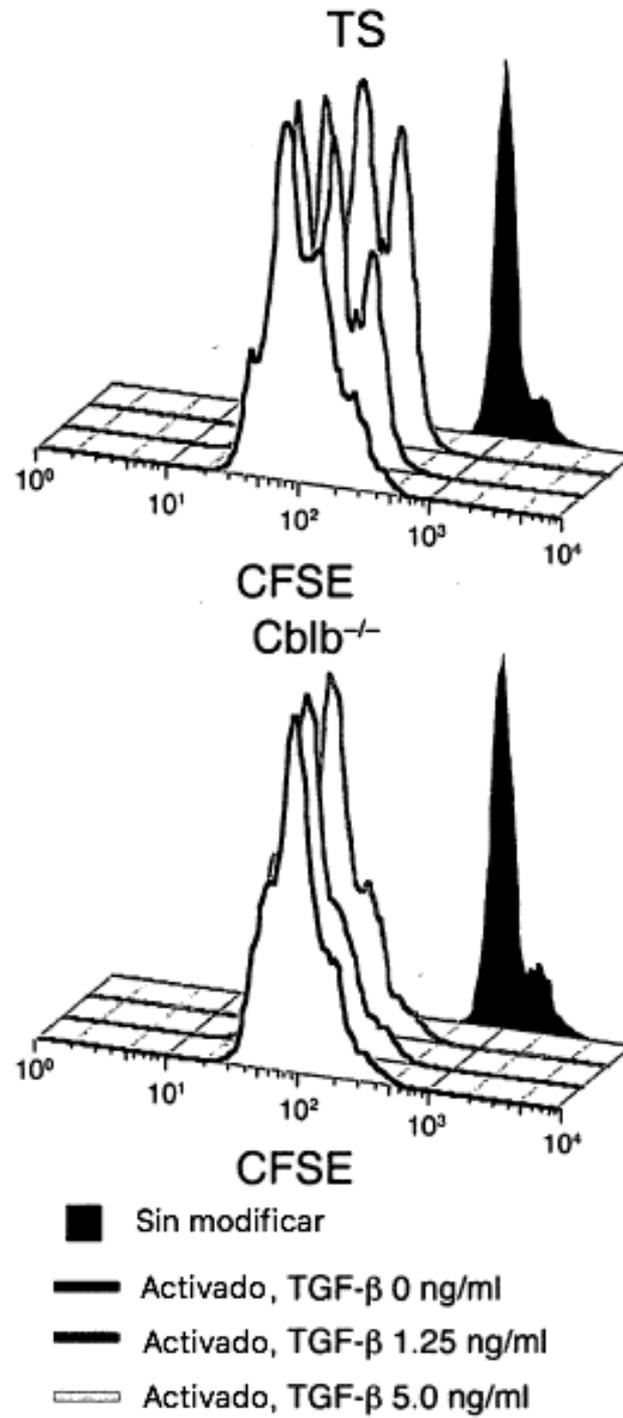


FIG. 1C

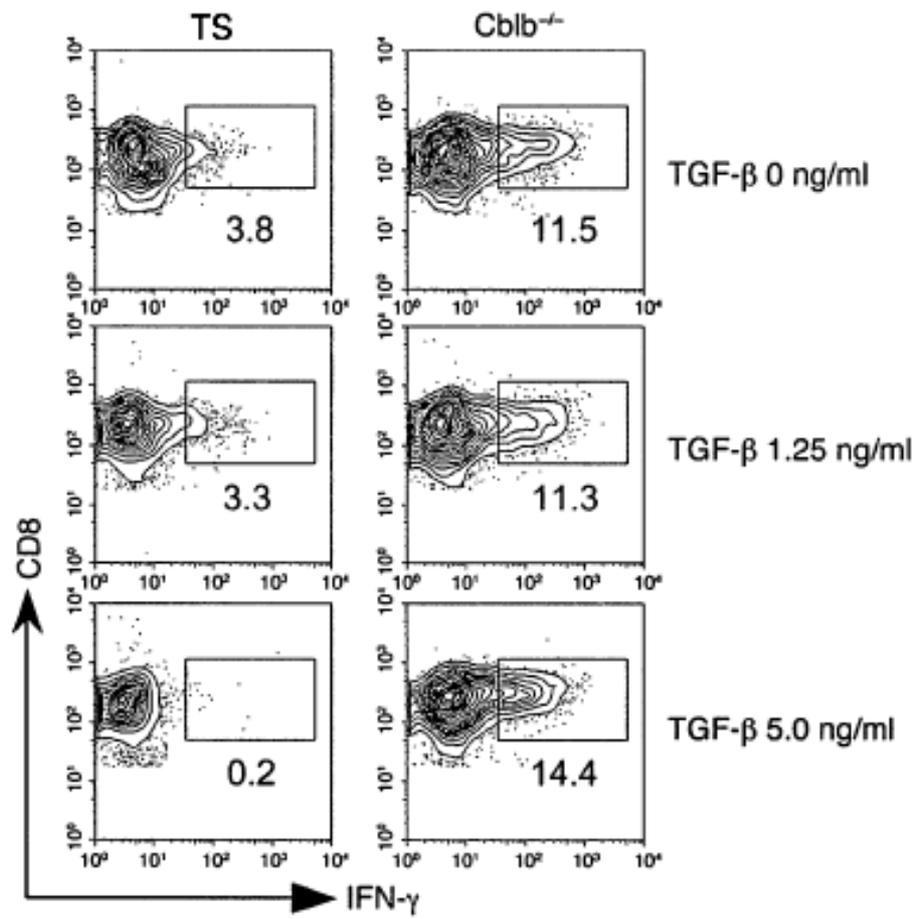
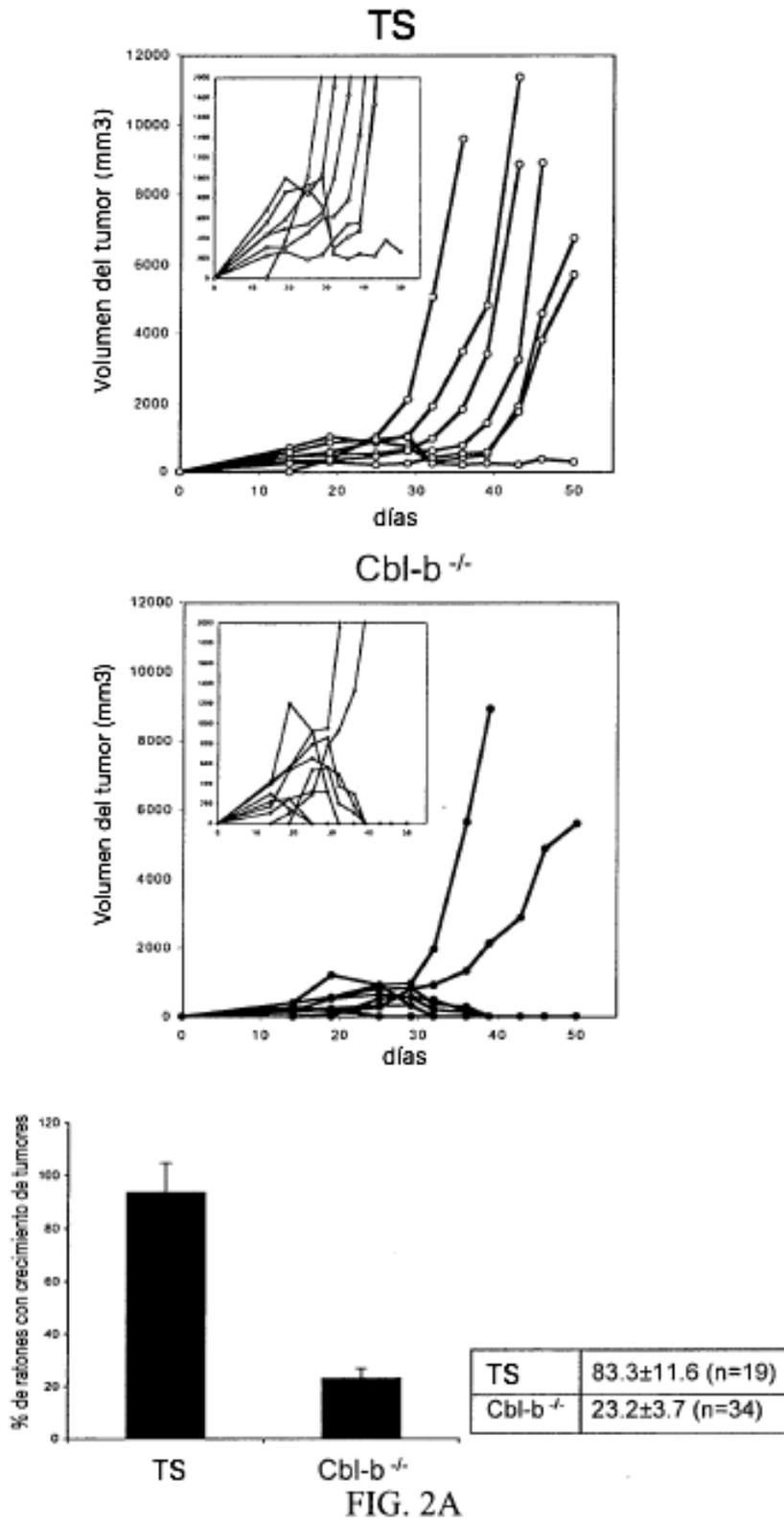


FIG. 1D



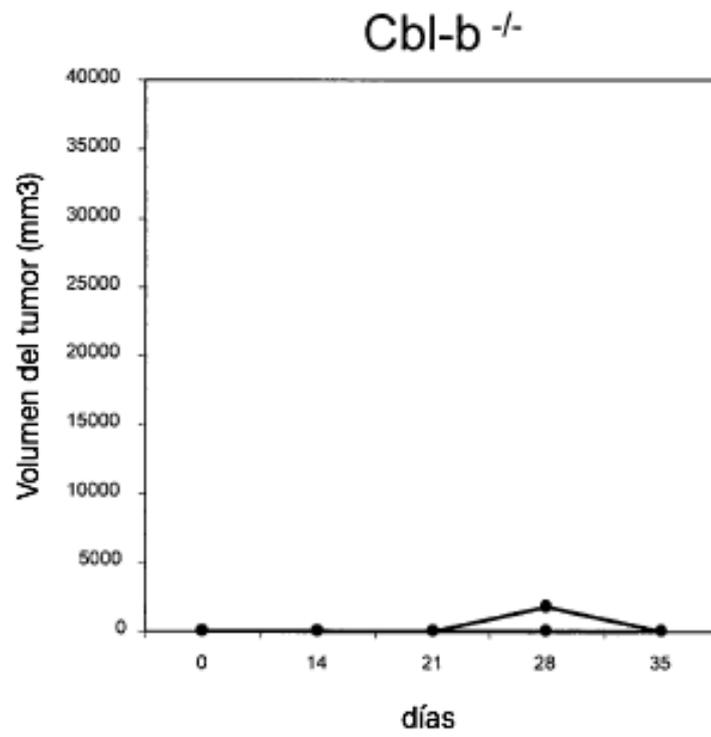
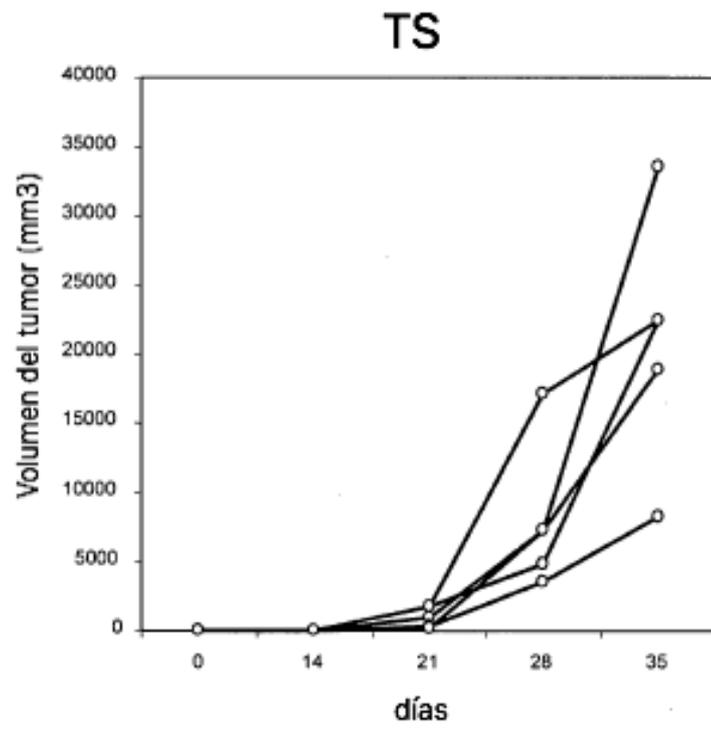


FIG. 2B

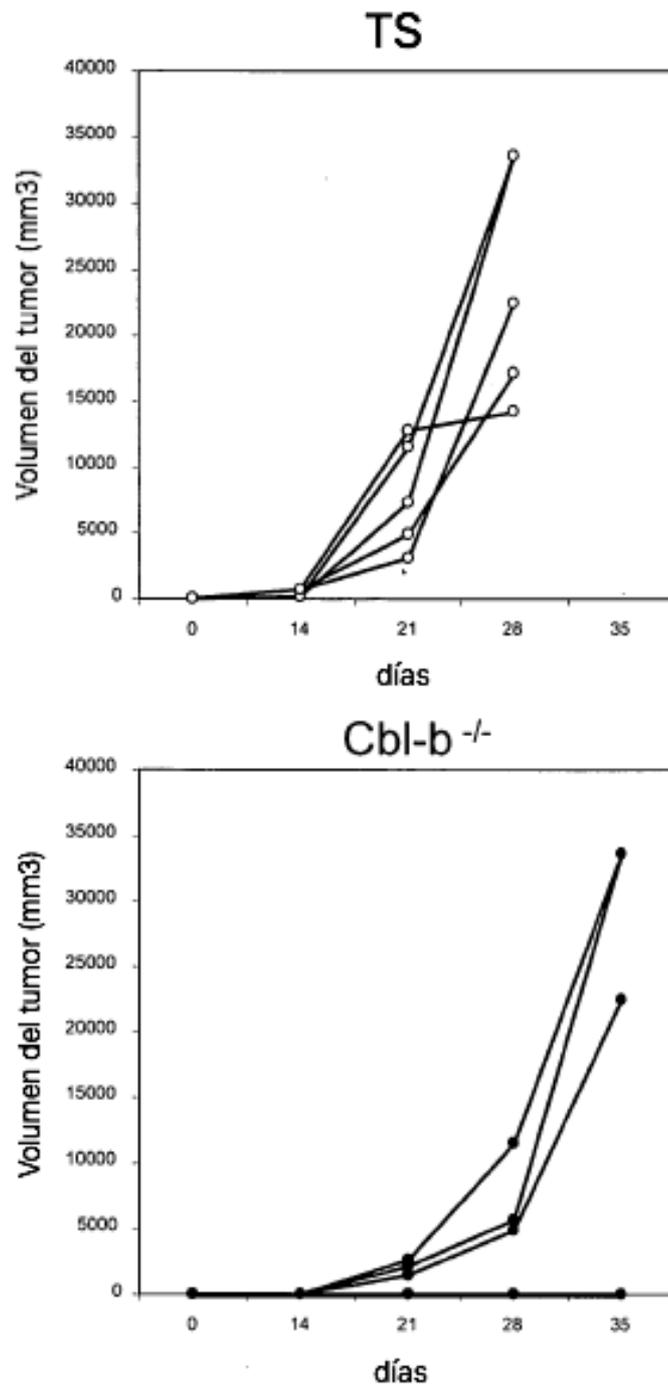


FIG. 2C

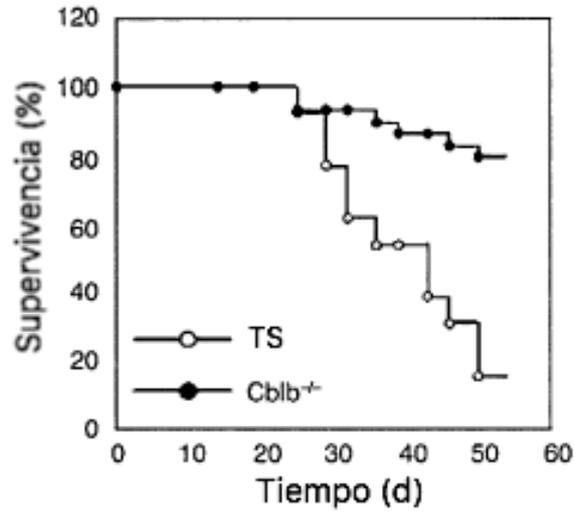


FIG. 2D

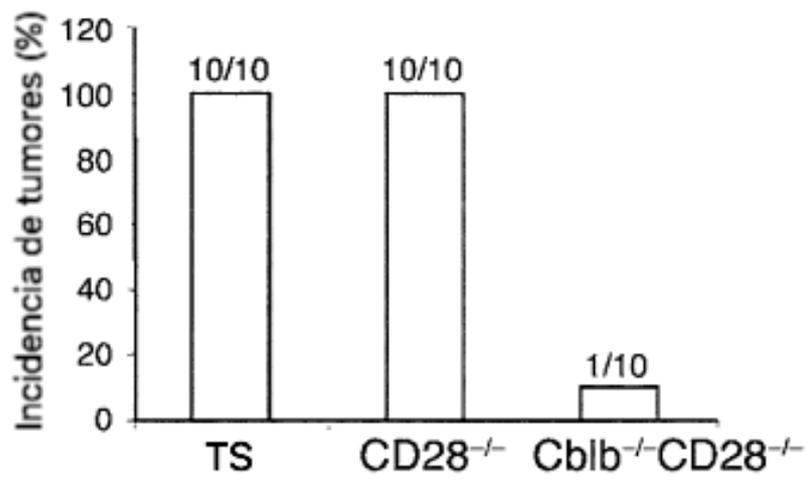


FIG. 2E

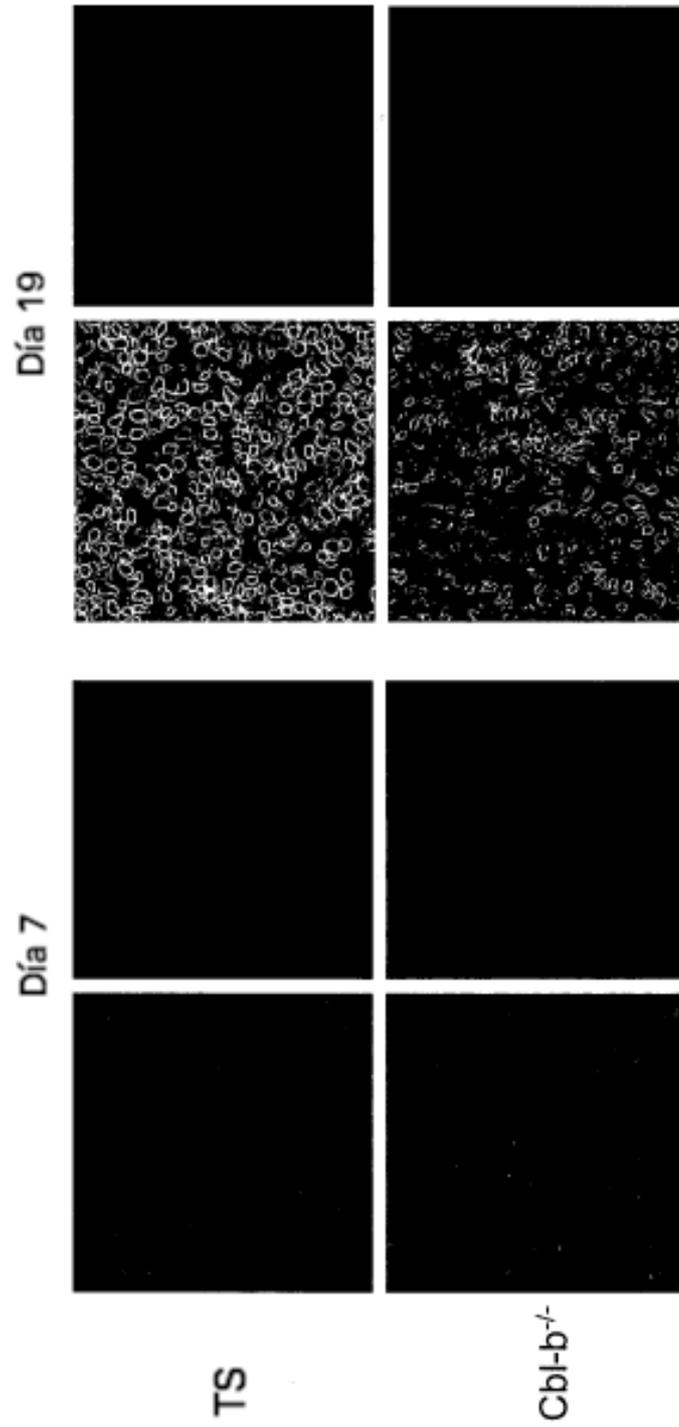


FIG. 3A

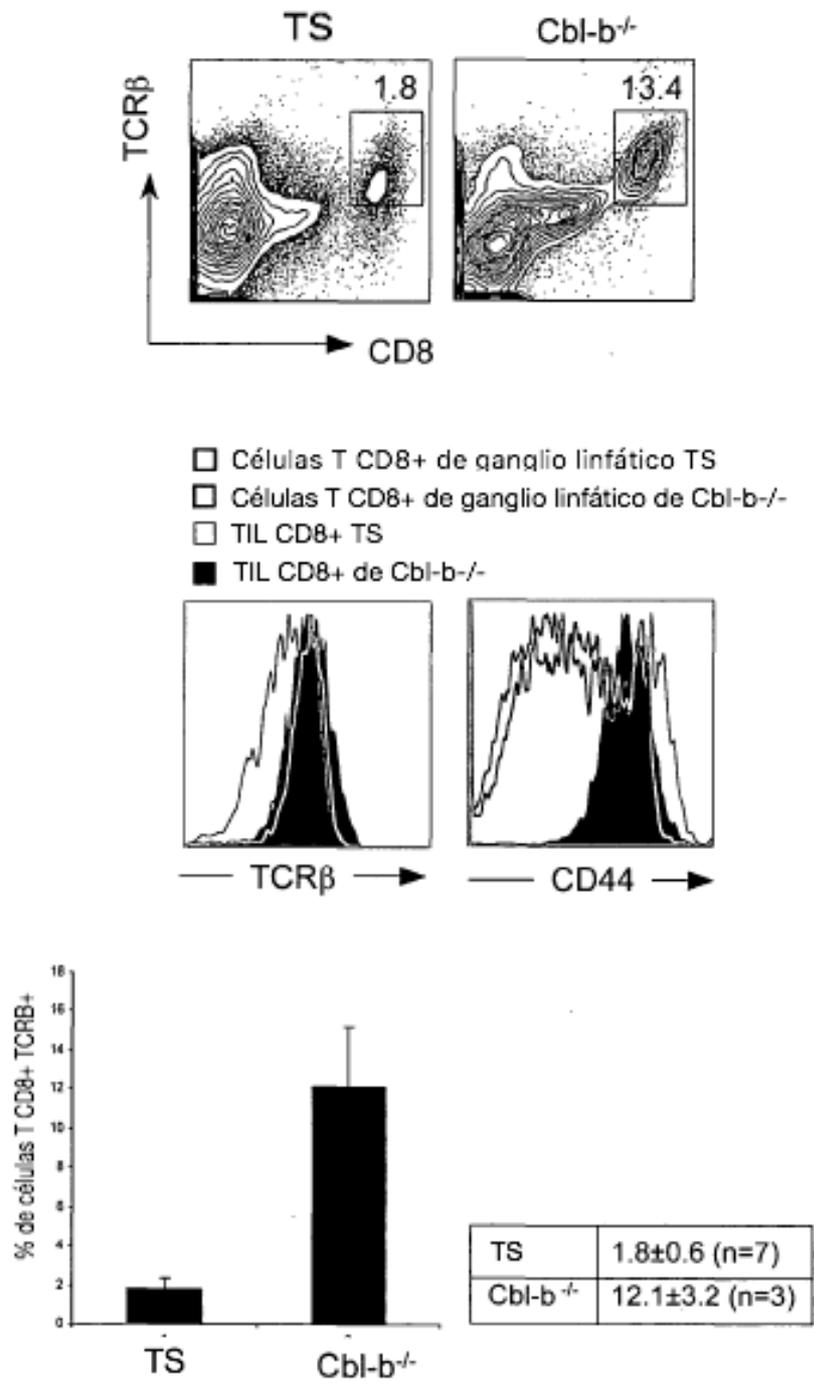


FIG. 3B

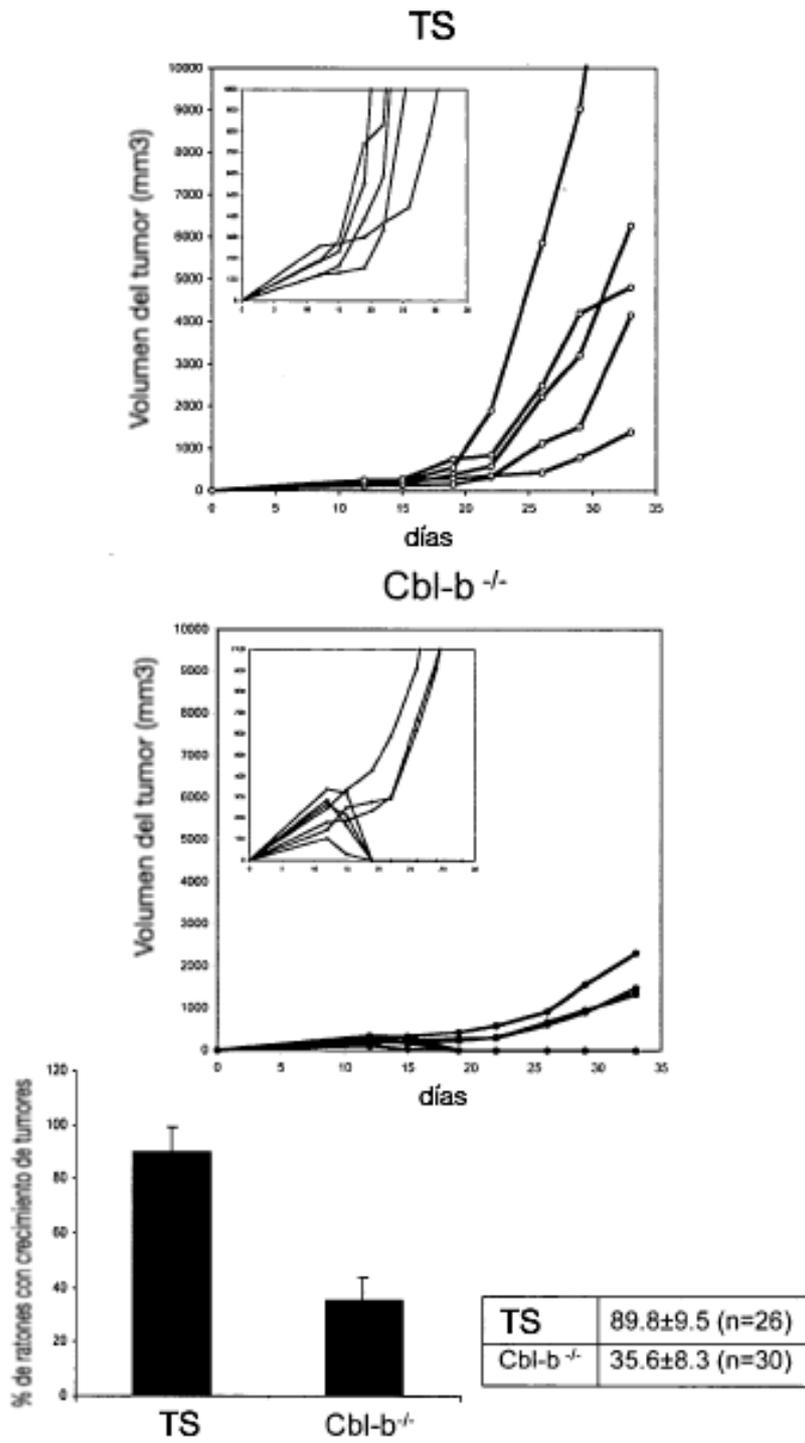


FIG. 3C

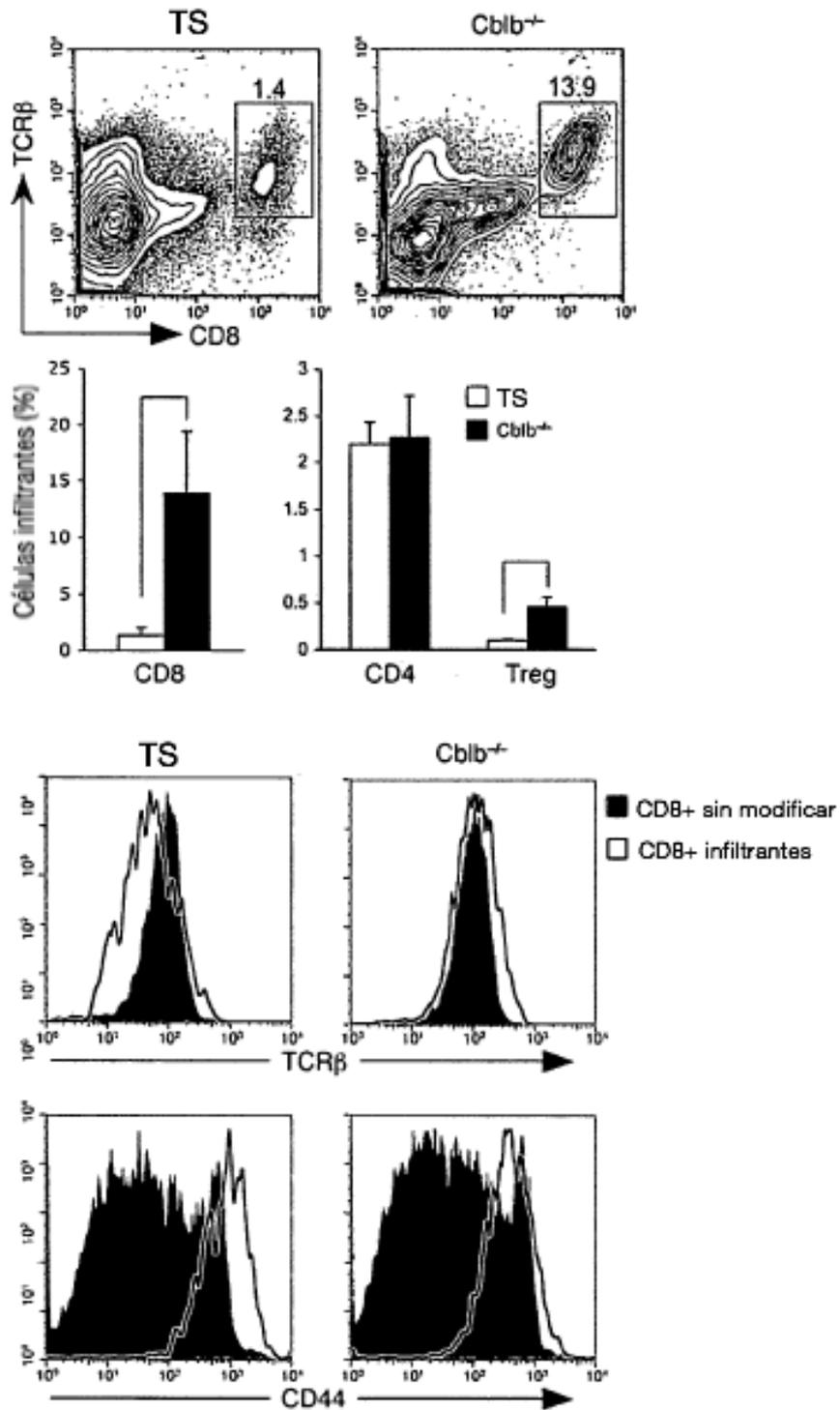


FIG. 3D

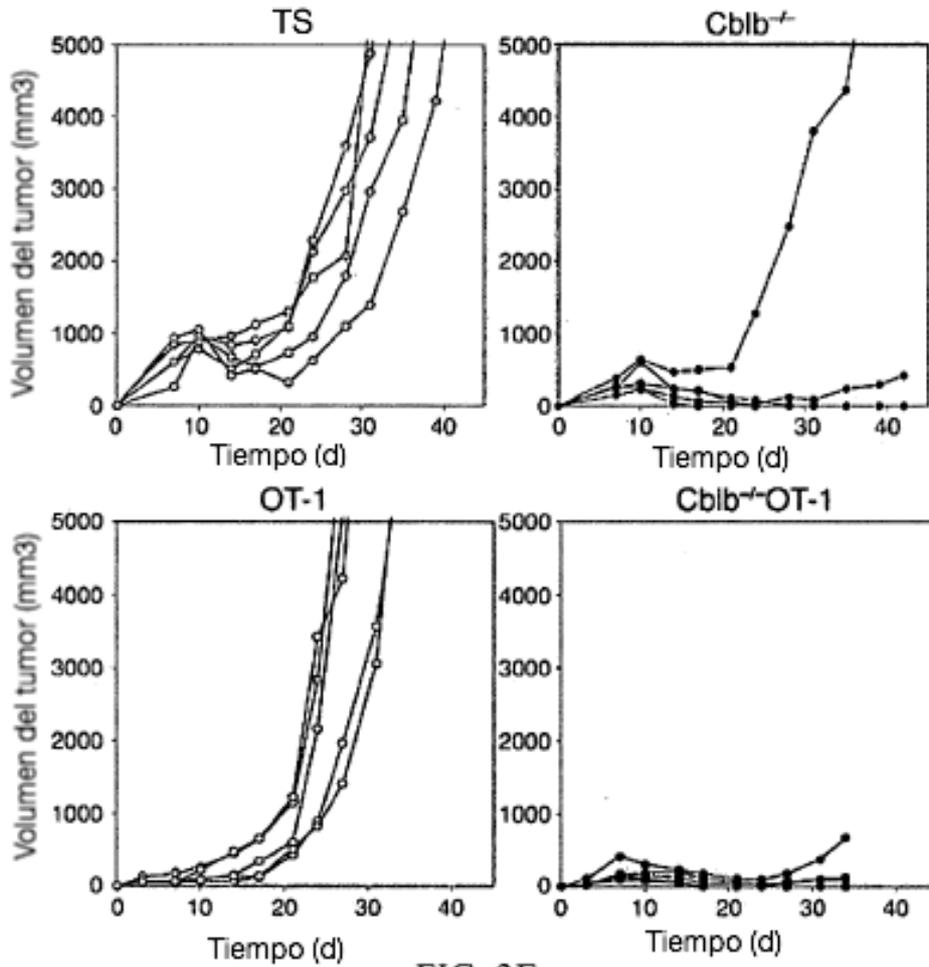


FIG. 3E

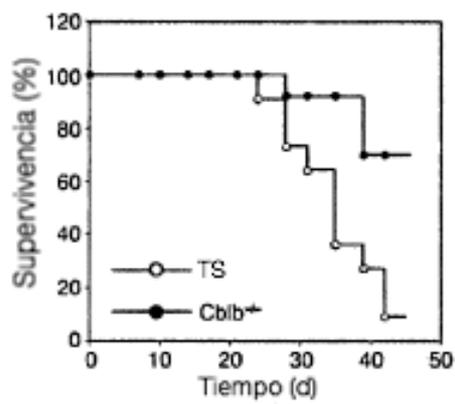


FIG. 3F

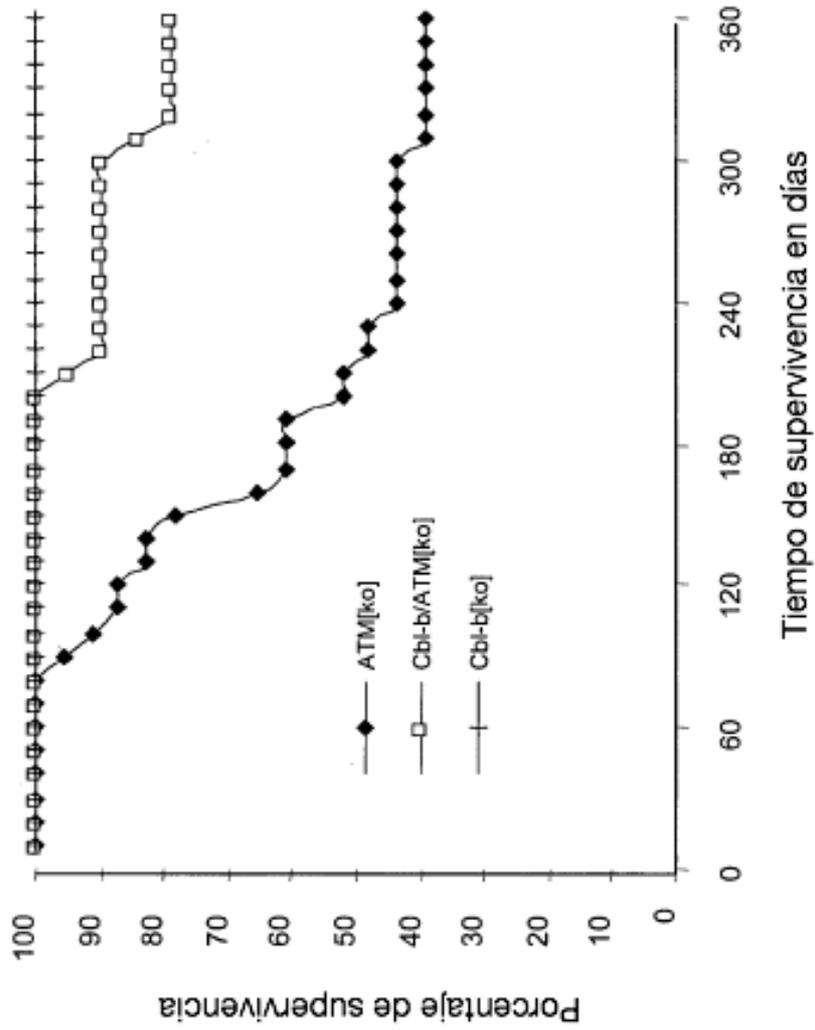


FIG.4

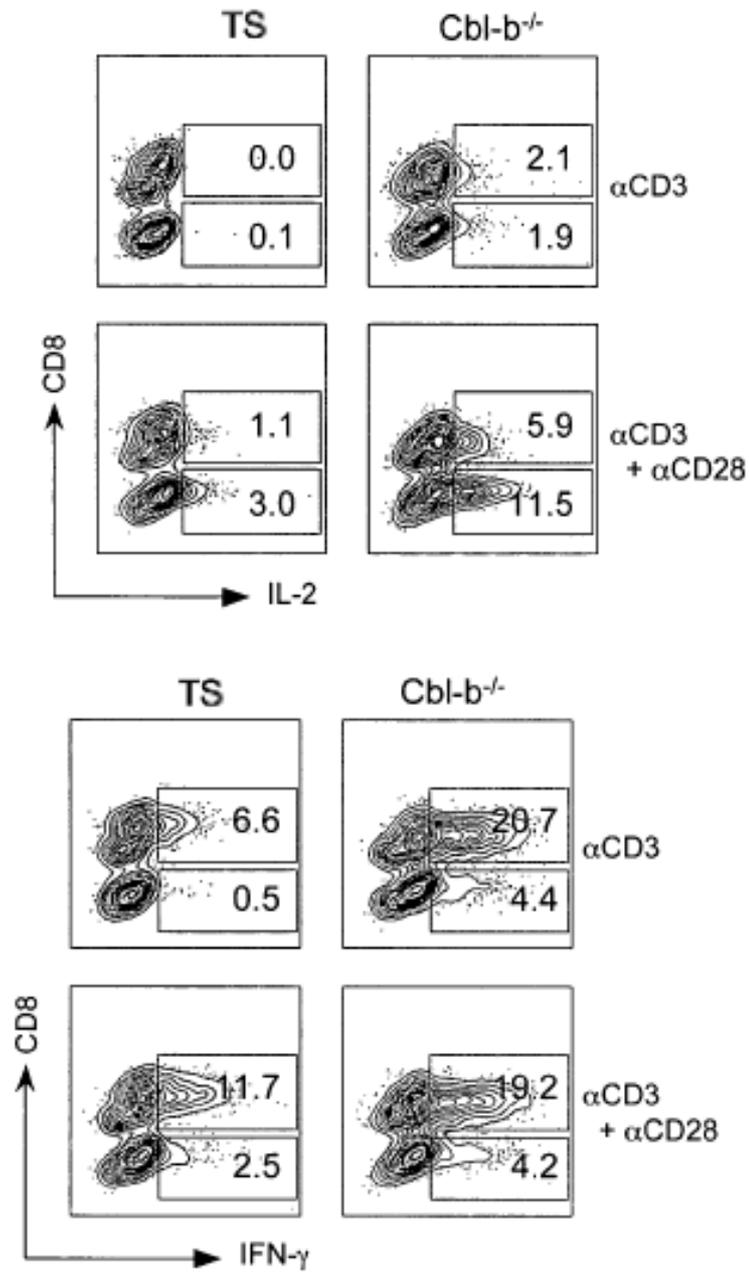


FIG. 5

a

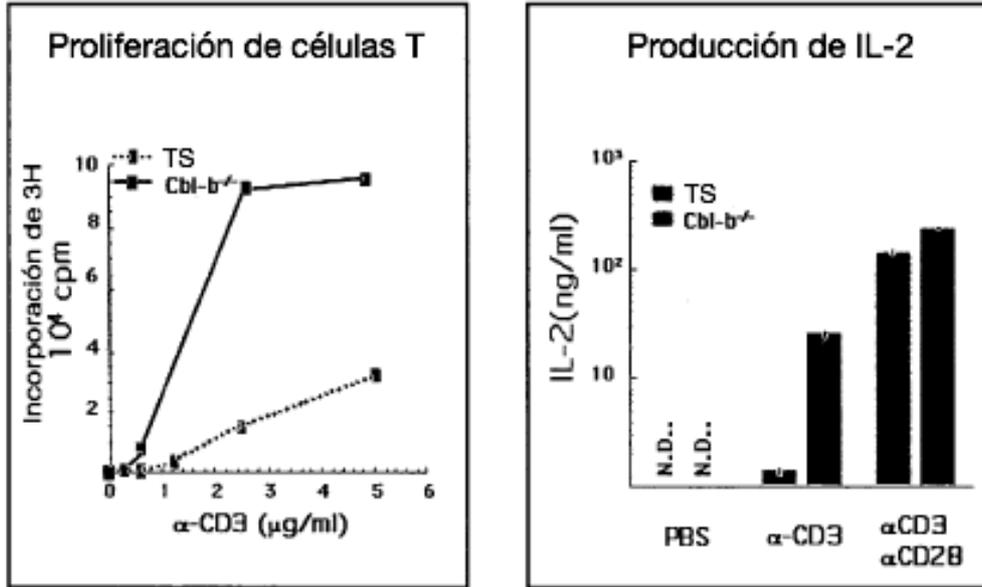


FIG. 6A

b

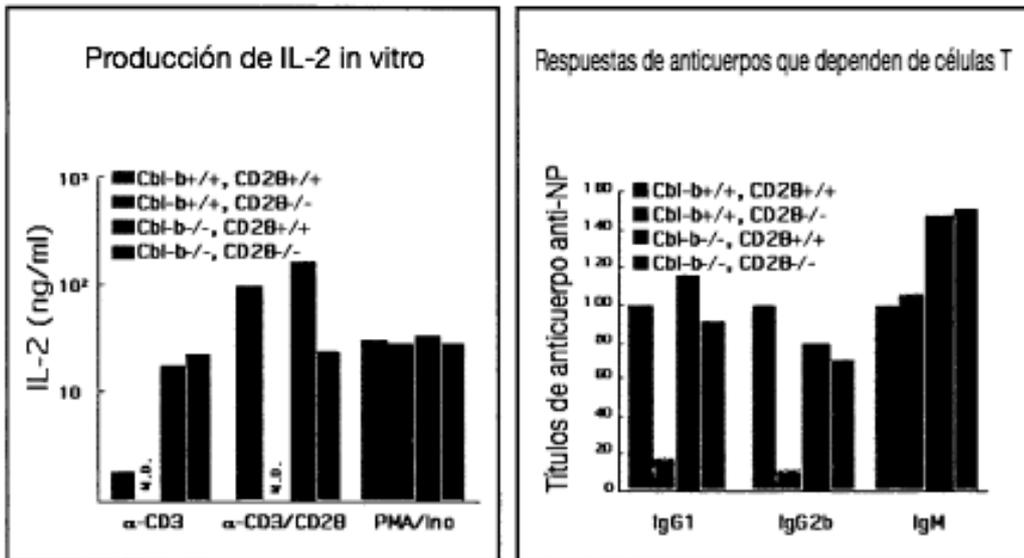


FIG. 6B

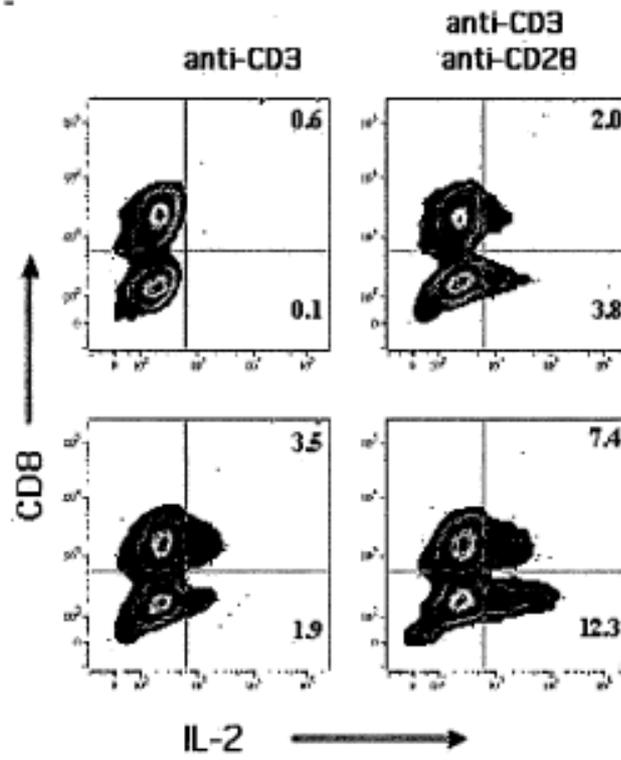


FIG. 7A

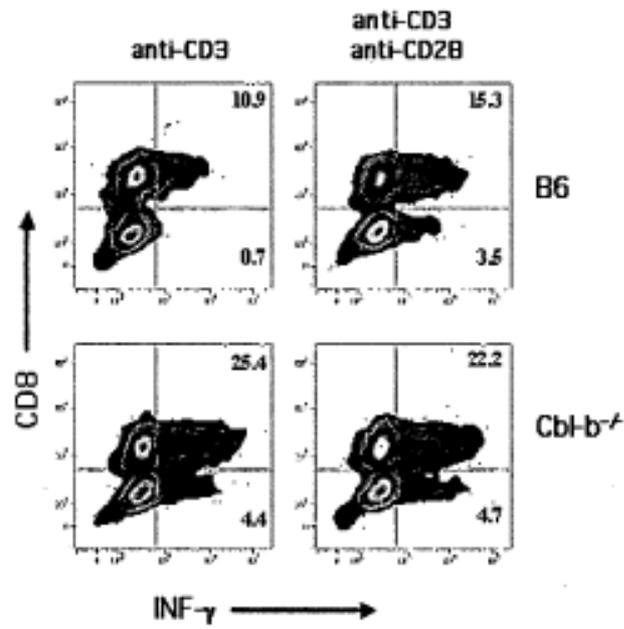


FIG. 7B

a

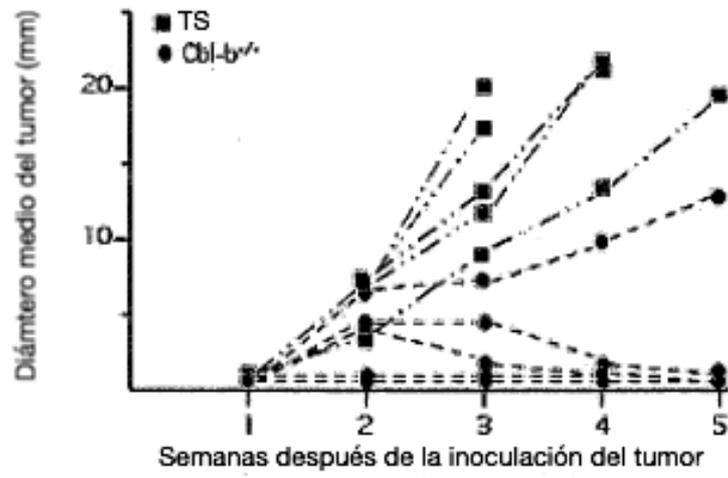


FIG. 8 A

b

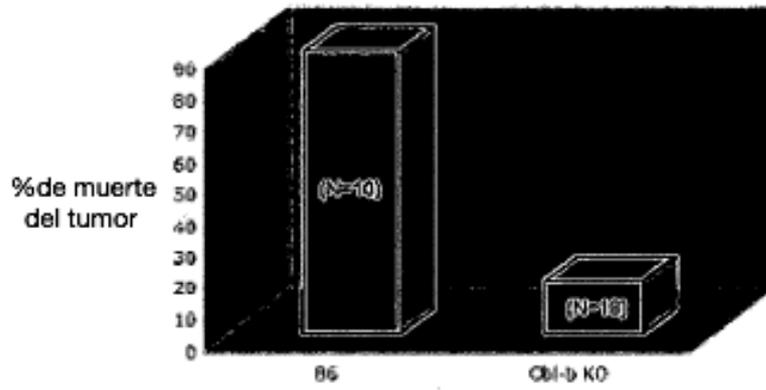


FIG. 8 B

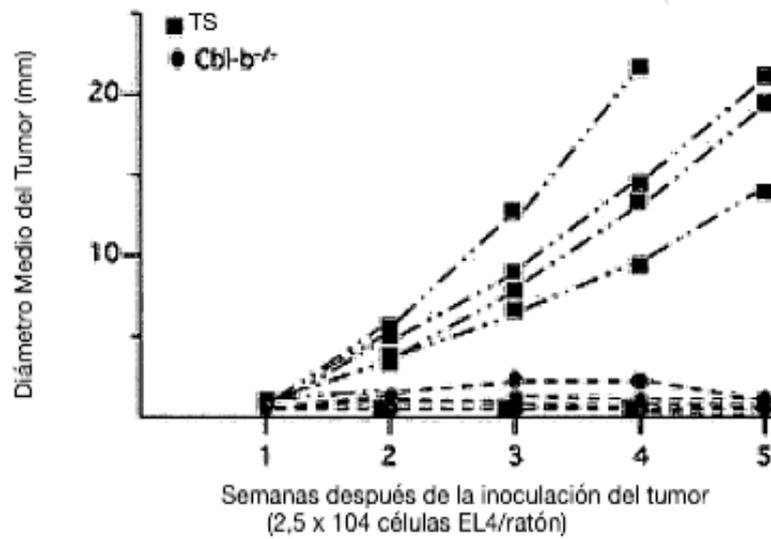


FIG. 8 C

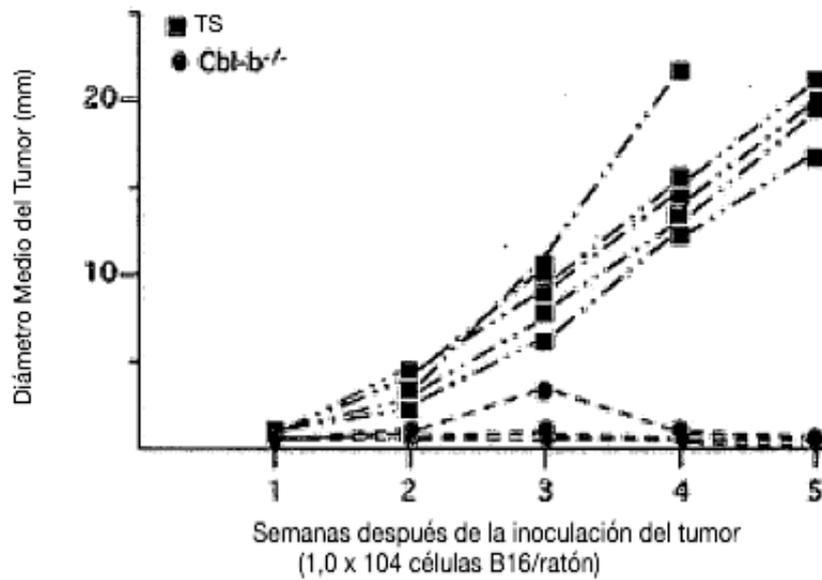


FIG. 8 D

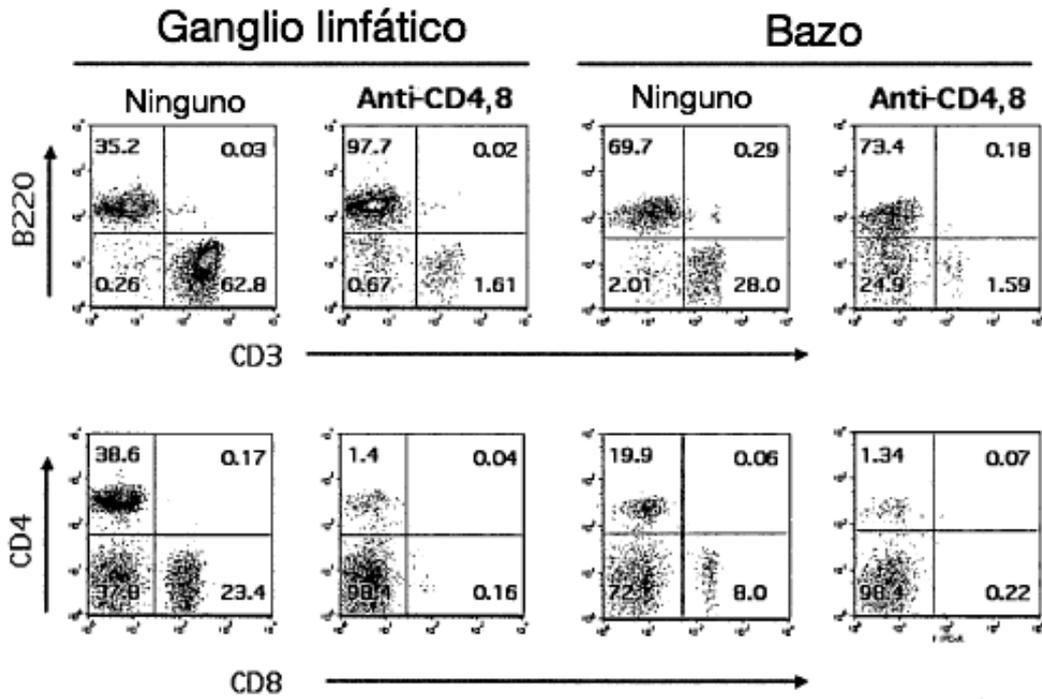


FIG.9A

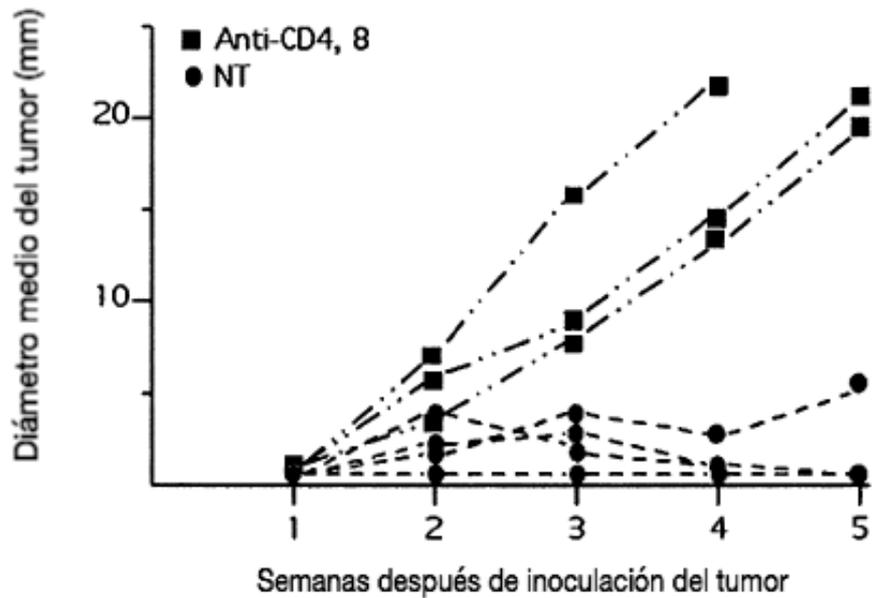


FIG. 9B

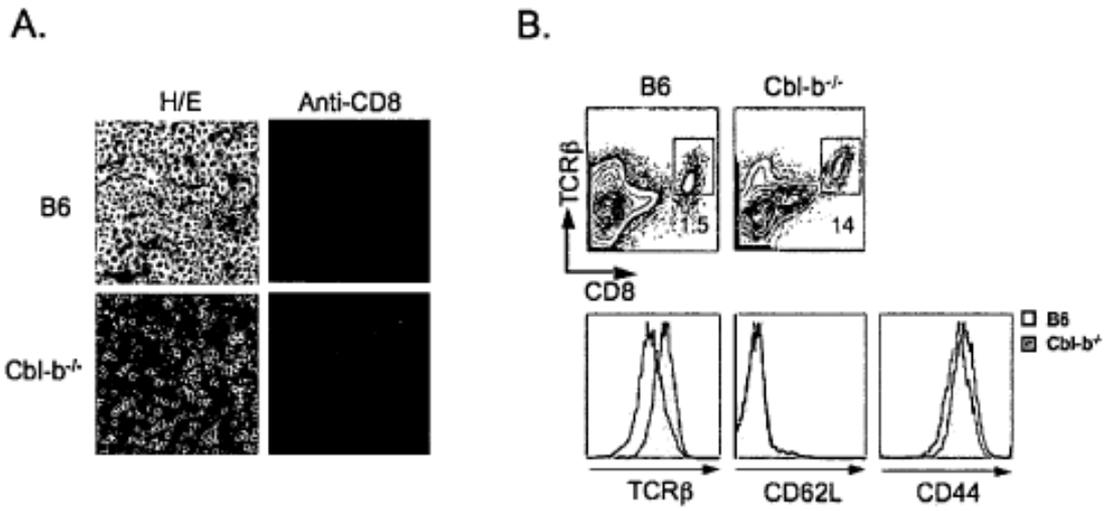


FIG. 10

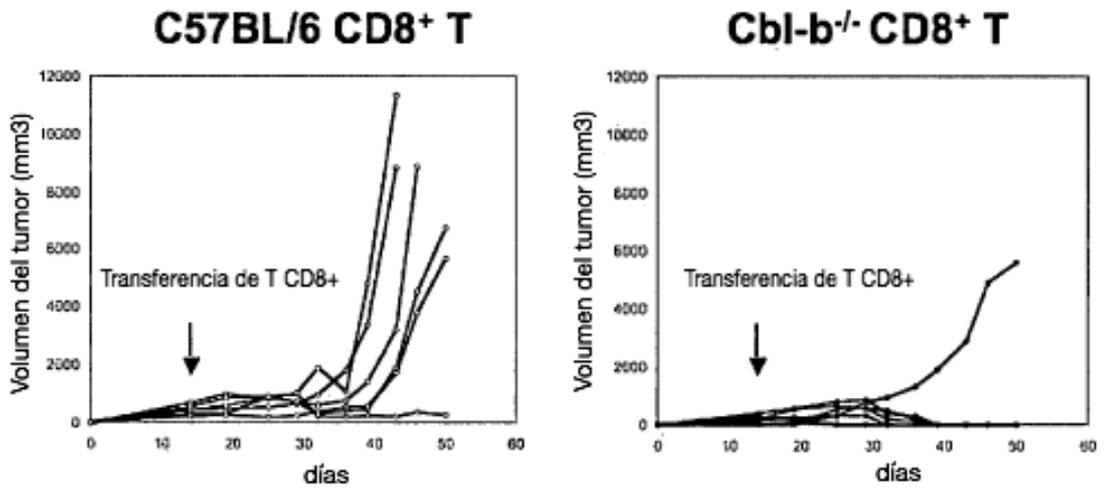


FIG. 11

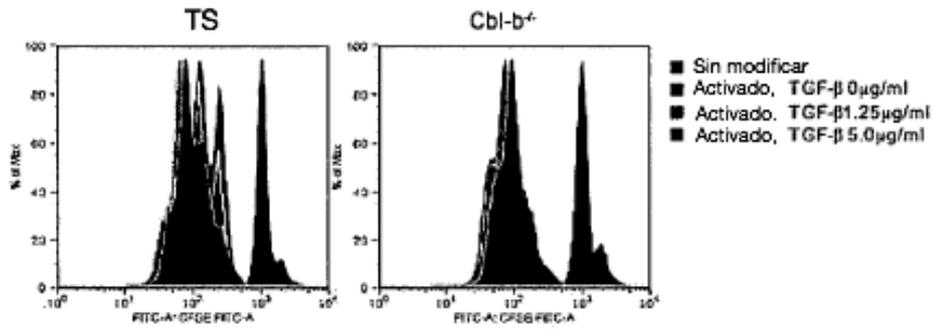


FIG. 12A

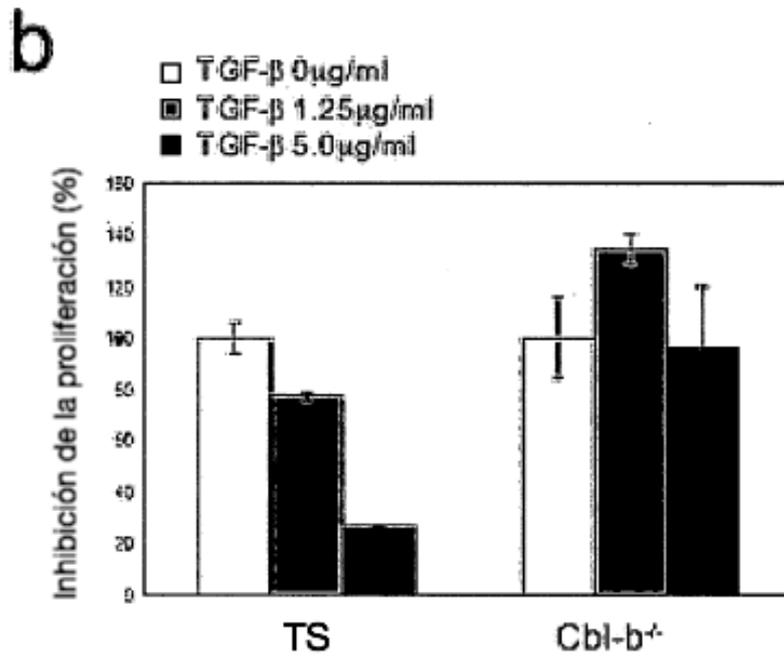


FIG. 12B

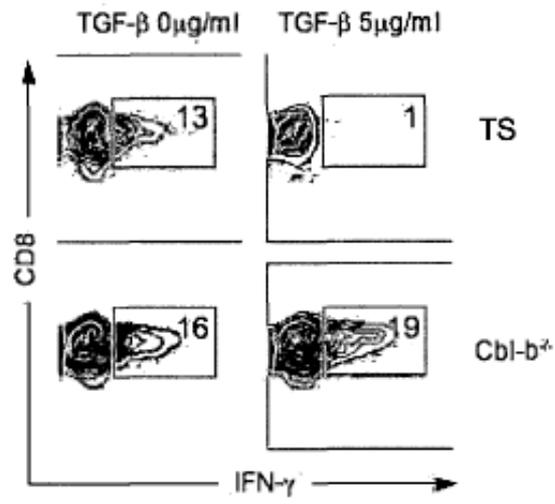


FIG. 12C



FIG. 13A

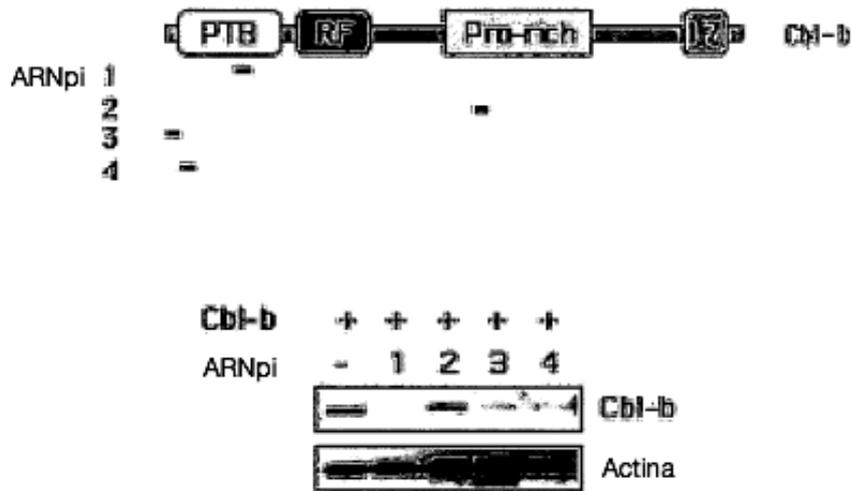


FIG. 13B

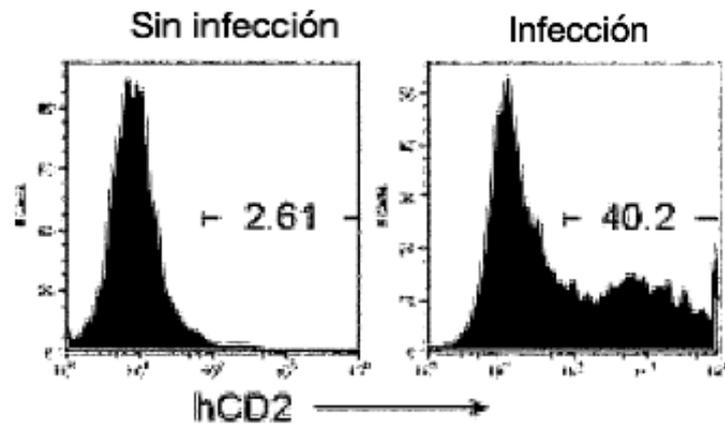


FIG. 13C

Timocitos del donante

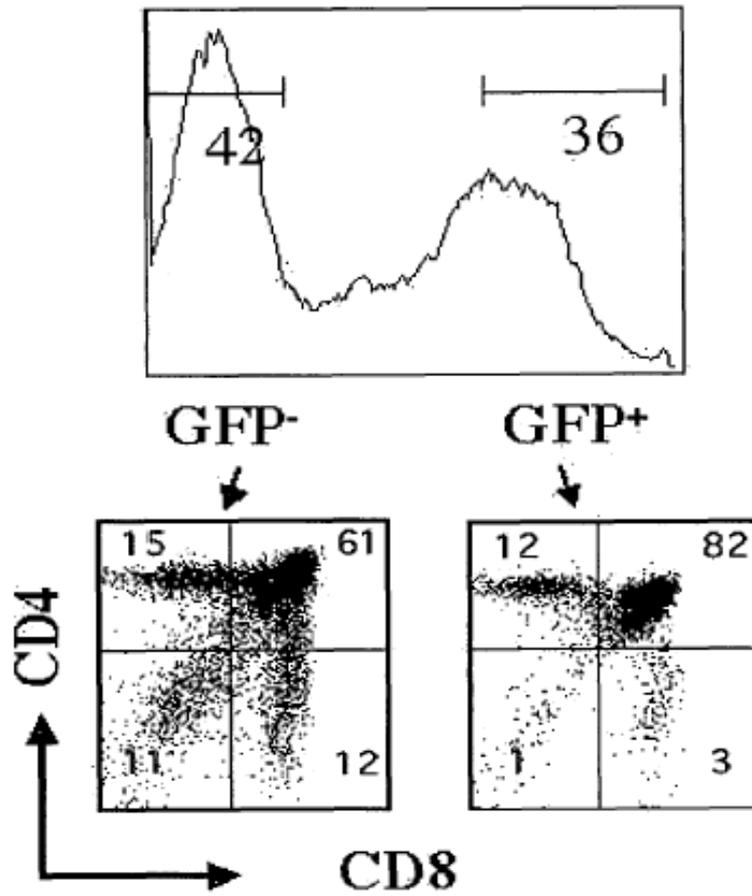


FIG. 14

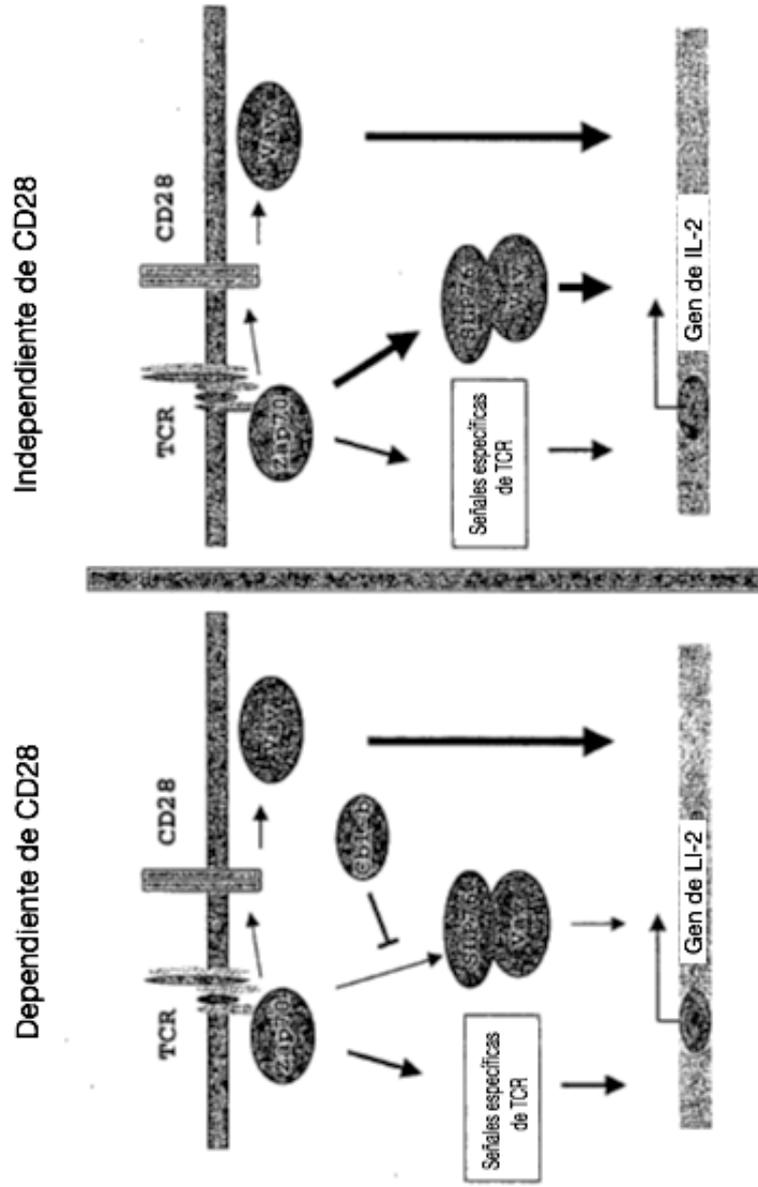


FIG. 15

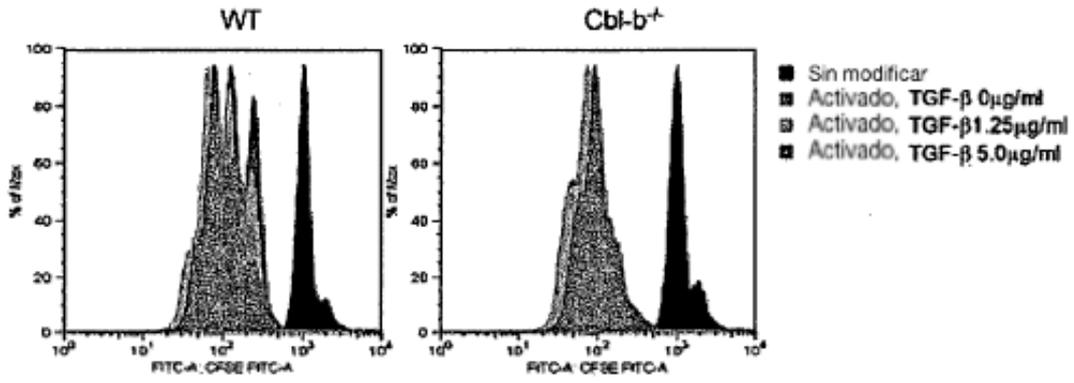


FIG. 16A

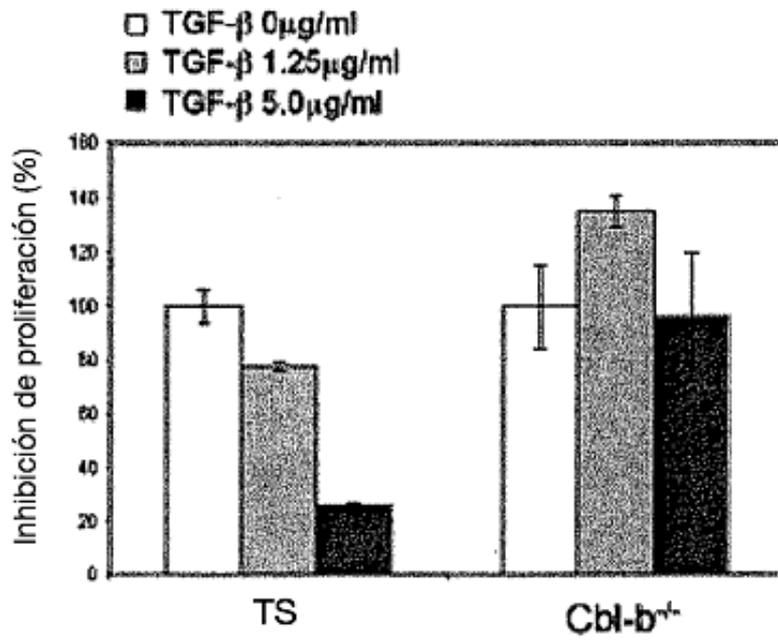


FIG. 16B

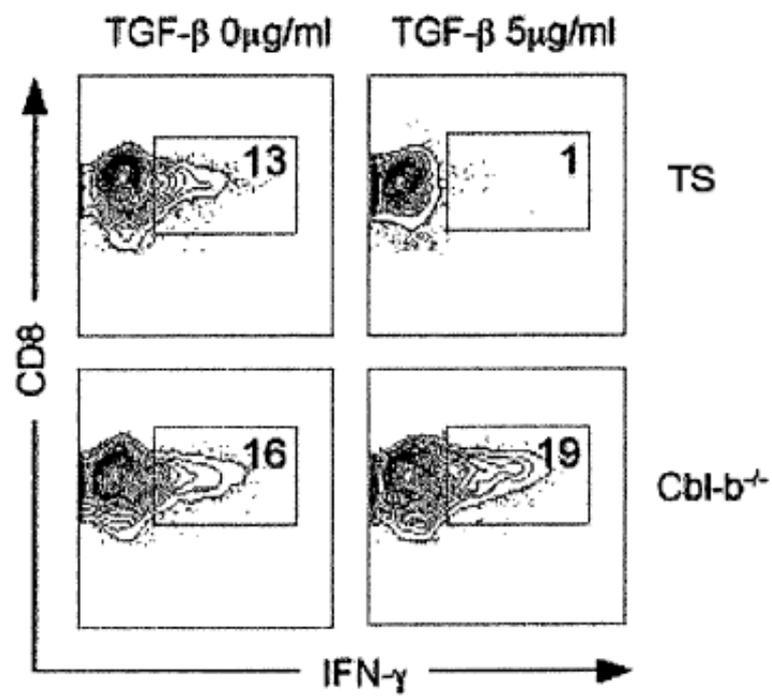


FIG. 16C

Generación y transferencia adoptiva de Cbl-b ko CD8⁺ para terapia tumoral

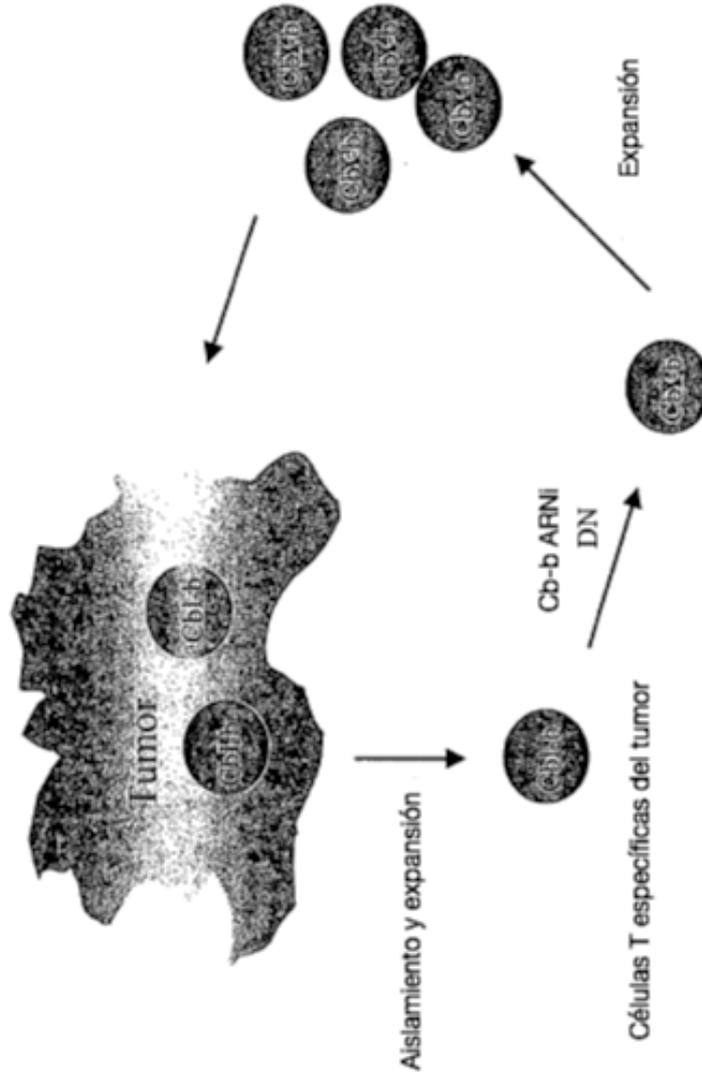


FIG. 17