

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 307**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2008 PCT/US2008/052724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2008 WO08095141**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2008 E 08728776 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2126054**

54 Título: **Células T reguladoras redirigidas, modificadas genéticamente y su uso en la supresión de enfermedades autoinmunes e inflamatorias**

30 Prioridad:

**31.01.2007 US 898408 P**  
**20.07.2007 US 951052 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.12.2016**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT  
COMPANY LIMITED (100.0%)  
The Weizmann Institute of Science P.O. Box 95  
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**ESHAR, ZELIG y  
ELINAV, ERAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 595 307 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

Células T reguladoras redirigidas, modificadas genéticamente y su uso en la supresión de enfermedades autoinmunes e inflamatorias

Antecedentes de la invención

## 5 Campo de la invención

La invención en el campo de la inmunología y la medicina se refiere a la modificación genética de las células T reguladoras con receptores quiméricos con especificidad tipo anticuerpo, y el uso de tales células para suprimir la acción de las células T efectoras y tratar cualquiera de una serie de enfermedades y condiciones en las que tal supresión es beneficiosa, principalmente enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), enfermedades autoinmunes específicas de órganos, rechazo de aloinjertos y enfermedad del huésped versus injerto.

Descripción del estado de la técnica

Células T reguladoras (Treg)

Una línea de investigación que condujo al descubrimiento de las células Treg fue la observación de que la timectomía de los ratones de ciertas cepas susceptibles el día 3 después del nacimiento trae como resultado un espectro de efectos autoinmunes específicos de órganos, que eran prevenibles por "reconstitución" de estos animales de manera temprana en la vida con linfocitos adultos normales (Asano M y colaboradores, J Exp Med 1996; 184: 387-96). Los efectores y supresores de la autoinmunidad en este modelo de autoinmunidad multiorgánica eran células T CD4+. Posteriormente se demostró que las células T reguladoras CD4+ Treg que previenen enfermedades coexpresan CD25. Las células T reguladoras CD4+CD25+ representan 5-10% de las células CD4+ periféricas totales en ratones y 3-6% de las células T CD4+ totales de sangre periférica en los seres humanos (Jonuleit H y colaboradores, J Exp Med 2001; 193: 1285-1294).

Durante la última década, las células T reguladoras CD4+CD25+ han sido estudiadas por su función en enfermedades autoinmunes. Las células T reguladoras CD4+CD25+ suprimieron una enfermedad inducida por células T efectoras específicas de autoantígeno clonadas (Suri-Payer, E y colaboradores, J. Immunol, 1998; 160: 1212-1218). Las células Treg CD4+CD25+ parecen ser miembros de un único linaje de células T reguladoras. Estos autores observaron que, aunque el(los) antígeno(s) objetivo y el mecanismo de acción de las células T CD4+CD25+ quedaron aún por determinar, es probable que jueguen un papel importante en la modulación de otras enfermedades autoinmunes que están mediadas por la activación de células T autorreactivas. Las Treg previenen enfermedades autoinmunes específicas de órganos, incluyendo la tiroiditis autoinmune, la gastritis autoinmune, la insulinitis y la artritis.

Más recientemente, se descubrió que las células T reguladoras expresan un factor de transcripción conocido como Foxp3 intracelular. La ausencia del factor de transcripción llamado escurfina (también caja cabeza de tenedor P3) y codificado por el gene *Foxp3* se sabe que causa una enfermedad linfoproliferativa con desenlace fatal rápido, similar a la observada en ratones que carecen de antígeno 4 asociado a linfocitos T citolíticos (CTLA-4). Khattri R y colaboradores (Nat Immunol. 2003; 4: 337-42) mostró que Foxp3 fue altamente expresado por las células Treg y se asoció con su actividad y fenotipo. Los ratones deficientes en Foxp3 carecían de células Treg mientras que los ratones que sobreexpresan Foxp3 poseen más células Treg. Las Treg constitutivamente expresan el factor de transcripción Foxp3 y la molécula coestimuladora inhibitoria CTLA-4 (Chen W y colaboradores, J Exp Med 1998; 188: 1849-1857).

Se cree que Foxp3 actúa a través de la regulación transcripcional negativa de genes de citoquinas, incluyendo IL2, IL4 e IFN- $\gamma$  (Kasprowicz DJ y colaboradores, J Immunol 2003; 171: 1216-1223, 2003), aunque muchos aspectos de la actividad de Foxp3 y regulación de su expresión siguen siendo oscuros.

Loser K y colaboradores, Gene Ther, 2005; 12: 1294-304, generaron Treg *in vitro* mediante infección de células T CD4+CD25- no activadas con un retrovirus que codifica Foxp3. Las células T infectadas con Foxp3 eran similares a las células Treg de origen natural como se evidencia por la expresión y función de un marcador de superficie. Estos autores investigaron los efectos de las células T infectadas con Foxp3 sobre las respuestas de hipersensibilidad de contacto mediadas por células T efectoras mediante la inyección en ratones sensibilizados de células T infectadas con un virus de control o con Foxp3. Sólo la inyección de células T infectadas con Foxp3 inhibió significativamente CHS en comparación con los controles, lo que indica que las células T infectadas con Foxp3 son supresoras *in vivo*. Los autores usaron por lo tanto células T infectadas con Foxp3 para el tratamiento de ratones transgénicos (Tg) CD40L propensos a autoinmunidad (Tg), que desarrollan una enfermedad autoinmune sistémica grave, incluyendo células T y autoanticuerpos autorreactivos. La inyección de células T infectadas con Foxp3 en estos ratones inhibió el desarrollo en curso de dermatitis autoinmune y la activación de células T CD8+ citotóxicas. Este tratamiento también redujo las concentraciones en suero de anticuerpos antinucleares, que estuvo acompañado con una reducción de las deposiciones de inmunoglobulina renal y aumento de la función renal. Los autores concluyeron que las células T reguladoras

recientemente generadas *in vitro* se pueden utilizar para tratar exitosamente trastornos autoinmunes inflamatorios y en curso.

5 Suri-Pagador E y Fritzsching B (Springer Semin Immunopathol. 2006; 28: 3-16) resumieron recientemente evidencia del papel de Treg en la supresión de las respuestas inmunes innata y adaptativa en modelos experimentales de autoinmunidad incluyendo artritis, colitis, diabetes, encefalomielite autoinmune, lupus, gastritis, ooforitis, prostatitis, y tiroiditis. Una observación común a partir de tales estudios es que las Treg se activan de una manera específica por el antígeno, pero ejercen su función de supresión de una forma independiente del antígeno, principalmente mediante la producción y secreción de citoquinas supresoras, tales como IL-10 y TGF- $\beta$ . Las Treg pueden suprimir células T "convencionales" *in vitro* por contacto celular directo. Se apreciará, sin embargo, que la subregulación de la función celular de presentación de antígenos (APC), tal como aquella de las células dendríticas, y la atenuación de la secreción de citoquinas inhibitorias, tales como IL-10 y TGF- $\beta$  podría ser importante para la función de las Treg *in vivo*. El resultado final de la autoinmunidad versus la tolerancia depende del equilibrio entre las señales estimuladoras con respecto a las células T efectoras y las señales inhibitorias de Treg. Mientras que los estudios anteriores analizaron la capacidad de las Treg para prevenir la aparición de la enfermedad autoinmune, los informes más recientes indican el tratamiento exitoso de la enfermedad en curso.

*In vivo*, la transferencia adoptiva de las Treg logró los siguientes efectos:

- (1) desarrollo de autoinmunidad suprimida;
- (2) rechazo agudo de órganos sólidos trasplantados suprimido; y
- (3) inmunidad antitumoral suprimida,

20 Una revisión de Sakaguchi S y colaboradores, Immunol Rev., 2006; 212: 8-27, observaron que el surgimiento de forma natural de células Treg CD25+CD4+ desempeña un papel clave en el mantenimiento de autotolerancia inmunológica y control negativo de una variedad de respuestas inmunes fisiológicas y patológicas. La mayoría de estas células son producidas por el timo normal como una subpoblación de células T funcionalmente maduras. Las Treg naturales expresan específicamente Foxp3, un factor de transcripción que juega un papel fundamental en su desarrollo y función. El agotamiento completo de Treg naturales que expresan Foxp3 (ya sean CD25+ o CD25-) activó incluso clones de células T efectoras autorreactivas débiles o poco comunes, induciendo enfermedades inflamatorias/autoinmunes severas y generalizadas. Las Treg naturales son altamente dependientes de la interleuquina (IL)-2 proporcionada de forma exógena para su supervivencia en la periferia. Además de Foxp3 e IL-2/receptor de IL-2, una deficiencia o alteración funcional de otras moléculas (expresado por células T o no por células T), pueden afectar el desarrollo o la función de las Treg, de las células T efectoras autorreactivas, o de ambas, y en consecuencia inclinar la balanza entre las dos poblaciones en la periferia hacia la autoinmunidad. Por lo tanto, las Treg suprimen la actividad de las células T efectoras que son una causa principal de trastornos inflamatorios autoinmunes específicas del antígeno. Las Treg inducen anergia y promueven la supresión por un proceso que implica tanto contacto célula-célula, y probablemente más importante aún, por su secreción de TGF- $\beta$  y IL-10.

35 Sakaguchi y colaboradores, citado más arriba, establecieron que la elucidación de las bases moleculares y celulares de mantenimiento activo mediado por Treg de la autotolerancia facilitará (1) nuestra comprensión de la patogénesis de la enfermedad autoinmune y (2) el desarrollo de nuevos métodos de prevención y tratamiento de enfermedades autoinmunes.

40 La presente invención está dirigida a uno de tales enfoques novedosos para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias/inmunológicas relacionadas mediante la imposición del control mediado por Treg sobre las células T efectoras.

Diseño de receptores quiméricos con la especificidad de anticuerpo en células T

45 Los esfuerzos para conferir especificidad similar a anticuerpo a los linfocitos T surgieron como respuesta a ciertos descubrimientos básicos y fallaron en convertirlos en un éxito terapéutico. Los antígenos asociados a tumores humanos se ha demostrado que existen como péptidos asociados con proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La falta de éxito en la vacunación de pacientes con tumores con una gran variedad de vacunas de antígenos asociados a tumores era por lo tanto frustrante (Rosenberg SA y colaboradores, Nat Med 2004; 10: 909-15). La vacunación pasiva con anticuerpos antitumorales (Abs), linfocitos que infiltran un tumor (TIL), o células asesinas activadas por linfoquinas (LAK) mostraron una eficacia muy limitada (principalmente para tumores vasculares). Los éxitos más recientes con la transferencia adoptiva de TIL en pacientes con melanoma en etapa IV (Dudley ME, y colaboradores, J Immunother 2001; 24: 363-73; Dudley ME, y colaboradores, Science 2002; 298: 850-4) aún tenían un inconveniente por el hecho de que los resultados se limitaban a unos pocos tipos de cáncer y a individuos de los que es posible derivar TIL específicos.

Para superar tales limitaciones en la inmunoterapia celular adoptiva de cáncer, y con el fin de desarrollar un enfoque que no se restrinja a pacientes individuales o se limite a una forma específica de cáncer, uno de los presentes inventores y sus colegas desarrollaron el enfoque del "cuerpo T" (Gross G y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 10024-8; Gross G y Eshhar, Z, FASEB J 1992; 6: 3370-8). Véanse también las siguientes publicaciones de patentes de Eshhar y sus colegas, todas las cuales se incorporan por referencia en su totalidad: la publicación de la patente estadounidense No. 2002-0137697, la patente estadounidense No. 5.912.172, la patente estadounidense No. 5.906.936, las publicaciones internacionales de patente WO 00/31239, WO 97/15669, WO 95/14710 y WO 93/19163. En estos enfoques, se elaboró un receptor quimérico (CR), por ejemplo, mediante la fusión de la porción variable de un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal antitumoral (mAb), a un dominio de activación intracelular de linfocitos, a fin de ser expresado por las células T en las que se ha transfectado el gen como el dominio extracelular de esa molécula que activa las células T. Tras la expresión de dichos genes CR en células efectoras inmunes (células T y células asesinas naturales (NK)), las células modificadas resultantes (apodadas "cuerpos T") reconocen sus objetivos tumorales y eficientemente los matan. Por lo tanto, el receptor inmune quimérico confiere especificidad antigénica redirigida acoplada para dirigir la activación independiente de MHC de la activación celular en respuesta a la unión de un antígeno objetivo predefinido.

En un principio, la configuración del CR heterodimérico compuesta de las dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de células T (TCR) en la que cada par de dominios variables de TCR ( $V_\alpha$  y  $V_\beta$ ) fue reemplazado con un par de dominios  $V_H$  y  $V_L$  derivados de un anticuerpo seleccionado. Estas dos secuencias de codificación derivadas de Ab fueron cotransfectadas en líneas de células T y se encontró que confieren la especificidad del anticuerpo (Gross y colaboradores, 1989, citado más arriba). Por lo tanto, las células T podrían ser activadas para la función efectora tal como la destrucción de células o la actividad citotóxica frente a un blanco inmunológicamente específico de una manera que fuera independiente de MHC (y de esta manera no restringida) (Gross y colaboradores, 1992, citado más arriba).

En CR de "segunda generación", la configuración de una sola cadena del CR fue manipulada adicionalmente para obtener una configuración que sería útil sobre todo para terapia contra el cáncer o antiviral. Aquí, se ligó un Fv de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo a los dominios transmembrana y citoplasmáticos de fracciones que activan linfocitos tales como la cadena  $\zeta$  asociada al complejo TCR/CD3, o la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc (Eshhar Z y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 720-4). Esta configuración de cadena única, que combina el reconocimiento de anticuerpos y la señalización de las células T en una sola proteína continua, era una estructura modular con dominios funcionales que son fáciles de manipular, y puede expresarse fácilmente en linfocitos humanos usando vectores basados en retrovirus (Eshhar Z y colaboradores, J. Imm Meth 2001; 248: 67-76). Otros de estos receptores diseñados por algunos de los presentes inventores y colegas, y que se discuten en mayor detalle más adelante, se denominan receptores quiméricos como tripartitos (TpCR) que también incluyen un dominio(s) coestimulador(es) (por ejemplo, CD28, 4-1BB).

Con el tiempo, se ha sabido que el redireccionamiento de la especificidad de las células T efectoras usando CR de una sola cadena se ha convertido en una opción terapéutica válida para el cáncer. Muchos investigadores han adaptado este enfoque de "cuerpo T" para dotar a las células T con diferentes especificidades y funciones (Gross y Eshhar, citado más arriba; Willemsen RA y colaboradores, Hum Immunol 2003; 64: 56-68; Baxevanis CN y colaboradores, Cancer Immunol Immunother 2004; 53: 893-903). Para una revisión reciente, véase: Eshhar, Z. "The T-Body Approach: Redirecting T Cells with Antibody Specificity", en Therapeutic Antibodies. Handbook of Experimental Pharmacology 181, Chernajovsky y Nissim (eds.), Springer-Verlag, 2008, páginas 329-342.

En la presente invención, los inventores han concebido usos expandidos de tales CR para el tratamiento de condiciones inflamatorias/inmunológicas no deseadas tales como enfermedades autoinmunes (con un énfasis inicial particular sobre la enfermedad inflamatoria del intestino, IBD) y el rechazo de injertos.

#### Enfermedades inflamatorias crónicas y modelos animales

Las condiciones inflamatorias, particularmente enfermedades inflamatorias crónicas, son de particular importancia en la medicina clínica. Estas enfermedades, causadas por acciones del sistema inmune, implican la activación inadecuada o excesiva de ciertas células T, la expresión de citoquinas reguladoras y quimiocinas, la pérdida de la tolerancia inmune, y similares. Ejemplos de enfermedades inflamatorias autoinmunes y/o crónicas son la esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), enfermedades de las articulaciones tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. Algunas de estas enfermedades son más bien específicas de órganos/tejidos como sigue: del intestino (enfermedad de Crohn), de la piel (psoriasis), de los nervios mielinizados (esclerosis múltiple o MS), de los islotes pancreáticos o células  $\beta$  (diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) o diabetes de tipo I), de las glándulas salivales (enfermedad de Sjogren), del músculo esquelético (miastenia grave), de la tiroides (tiroiditis de Hashimoto; enfermedad de Graves), de la cámara anterior del ojo (uveítis), de tejido de las articulaciones (artritis reumatoide), y diversas enfermedades cardiovasculares.

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es un término colectivo utilizado para describir dos trastornos intestinales cuya etiología no se entiende por completo: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La IBD se produce en todo el mundo y afecta a varios millones de personas (0,3% de la población de los países occidentales), y su incidencia va en

aumento (Tsironi E, y colaboradores, Am J Gastroenterol. 2004; 99: 1749-1755). El curso y pronóstico de la IBD es muy variable. El inicio de la IBD es predominante en la edad adulta y generalmente se presenta con diarrea, dolor abdominal y fiebre; anemia y pérdida de peso son también signos comunes. Entre el 10% y el 15% de las personas con IBD requieren cirugía durante un período de diez años. Los pacientes con IBD también tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer intestinal. Estas enfermedades están acompañadas de una alta frecuencia de síntomas psicológicos, como la ansiedad y la depresión.

Aunque la patogénesis de este trastorno común mediado por células T sigue siendo incierto, se cree que resulta de la pérdida de tolerancia en el sistema inmunitario intestinal debido a la presencia de la estimulación antigénica constante proporcionada por el gran número de bacterias residentes (Podolsky DK, N Engl J Med 2002; 347: 417-29). Por desgracia, las nuevas terapias para la IBD son pocas, y tanto el diagnóstico como el tratamiento se han visto obstaculizados por la falta de un conocimiento detallado de la etiología. Una combinación de factores genéticos, desencadenantes exógenos y microflora endógena puede contribuir al daño mediado por el sistema inmune de la mucosa intestinal. Las bacterias han sido implicadas en el inicio y el avance de la enfermedad de Crohn ya que la inflamación intestinal responde con frecuencia a los antibióticos. Los colonizadores intestinales comunes y patógenos novedosos han sido implicados, ya sea por detección directa o por respuestas inmunes antimicrobianas asociadas con la enfermedad. En muchos modelos animales genéticamente susceptibles de colitis crónica, los microorganismos lumbinales parecen ser un cofactor necesario para la enfermedad.

La etapa de iniciación en la patología de las enfermedades autoinmunes es a menudo oscura en los seres humanos, donde las enfermedades son en gran medida esporádicas, y los síntomas pueden aparecer años después de la activación de la primera célula T patógena. Por lo tanto, ha sido difícil diseñar terapias eficaces para bloquear la inducción de la enfermedad. En contraste, existen características comunes en muchas de las etapas posteriores de estas enfermedades. La inflamación en el sitio de la enfermedad/órgano objetivo está presente típicamente, causada por la liberación de citoquinas inflamatorias, también denominadas "proinflamatorias" (por ejemplo, TNF- $\alpha$  e interferones) por las células T y por otras células que contribuyen a las etapas de activación y rutas efectoras de los procesos inmunes/inflamatorios. Estas células incluyen (entre otros) macrófagos, células dendríticas y sus precursores, linfocitos B y células plasmáticas y células NK (incluyendo las células NKT). Estas reacciones a menudo implican la destrucción de las células "objetivo" y daño tisular.

Los estudios que usan modelos murinos de inflamación crónica experimental están ayudando a definir la naturaleza de la desregulación inmunológica que inicia la inflamación y conduce a la destrucción de órganos terminales específicos, así como para las terapias de prueba. Véase, por ejemplo, Mombaerts y colaboradores. Cell, 1993; 75: 274-82; Tarrant y colaboradores, 2998; J Immunol, 161: 122-7; Powrie y colaboradores, Immunity, 1994; 1: 553-62; Hong y colaboradores, J Immunol, 1999; 162: 7480-91; Horak, Clin Immunol Immunopathol, 1995, 76 (3 Pt 2): S172-173; Ehrhardt y colaboradores. J Immunol, 1997; 158: 566-73; Davidson y colaboradores, J Immunol, 1998; 161: 3143-9; Kuhn y colaboradores. Cell, 1993, 75: 263-74; Neurath y colaboradores, J Exp Med, 1995. 182: 1281-1290. W. Strober, 2002; Annu. Rev. Immunol. 20: 495-54 revisan modelos de inflamación de la mucosa, y se incorporan por referencia en su totalidad. Un sello distintivo de los mejores de estos modelos es que la histopatología y la fisiopatología se asemejan a la de las condiciones humanas paralelas, mejorando aún más la utilidad de los modelos en la prueba de nuevas estrategias de tratamiento. En el caso de la IBD este desarrollo no ha sido uniforme. El mayor énfasis ha puesto en la modulación de los mecanismos inmunes (Blumberg RS y colaboradores, Curr Opin Immunol. 1999; 11: 648-56; Strober y colaboradores, citado más arriba) y recientemente de la flora entérica (Sartor RB, Curr Opin Gastroenterol. 2001; 4: 324-330).

Bhan AK y colaboradores, 1999 Immunol Rev. 169: 195-207 revisaron estudios de la colitis en modelos animales transgénicos (Tg) y con genes desactivados (KO) para la inflamación de la mucosa en la IBD. La genética y el medio ambiente, en particular la flora entérica normal, fueron factores en el desarrollo de la inflamación de la mucosa, como se ha indicado anteriormente. La homeostasis normal de la mucosa fue interrumpida por un desequilibrio de citoquinas, la aniquilación de la tolerancia oral, la ruptura de las barreras epiteliales, y la pérdida de células inmunorreguladoras. Algunas, pero no todas las inmunodeficiencias, en el valor adecuado, condujeron a la colitis. Las células T efectoras CD4+ han sido identificadas como los linfocitos patógenos en la colitis, y pueden mediar la inflamación ya sea por la ruta Th1 o la Th2. La ruta Th1 domina en la mayoría de los modelos de colitis (y la enfermedad de Crohn humana). Por el contrario, en la colitis observada en ratones, los ratones con genes desactivados en la cadena  $\alpha$  del receptor de células T (TCR) los ratones (ratones KO TCR $\alpha$ ) comparten muchas características de la colitis ulcerosa, incluyendo la dominancia de la ruta Th2 en la inflamación del colon. Tales modelos son importantes para el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la IBD. En una revisión posterior, el mismo grupo (Mizoguchi A y colaboradores, 2003, Inflamm Bowel Dis. 9: 246-259) observó que las respuestas inmunes exageradas a microflora entérica normal están implicadas en la iniciación y perpetuación de la inflamación intestinal crónica. Una vía importante implica el desarrollo de respuestas inmunes "adquiridas" por las interacciones de las células T CD4+ TCR $\alpha\beta$ + con células presentadoras de antígeno (APC), en particular células dendríticas. Las células Treg CD4+CD25+ atenuadas activan respuestas de células T.

El avance de la fase aguda a la fase crónica de la IBD no ha sido bien caracterizado en modelos animales y no puede ser evaluado fácilmente en los pacientes. Spencer DM y colaboradores. Gastroenterol. 2002; 122: 94-105 reportó

cambios en la respuesta inmune de la mucosa con el tiempo en la colitis experimental. La severidad de la colitis, la masa corporal, la consistencia de las heces y el contenido de sangre, de amiloide A en suero, y la histología del tejido fueron examinados en ratones deficientes en interleuquina 10 (IL-10) durante 35 semanas. Se midió la correspondiente producción de IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4 e IL-13 por las células mononucleares de la lámina propia en el intestino inflamado. La administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL-12 neutralizante (mAb) en momentos distintos durante el avance de la enfermedad permite la evaluación del potencial terapéutico de este agente. Las células mononucleares de la lámina propia de los ratones con enfermedad temprana sintetizan progresivamente más IL-12 e IFN $\gamma$ , mientras que la producción de ambas citoquinas se redujo drásticamente y regresó a los niveles previos a la enfermedad en la fase tardía. De forma consistente con este patrón, la neutralización de anti-IL-12 invirtió tempranamente, la enfermedad, y no en forma tardía. Por el contrario, la producción de IL-4 e IL-13 aumentó progresivamente desde la fase temprana a la tardía de la enfermedad. Se concluyó que la colitis en desarrollo en los ratones deficientes en IL-10 evoluciona en dos fases distintas. IL-12 desempeña un papel fundamental en la colitis temprana, mientras que otros mecanismos inmunes, presumiblemente mediados por IL-4 e IL-13, predominan en la enfermedad tardía para mantener la inflamación crónica.

#### IL-10 y la enfermedad inflamatoria crónica

Se ha sabido desde hace algunos años que IL-10 afecta el crecimiento y diferenciación de muchos tipos de células hematopoyéticas *in vitro* y es un supresor particularmente potente de funciones de los macrófagos y de las células T. Estas observaciones se basaron en parte del uso de ratones mutantes deficientes en IL-10 (con genes desactivados, KO) mediante modificación de un gen por recombinación homóloga (Kuhn R y colaboradores, Cell 1993; 75: 263-74). En estos ratones, el desarrollo de linfocitos y las respuestas de anticuerpos son normales, pero la mayoría de los animales presentan crecimiento retardado, anémicos y sufren de enterocolitis crónica. Las alteraciones en el intestino incluyen extensa hiperplasia de la mucosa, inflamación, y expresión epitelial aberrante de las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Por el contrario, los mutantes KO de IL-10 mantenidos bajo condiciones específicas libres de patógenos, desarrollan únicamente una inflamación localizada (limitada al colon proximal). Se concluyó que (1) la inflamación intestinal en estos mutantes originada a partir de respuestas inmunes no controladas estimuladas por antígenos entéricos y (2) la IL-10 es un regulador esencial (negativo) en el tracto intestinal.

En un estudio de validación de este modelo de ratón KO de IL-10 de colitis, T. Scheinin, T y colaboradores. (Clin Exp Immunol 2003; 133: 38-43) se enfatizó que un modelo animal valioso debe responder a la terapia existente de una forma que se asemeje a la respuesta de la enfermedad humana. Puesto que la enfermedad refractaria de Crohn respondió bien a la terapia con anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , los investigadores examinaron las respuestas de los ratones KO de IL-10 a la terapia anti-TNF $\alpha$ , utilizando un nuevo sistema de puntuación similar al "Índice de actividad" de la enfermedad de Crohn en los seres humanos. Se analizaron las muestras de heces por la presencia de citoquinas y se compararon los resultados con la histología. Los resultados mostraron que la terapia con anticuerpos anti-TNF a partir de las 4 semanas mejoró marcadamente la enfermedad (como se juzga por la puntuación clínica o por la histología del intestino). Se observó una disminución marcada de las citoquinas inflamatorias en las muestras de heces, añadiendo una medida más precisa de mejoría clínica. Los autores concluyeron que este modelo es útil para evaluar otras modalidades terapéuticas de relevancia para la enfermedad de Crohn.

#### Células Treg y la enfermedad inflamatoria del intestino

Uno de los modelos animales comúnmente utilizados de IBD implica la transferencia adoptiva de células T CD45RB<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> en ratones SCID, lo que conduce al desarrollo de infiltrados masivos de células mononucleares de colon, hiperplasia de las células epiteliales y ulceración (Thornton AM, y colaboradores, J Immunol 2000; 164 (1): 183-90). La transferencia conjunta de un gran número de las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> impidió el desarrollo de colitis o colitis establecida curada, un efecto que requiere la señalización a través de CTLA-4 (Read S, y colaboradores, JExp Med 2000; 192: 295-302; 2000; Morrissey PJ, y colaboradores, JExp Med 1993; 178: 237-44). Incluso después del desarrollo de colitis mediada inmunológicamente, la transferencia adoptiva de 10<sup>6</sup> células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> causó una mejora significativa de la inflamación intestinal (Fantini MC y colaboradores, Gut 2006; 55: 671-80; Mottet C, y colaboradores, J Immunol 2003; 170 (8): 3939-43; Uraushihara K, y colaboradores, J Immunol 2003; 171: 708-16).

En los seres humanos que sufren de IBD, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras periféricas retienen la actividad supresora. Sin embargo, en contraste con otros trastornos inflamatorios intestinales, el número de estas células reguladoras disminuye en la sangre periférica durante la inflamación activa y sólo aumenta ligeramente en las lesiones intestinales (Mutilar J, y colaboradores, Gastroenterology 2005; 128 (7): 1868-1878). Esta aberración sugiere que los defectos de búsqueda de Treg, así como la activación desregulada *in situ* contribuyen a la patogénesis de IBD.

Por tanto, existe una necesidad reconocida en la técnica para encontrar modalidades para suprimir reacciones autoinmunes/inflamatorias y enfermedades, incluyendo pero no limitado a IBD, así como para suprimir el rechazo de injertos de órganos y tejidos y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVH). La presente invención proporciona un nuevo enfoque, aquel de redirigir las células Treg, como un medio para reclutar células T reguladoras a los sitios de inflamación, y activarlas para suprimir tales reacciones inmunes/inflamatorias y proteger contra, aliviar e incluso curar tales enfermedades como la IBD.

## Resumen de la invención

- 5 La presente invención se basa en la concepción de los inventores de que la redirección mediada por CR y la activación de las células Treg a los sitios de la inflamación resulta en la supresión de las condiciones inflamatorias, comúnmente parte de la enfermedad autoinmune específica del órgano y se ejemplifica en el presente documento como la inflamación en el colon en la IBD experimental. Los inventores han concebido adicionalmente usar estas células para superar el rechazo de las células y tejidos no coincidentes por células T efectoras que surgen en los receptores de trasplantes o para inhibir la acción patógena de las células inmunocompetentes trasplantadas en el caso de la enfermedad GVH.
- 10 La invención se basa en el enfoque innovador del cuerpo T de los inventores que hasta el momento ha demostrado ser útil para la inmunoterapia del cáncer (y se encuentra actualmente en fase I/II de ensayos clínicos). La invención proporciona un nuevo enfoque para la explotación de las células Treg para la mejora de las respuestas inmunes patológicas y no deseadas, en particular la inmunoterapia de condiciones autoinmunes e inflamatorias, incluyendo diversas enfermedades autoinmunes predominante de órganos, y otras respuestas inmunes patológicas o indeseables, tales como rechazo de injerto y enfermedad de rechazo versus huésped.
- 15 De acuerdo con la presente invención, las células Treg están dotadas con CR que son específicos para un antígeno o ligando objetivo seleccionado. Tal modificación causa la activación de Treg redirigidas a sitios de inflamación para suprimir las respuestas inmunitarias proinflamatorias de tipo efector. Con base en los resultados de los presentes inventores ('y sus colegas') con el redireccionamiento de los linfocitos efectores antitumorales, se espera que las Treg, dotadas de especificidad predefinida, migrarán/volverán y se acumulan en un sitio objetivo, tal como el colon inflamado, donde suprimirán las células T efectoras que median en la enfermedad. Para evitar la necesidad de la migración o vuelta al sitio de destino, las Treg pueden, cuando sea posible, ser administradas directamente en o a tal sitio, donde volverán a activarse y suprimir las células T efectoras que median en la enfermedad.
- 20 Tales células Treg redirigidas, también conocidas como "cuerpos T" son células Treg que han sido manipuladas genéticamente para expresar un receptor quimérico tripartita (TpCR) que está elaborado con una unidad de reconocimiento extracelular de una sola cadena, una región transmembrana, y una región de señalización intracelular.
- 25 La región de reconocimiento extracelular es específico para un antígeno o ligando objetivo seleccionado y puede ser preferiblemente una región variable de anticuerpo de cadena única (scFv) u otro ligando que sea capaz de unirse al antígeno o ligando objetivo. La región extracelular de reconocimiento no comprende un dominio extracelular de proteína del MHC, y dicha región se une al antígeno o ligando objetivo de una forma no restringida al MHC o de una forma no dependiente del MHC. Las Treg redirigidas de la presente invención se denominan a veces en esta memoria como "cuerpos T" a pesar del hecho de que la región extracelular de reconocimiento no es necesariamente un dominio de anticuerpo. Por lo tanto, este término no está destinado a estar limitado a células T reguladoras con especificidad similar a un anticuerpo, pero también incluye células T reguladoras con especificidad similar a la del ligando-receptor de otro modo.
- 30 Una región espaciadora flexible puede estar presente entre la región de reconocimiento extracelular y la región transmembrana. Tal espaciador flexible es preferiblemente una bisagra similar al de la inmunoglobulina (Ig), tal como cualquier región bisagra derivada de la superfamilia de Ig.
- 35 La región intracelular incluye una combinación de fracciones de polipéptidos de señalización de las células T, fusionadas en tándem, donde la combinación de fracciones, tras la unión de la región de reconocimiento extracelular al antígeno o ligando objetivo seleccionado, desencadena la activación de las células Treg para provocar la supresión de la inmunidad mediada por células T. Las fracciones de señalización de células T incluyen, preferiblemente, uno o más dominios citoplasmáticos de una molécula coestimuladora (por ejemplo, CD28) y un dominio estimulador de células T citoplasmáticas, por ejemplo, de FcRγ o una cadena CD3-ζ. Las células Treg redireccionadas se activan específicamente, tras la unión de la región de reconocimiento extracelular del CR a su antígeno o ligando objetivo, de una forma que está, preferiblemente, (1) no restringida por, o que depende de, la unión del antígeno o ligando objetivo a un MHC, ni tampoco es dependiente de cualquier forma del haplotipo del MHC (HL-A) del receptor y (2) independiente de acoplamiento del (de los) ligando(s) coestimulador(es) en una célula objetivo.
- 40 Una enfermedad preferida objetivo de esta invención es una IBD como la colitis ulcerosa, en donde los presentes métodos, tal como se utiliza con éxito en un modelo animal, permitirán que las células Treg lleguen a las lesiones intestinales en pacientes con IBD y se activen de manera eficiente en el sitio de la inflamación. La presente invención resulta en la acumulación de Treg específicas del sitio, dando lugar, en última instancia, a la activación específica del antígeno mediada por CR, que resulta en la producción de citoquinas supresoras que a su vez suprimen células T efectoras autoinmunes en una forma no específica del antígeno, lo que lleva al alivio de los síntomas y por lo tanto al tratamiento de la enfermedad.
- 45 El enfoque terapéutico actual tiene varias ventajas únicas. En contraste con otros modelos inmunoterapéuticos,
- 55

involucra cuerpos T redirigidos con un TpCR, que combina el reconocimiento del anticuerpo/antígeno o ligando/receptor con motivos estimulantes y coestimuladores. Por lo tanto, cuerpos T pueden ser totalmente activados de una forma que no está restringida por el MHC y es independiente de un requisito para coestimulación. La segunda ventaja de la presente invención se deriva del hecho de que, aunque la activación de Treg es dependiente de antígeno, la acción supresora de estas células es de independiente del antígeno, de TCR y de MHC. Mediante la explotación de esta propiedad, se puede construir un receptor quimérico que es específico para uno o más antígenos asociados a los tejidos en lugar de requerir especificidad para un número desconocido de antígenos específicos de la enfermedad autoinmune aún no definidos. La expresión de tales receptores quiméricos en Treg redirige estas células y su activación al tejido objetivo adecuado (en una realización preferida, el colon), de modo que se activan de una forma específica del antígeno, donde sus efectos supresores potentes tienen lugar sin la necesidad de un reconocimiento adicional de los antígenos asociados con las enfermedades (el "efecto de espectador"). Mediante el uso de Treg activadas específicamente, se requieren muchas menos células para tratar condiciones inflamatorias autoinmunes; tal como la IBD, o reacciones asociadas a aloinjertos en pacientes en los que hubiera sido posible antes de esta invención, cuando se habrían necesitado un número mucho mayor de células T reguladoras no específicas.

Los presentes inventores han construido cepas de ratones transgénicos (Tg) cuyas células T y células asesinas naturales (NK) expresan un TpCR específico del antígeno. Como ejemplo de la invención, los inventores seleccionaron el hapteno trinitrofenilo (TNP) como el objetivo específico de los TpCR. Las Treg específicas de TNP aisladas de estos ratones Tg reprimieron las células T efectoras específicas de TNP *in vitro* e *in vivo* y fueron capaces de suprimir la colitis inducida por el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratones. En esta realización, el antígeno objetivo para Treg y el antígeno patógeno - el hapteno TNP - son los mismos. En otro ejemplo, las células T reguladoras específicas para TNP reprimieron la colitis inducida por oxazolona en ratones en los que se introdujo una dosis baja de TNP en el colon, junto con la exposición a la oxazolona. Sin embargo, las células T reguladoras específicas de TNP no tuvieron ningún efecto en la colitis inducida por oxazolona en ausencia de la introducción de TNP. Esto establece el efecto de "espectador" de la presente invención, es decir, que el antígeno objetivo no necesita ser el antígeno patógeno, siempre que las células T reguladoras redirigidas se activen en las proximidades de la respuesta inmune patogénica o no deseada.

Una ventaja distinta de la presente invención es que proporciona células y métodos que permiten activación específica del antígeno y acción no específica del antígeno de las células Treg utilizadas para suprimir las respuestas de células T efectoras (y tratar las consiguientes patologías) en una forma que no requiere la identidad entre el ligando (por ejemplo, el antígeno) reconocido por el TpCR (por ejemplo, por su porción de reconocimiento del objetivo) y el ligando/antígeno que juega un papel patogénico en el proceso de la enfermedad. De este modo, el antígeno que es patógeno no tiene que ser reconocido por las células T efectoras que son suprimidas, y, de hecho, pueden no estar relacionadas con la enfermedad o condición que está siendo tratada. Por lo tanto, la invención aprovecha el efecto de "espectador". Siempre y cuando la Treg esté en la vecindad correcta donde se encuentran las células T efectoras y mediante sus efectos no deseados, las Treg redirigidas de la presente invención pueden ser desencadenadas o activadas en ese lugar para la liberación de citoquinas supresoras (por ejemplo, IL-10 y TGF- $\beta$ ), lo que resultará en la supresión de cualquiera de las células T efectoras "espectador", y por este mecanismo, suprimir una respuesta inflamatoria /autoinmune en curso.

Las características únicas del sistema Tg utilizado en los presentes ejemplos permite la evaluación del efecto supresor de células T reguladoras específicas del antígeno en la IBD tanto *in vivo* como *in vitro*. Se usan diferentes medios para inducir células T reguladoras, lo que permite a los expertos en la técnica seleccionar el método óptimo para la generación de cantidades eficientes de Treg redirigidas específicas del antígeno para un antígeno o una enfermedad/condición deseada. De acuerdo con esta invención, las Treg humanas redirigidas constituyen una modalidad terapéutica eficaz basada en células para IBD o colitis ulcerosa y, en forma más general, para cualquier enfermedad o condición mediada por células T efectoras.

Para superar la escasez de células T reguladoras específicas del antígeno, la presente invención incluye métodos para inducir estas células utilizando citoquinas (por ejemplo, TGF- $\beta$ ) o mediante la expresión de transgenes (por ejemplo, que codifican el factor de transcripción Foxp3) que, junto con el TpCR, permitirá la expansión de Treg específicas del antígeno.

De acuerdo con la presente invención, las células Treg humanas, derivadas ya sea del sujeto con la enfermedad o condición inflamatoria/autoinmune a tratar, o de un donante sano con HLA compatibles (o una célula universal que no es reconocida por el sistema inmune del receptor), están dotadas con especificidad de antígeno/ligando, mediante transducción con el TpCR específico del antígeno/ligando como se describe en el presente documento. Alternativamente, las células que están dotadas con especificidad de antígeno son toda la población de células T y el constructo de ácido nucleico que incluye la secuencia que codifica el TpCR incluye además un transgén Foxp3 que está presente como un cistron transcrito de forma independiente. En otro ejemplo alternativo, se transfecta por separado un transgén Foxp3 en la población de células T, para convertir las células T en células Treg. Los ejemplos suministrados a continuación incluyen estudios usando colonoscopia murina, imagenología *in vivo* e inmunofluorescencia, y proporcionar las bases para una nueva modalidad terapéutica basada en células para la IBD, y, por extensión, para otras respuestas inmunes patológicas y no deseadas mediadas por células T efectoras específicas del antígeno.

Se describen más específicamente a continuación diversas formas de realización de la invención.

- La presente invención está dirigida a una población de linfocitos T reguladores redirigidos (células Treg) dotados de especificidad hacia un antígeno o ligando objetivo seleccionado, donde las células comprenden cada una, una molécula quimérica de ácido nucleico que codifica un polipéptido receptor quimérico (CR) que comprende, expresado en una sola cadena continua, una región de reconocimiento extracelular, una región transmembrana y una región de señalización intracelular, y se expresa en la célula Treg con el fin de desplegar la región extracelular en la superficie celular, en donde
- 5 (a) la región de reconocimiento extracelular del receptor quimérico es específica para el antígeno o ligando objetivo seleccionado, y no comprende un dominio extracelular de proteína MHC, y dicha región se une al antígeno o ligando objetivo de una forma no restringida de MHC o de una forma que no depende del MHC; y
- 10 (b) la región intracelular comprende una combinación de fracciones de polipéptidos de señalización de células T cuya combinación de fracciones, tras la unión de la región de reconocimiento extracelular al antígeno o ligando objetivo seleccionado, desencadena la activación de las células Treg para causar la represión de la inmunidad mediada por las células T.
- 15 En formas de realización preferidas de la presente invención, la región de reconocimiento extracelular es un dominio de scFv derivado de anticuerpo que es específico para un antígeno seleccionado. En otra realización preferida, la región de reconocimiento extracelular es un miembro de un par ligando-receptor, que es específico para el otro miembro de ese par.
- Preferiblemente, la región de reconocimiento extracelular está enlazada a la región transmembrana a través de un espaciador flexible, que, más preferiblemente, es una bisagra de una molécula de la familia de las inmunoglobulinas.
- 20 La región de señalización intracelular incluye preferiblemente una fracción de señalización de una cadena de un receptor de células T específicas del antígeno, que más preferiblemente es una que tiene una región de polipéptido que comprende un motivo de activación basado en la tirosina del inmunorreceptor (ITAM). Los ejemplos no limitantes de receptores de células T específicas del antígeno son cadenas del complejo TCR/CD3, una cadena TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$ , y la cadena  $\gamma$  de un receptor del Fc de Ig (FcR $\gamma$ ). La cadena de un receptor de células T específicas del antígeno es preferiblemente la cadena CD3/ $\zeta$  o una subunidad FcR $\gamma$ .
- 25 La región de señalización intracelular incluye además preferiblemente una fracción de señalización de una proteína coestimuladora-receptora de una célula T. La proteína coestimuladora-receptora se selecciona preferiblemente de CD28, OX40, CD40L (gp39), el 4-1BB y PD-1 (o preferiblemente, la forma humana u homóloga de estas moléculas coestimuladoras). Las más preferidas entre éstas son CD28 o 4-1BB. En otra realización preferida, la región de señalización intracelular incluye más de una de las fracciones de señalización de la proteína coestimuladora-receptora. Por ejemplo, la combinación de fracciones de polipéptidos de señalización de células T en la región de la señalización intracelular puede incluir tanto CD28 como 4-1BB. En una realización particularmente preferida, las regiones de bisagra y transmembrana extracelulares de CD28 se utilizan como las regiones de bisagra y transmembrana extracelulares del receptor quimérico.
- 30 La región de señalización intracelular puede incluir también una fracción de señalización de un receptor de citoquinas de una célula T, tal como el receptor de IL-2 o el receptor de TGF- $\beta$ . Esto último puede ayudar a inducir la célula T que contiene el receptor quimérico a adoptar las características de una célula Treg.
- La región intracelular también puede incluir una enzima de transducción de señal que (a) es una enzima de la ruta de transducción de señales de un receptor de células T específicas del antígeno o (b) es una enzima con la correspondiente especificidad y la actividad como la de la enzima de (a), derivada de un linfocito que no es de células T. Dicha enzima es preferiblemente una quinasa, tal como la quinasa Syk.
- 40 El ácido nucleico quimérico que codifica al CR también puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica Foxp3 dispuesta de tal manera que Foxp3 se expresa mediante la célula Treg independientemente del receptor quimérico. En otras palabras, el ácido nucleico quimérico puede ser bicistrónico de tal manera que el transgén Foxp3 está presente como un cistrón transcrito de forma independiente.
- 45 El antígeno o ligando objetivo es preferiblemente uno que está presente o expresado en un sitio o tejido objetivo de una respuesta inmune o inflamatoria mediada por células T efectoras. La respuesta autoinmune o inflamatoria puede comprender una respuesta o enfermedad autoinmune, una respuesta o rechazo de un aloinjerto o xenoinjerto, o enfermedad injerto contra huésped (GVH). En una realización preferida alternativa, el antígeno o ligando objetivo puede ser un autoantígeno o un antígeno que es de reacción cruzada con un autoantígeno, es decir, también está unido por un anticuerpo que es específico para el autoantígeno. El autoantígeno puede ser un antígeno patogénico en la fisiopatología de la enfermedad autoinmune.
- 50 El antígeno no es necesariamente un autoantígeno, pero puede ser, por ejemplo, un antígeno que es parte de la flora

bacteriana, tal como LPS derivado de las bacterias nativas del colon.

La enfermedad autoinmune o la respuesta al injerto y el antígeno/ligando o antígenos/ligandos contra la cual la Treg es específica se selecciona preferiblemente de entre el siguiente grupo:

- 5 (a) enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en donde el antígeno o ligando es uno que se expresa en colon o íleon enfermo;
- (b) artritis reumatoide, en donde el antígeno o ligando es un epítipo de colágeno o un antígeno presente en las articulaciones;
- (c) diabetes mellitus tipo I o insulinitis autoinmune, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de las células  $\beta$  del páncreas;
- 10 (d) esclerosis múltiple, en donde el antígeno o ligando es, por ejemplo, un antígeno de proteína básica de mielina (MBP) o MOG-1 o MOG2-2, o un antígeno neuronal.
- (e) tiroiditis autoinmune, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de la tiroides;
- (f) gastritis autoinmune, en donde el antígeno o ligando es un antígeno gástrico;
- (g) uveítis autoinmune o uveorretinitis, en donde el antígeno o ligando es antígeno S u otro antígeno uveal o retinal
- 15 (h) orquitis autoinmune, en donde el antígeno o ligando es un antígeno testicular;
- (i) ooforitis autoinmune, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de ovario;
- (j) psoriasis, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de queratinocitos u otro antígeno presente en la dermis o epidermis;
- (k) vitiligo, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de melanocito, tal como melanina o de tirosinasa;
- 20 (l) prostatitis autoinmune, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de próstata;
- (m) cualquier respuesta inmune no deseada, en donde el antígeno o ligando es un antígeno de activación u otro antígeno expresado en células T efectoras presentes en el sitio de la respuesta no deseada;
- (n) rechazo de tejidos, en donde el antígeno o ligando es el MHC específico para el tejido trasplantado; y
- 25 (o) una condición inflamatoria, en donde el antígeno o ligando es uno que se expresa en células no linfoides del linaje hematopoyético que participan en la inflamación.

La más preferida es una célula Treg que es capaz de actuar y suprimir IBD o la colitis ulcerosa, y puede ser específica para un antígeno asociado con IBD tal como el antígeno carcinoembrionario (CEA) o un antígeno de la flora bacteriana intestinal, tal como lipopolisacárido bacteriano (LPS) o un componente del mismo, preferiblemente un componente del Lípido A.

- 30 La Treg puede ser específica para un antígeno de activación expresado en células T efectoras, tales como CD69 o CD107a. La Treg puede ser específica para un antígeno expresado en una célula dendrítica, macrófago/monocito, granulocito o eosinófilo o presente en el sitio de la inflamación.

- 35 En una realización preferida, la célula Treg anterior es específica para un antígeno que se introduce de forma exógena a un sujeto en el sitio o tejido objetivo de la respuesta inmune o inflamatoria, ya sea antes, al mismo tiempo con, o después de la administración de la célula Treg.

- 40 La célula Treg anterior preferiblemente es una que expresa CD4 o CD8, junto con CD25 en su superficie y expresa el factor de transcripción Foxp3 en forma intracelular. El factor de transcripción Foxp3 se puede expresar en la célula de forma endógena (es decir, desde el propio gen Foxp3 de la célula); esta expresión se ve reforzada por la exposición de las células a TGF- $\beta$  u otra citoquina que induce la expresión de Foxp3 e induce un fenotipo de Treg en células T. En otra realización de la célula Treg anterior, Foxp3 se expresa a partir de un ácido nucleico que ha sido introducido en la célula de forma exógena (es decir, transducido) como un constructo de expresión de ácido nucleico recombinante que codifica Foxp3 y que regula su expresión. La anterior Treg puede ser obtenida de un sujeto mamífero antes de la introducción del ácido nucleico quimérico y antes de la estimulación que induce la expresión de Foxp3, o antes de la

5 transducción del constructo que codifica Foxp3 exógeno. El ácido nucleico quimérico que codifica el receptor quimérico y el constructo de ácido nucleico que codifica Foxp3 puede ser cotransducido en la célula. En una realización, se logra la cotransducción usando un vector bicistrónico que incluye, en un solo vector, una secuencia de (i) el ácido nucleico quimérico que codifica el receptor quimérico y (ii) el constructo de ácido nucleico que codifica Foxp3, bajo el control de un promotor común (o separado) y las secuencias reguladoras.

Las células Treg anteriores pueden ser enriquecidas o purificadas a partir de una población mixta de linfocitos o células T sobre la base de la expresión de las células T CD4 (o CD8) y CD25 y/o Foxp3. La célula puede ser sometida al siguiente tratamiento:

(a) exposición *ex vivo* de:

- 10 (i) células mononucleares de sangre periférica,  
(ii) linfocitos de sangre periférica,  
(iii) células T enriquecidas o purificadas a partir de (i) o (ii), o  
(iv) un subconjunto de células T enriquecidas o purificadas a partir de (iii);

15 a una cantidad de TGF- $\beta$  u otra citoquina o agente que induce Treg que es eficaz para convertir las células T en un fenotipo de Treg y para inducir la expresión de Foxp3 ; y

(b) opcionalmente, el cultivo y la expansión de las células expuestas de la etapa (a).

Las células Treg preferidas comprenden la célula anterior que ha sido transducida con un vector de expresión que codifica Foxp3.

20 También se proporciona en el presente documento es una composición farmacéutica inmunorreguladora para la supresión de una respuesta inmune/inflamatoria mediada por células T efectoras o el tratamiento de una enfermedad o condición inmunes/inflamatoria mediada por células T efectoras, que comprende una Treg redirigida como se describió anteriormente y un vehículo farmacéutica e inmunológicamente aceptable, excipiente o diluyente.

Esta invención también está dirigida a un método para producir la Treg anterior redirigida que expresa un receptor quimérico como el descrito. Este método comprende preferiblemente:

- 25 (a) obtener de un sujeto y, opcionalmente, enriquecer o aislar y propagar, una población de linfocitos o células T;  
(b) inducir el fenotipo de Treg en estos linfocitos mediante la estimulación de forma adecuada o la activación de las células mediante la exposición a TGF- $\beta$  u otra citoquina o agente que induce la expresión de Foxp3 y un fenotipo de Treg;  
30 (c) antes o después de la etapa (b), la transfección o transducción de las células *ex vivo* con un vector de expresión que codifica el receptor quimérico que se expresa en la Treg; y  
(d) opcionalmente, el cultivo o expansión *in vitro* de las células obtenidas como anteriormente.

En otra realización, este método comprende:

- (a) obtener de un sujeto y, opcionalmente, enriquecer o aislar y propagar, una población de linfocitos o células T;  
(b) transfectar o transducir las células *ex vivo* con un vector que codifica al receptor quimérico;  
35 (c) antes, después, o simultáneamente con la etapa (b), la transfección o transducción de las células *ex vivo* con un constructo de expresión de ácido nucleico recombinante que codifica Foxp3; y  
(d) opcionalmente, el cultivo o expansión *in vitro* de las células obtenidas como anteriormente.

40 Esta invención además está dirigida a la población anterior de células T redirigidas para su uso en un método de supresión de la actividad no deseada de células T efectoras en la mediación de una respuesta inmune o inflamatoria, que comprende suministrar a una población de células T efectoras que va a ser suprimida (o a un sitio donde dichas células T efectoras están presentes) una cantidad/número de células T reguladoras redirigidas como anteriormente,

eficaz para suprimir la actividad de las células T efectoras.

También se pretende la población anterior de células T redirigidas para su uso en un método de supresión de la actividad no deseada de las células T efectoras como se indicó anteriormente, cuyo método comprende el suministro a una población de células T efectoras que van a ser suprimidas (o a un sitio donde dichas células T efectoras están presentes) una cantidad/número de células T reguladoras redirigidas producidas de acuerdo con los métodos anteriores que son eficaces para suprimir la actividad de las células T efectoras.

Este suministro se preferiblemente *in vivo*. Las células Treg redirigidas son suministradas por inyección o infusión a un sujeto en el que la actividad de las células T efectoras debe ser suprimida, preferiblemente por una ruta seleccionada de intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraarticular, intratecal, intraluminal, intracerebroventricular, rectal, y tópica. En una realización, las células Treg se suministran en forma regional o local a un sitio de la inflamación.

El método anterior es para uso en situaciones en donde las células T efectoras median una respuesta o trastorno inflamatorio autoinmune, rechazo de un trasplante o enfermedad GVH.

En una realización, el método para tratar o mejorar los síntomas de una enfermedad o condición en un sujeto que está mediada por la actividad no deseada de las células T efectoras comprende la administración al sujeto que requiera del mismo, una cantidad/número efectivo de células Treg como se describió anteriormente, o una composición farmacéutica descrita anteriormente, en donde el dominio de reconocimiento objetivo de las células Treg redirigidas es específico para un antígeno/ligando presente en el sujeto en la vecindad de las células T efectoras de modo que, tras el reconocimiento y unión al antígeno, estas células Treg redirigidas se activan para secretar citoquinas supresoras que suprimen las células T efectoras de una forma no específica del antígeno. Como se señaló anteriormente, la activación de las células Treg se produce de una manera que no está restringida por el MHC y no requiere de coestimulación por un ligando para la proteína de señalización coestimuladora.

También se incluye un método para tratar o mejorar los síntomas de una enfermedad o condición en un sujeto que está mediada por la actividad no deseada de las células T efectoras, comprendiendo el método: (a) producir células Treg redirigidas utilizando los métodos de producción descritos anteriormente; (b) la administración al sujeto que requiera del mismo una cantidad/número efectivo de estas células Treg, tratando de este modo o mejorando los síntomas de la enfermedad o condición.

Dicho de forma más general, la invención está dirigida a la población anterior de células T redirigidas para su uso en un método para suprimir un proceso inmune/inflamatorio mediado por células T efectoras en un sujeto que requiera del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad/número efectivo de células Treg redirigidas que expresan en su superficie un receptor quimérico específico del antígeno que incluye porciones que activan las células Treg tras el contacto con el antígeno para el cual el receptor es específico, siendo el antígeno uno que está presente en el entorno de la actividad inmune/inflamatoria. La enfermedad o condición a tratar o mejorar es preferiblemente: (a) IBD; (b) artritis reumatoide; (c) diabetes mellitus tipo I o insulinitis autoinmune; (d) esclerosis múltiple; (e) tiroiditis; (f) gastritis; (g) uveítis o uveorretinitis; (h) orquitis; (i) ooforitis; (j) psoriasis; (k) prostatitis; (l) encefalomiелitis; (m) vitiligo; (n) rechazo de un injerto de células, tejido u órganos no compatibles; u (o) enfermedad GVH.

El presente método se usa para inhibir el rechazo de células, tejidos o un órgano trasplantado (aloinjerto o xenoinjerto) que es, por ejemplo, no compatible para un antígeno mayor y/o uno o más menores de histocompatibilidad. En el caso de la enfermedad de injerto contra huésped, el receptor generalmente ha recibido un trasplante de células de médula ósea alogénicas, semialogénicas o no compatibles con MHC o células madre hematopoyéticas enriquecidas o aisladas que son responsables de la mediación de efectos patógenos.

La presente invención está dirigida además a la nueva molécula de ADN quimérica que se puede utilizar para producir las células T redirigidas descritas anteriormente, así como a la proteína receptora quimérica codificada por el mismo. Tal ADN quimérico comprende:

un primer segmento de ADN que codifica una región de reconocimiento extracelular específica para un antígeno o ligando objetivo seleccionado, cuya región no comprende un dominio extracelular de proteína del MHC, y en donde dicha región se une al antígeno o ligando objetivo de una manera no restringida al MHC o de una manera no dependiente del MHC; el antígeno o ligando objetivo seleccionado que es uno que está presente o expresado en un sitio o tejido objetivo de una respuesta inmune patogénica o no deseada mediada por células T efectoras;

un segundo segmento de ADN que codifica una región transmembrana; y

un tercer segmento de ADN que codifica una región de señalización intracelular que comprende una combinación de fracciones de señalización de células T, y

una secuencia de nucleótidos que codifica Foxp3 que, tras la transfección o transducción de la molécula de ácido

nucleico quimérico en una célula T, hará que las células T transfectadas o transducidas expresen Foxp3,

cuya combinación de fracciones, tras la transfección del ADN quimérico en un linfocito T regulador (célula Treg) y unión de la región de reconocimiento extracelular al antígeno o ligando objetivo seleccionado del mismo, provoca la activación de las células Treg para causar la supresión de la inmunidad mediada por células T,

5 en donde, después de la transfección o transducción de la molécula de ADN quimérico en una célula Treg, la célula T expresa un polipéptido receptor quimérico que comprende la región de reconocimiento extracelular, la región transmembrana y la región de señalización intracelular en una cadena continua única, con las células T que muestran la región extracelular en la superficie de la célula y expresan Foxp3, convirtiéndose así en un linfocito T redirigido dotado con un fenotipo de células Treg, de manera que las Treg transfectadas se activan para activar y causar la supresión de la inmunidad mediada por células T cuando la región de reconocimiento extracelular expresada se une a su antígeno o ligando objetivo seleccionado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Diagrama esquemático de la estructura de TpCR específica de TNP. (A) Representación esquemática de los receptores quiméricos específicos de TNP. El CR específico de TNP abarca un scFv derivado de los mAb anti-TNP, Sp6. En la configuración tripartita, el scFv se une en tándem a una porción corta de CD28 (que carece del sitio de unión al ligando) de la extracelular e incluyendo la transmembrana, y dominios citoplasmáticos fusionados al dominio ITAM FcR $\gamma$ . (B) constructos del transgén receptor quimérico. Los constructos usados para generar los ratones transgénicos se colocaron bajo el control del promotor/reforzador de CD2 humano que dirige la expresión sólo en las células T y NK. CYT indica dominio citoplasmático; H, dominio de bisagra; L, guía de inmunoglobulina; LCR, región de control del locus; P, promotor; pL, secuencia del plásmido; TM, dominio transmembrana; VH y VL, dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, respectivamente;  $\Delta$ CD28, CD28 truncado que contiene parte del dominio extracelular y transmembrana, y que carece de la fracción de señalización citoplasmática.

Figura 2: Resultados de la citometría de flujo de la tinción de Foxp3 de las Treg específicas para TNP. Los esplenocitos aislados de ratones TNP-Tg y de tipo silvestre se tiñeron para Foxp3 intracelular y para el receptor quimérico específico de TNP usando el anticuerpo antiidiotípico para el scFv de Sp6. Los análisis representativos de citometría de flujo se muestran para un ratón individual de los cinco ratones ensayados. Los porcentajes indican células doblemente teñidas.

Figura 3: Gráfico que muestra la relación de células CD4+CD25+ con respecto a células CD4+ en esplenocitos de ratones de tipo silvestre y Tg. Los grupos son: los ratones de tipo silvestre, los ratones Tg para un receptor quimérico específico para un antígeno "irrelevante", ErbB2 (también denominados como ratones ErbB2-Tg), los ratones TNP-Tg que han sido transfectados con un vector que carece del dominio coestimulador transgénico CD28 (también denominados como ratones TNP $\Delta$ CD28-Tg) y TNP-Tg. Las Treg de TNP-Tg expresan plenamente el TpCR específico de TNP.

Figura 4: Gráfico (izquierda) que muestra la relación de células Foxp3+/CD4 en ratones ErbB2-Tg, TNP $\Delta$ CD28-Tg, y TNP-Tg de tipo silvestre. Citogramas de flujo (derecha) que muestran la expresión de Foxp3 esplénica. Los resultados comparan los ratones ErbB2-Tg, TNP-Tg y TNP $\Delta$ CD28-Tg de tipo silvestre.

Figura 5: Citogramas de flujo que muestra la tinción de Foxp3 en células T efectoras CD4+CD25+ de ErbB2-Tg, TNP-Tg y TNP- $\Delta$ CD28-Tg de tipo silvestre.

Figura 6: Gráfico (izquierda) que muestra la relación de células Foxp3+ con relación a CD25+/Foxp3+. Citograma de flujo (derecha) que muestra la tinción conjunta de Foxp3 y CD25. Los resultados comparan los esplenocitos de ErbB2-Tg, TNP-Tg y TNP- $\Delta$ CD28-Tg de tipo silvestre.

Figura 7: Gráfico que muestra el porcentaje de esplenocitos Foxp3+ en la población total de células T CD3+ tras la inducción de la colitis inducida por TNBS. Los linfocitos del bazo se aislaron de ratones TNP-Tg y de tipo silvestre antes o 48 horas después de la inducción de la colitis inducida por TNP, y se tiñeron doblemente con anticuerpos anti-Foxp3 y anti-CD3.

Figura 8: Gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos Foxp3+ extraídos de lámina propia del colon después de la inducción de la colitis por TNBS. Los linfocitos se aislaron de ratones TNP-Tg y de tipo silvestre antes y 48 horas después de la inducción de colitis por TNP, y se tiñeron doblemente como en la Fig. 7. El porcentaje de linfocitos Foxp3+ en la población CD3+ se presenta como la relación media de Foxp3/CD3  $\pm$  la desviación estándar de cada grupo de cinco ratones. Los datos mostrados son la media de dos experimentos realizados en forma independiente. Las diferencias en las proporciones entre los ratones TNP-Tg que indujeron colitis y los que no fueron significativas (P <0,05).

Figura 9: Serie de 6 gráficos que muestran la estimulación de la proliferación de células T reguladoras redirigidas

(izquierda) y las células T efectoras (derecha) mediante un estímulo no específico de antígeno (mAb anti CD3 y anti CD28) y estímulo específico de antígeno (TNP).

Figura 10: Gráfico que muestra la activación policlonal con Concanavalina A (Con A) de cocultivos de células Treg y células T efectoras (y los cultivos de control de poblaciones de células individuales)

5 Figura 11: Gráficos que muestran la activación específica de las Treg de TNP-Tg y su supresión de células T efectoras requiere de la coestimulación con TNP y CD28. En el panel izquierdo, se muestra la activación específica (TNP) de las células T reguladoras. Las Treg TNP-Tg y de tipo silvestre ( $5 \times 10^4$ ) se cocultivaron con Teff TNP-Tg o de tipo silvestre ( $5 \times 10^4$ ) en presencia de APC esplénicas con TNP, sin células T, irradiadas, ( $1,5 \times 10^5$ ). La proliferación de Teff se midió después de 48 horas mediante la incorporación  $^3\text{H}$ -Timidina. Panel derecho: APC cargadas con TNP como estímulo.

Figura 12: Gráfico que muestra la respuesta a la dosis de la estimulación específica de TNP de cocultivos de células efectoras T + células Treg. Las APC eran células de mastocitoma P815 estimuladoras P815 modificadas con TNP, que no expresan B7 (P815-TNP) o células P815 modificadas con TNP en las que se transfectó de forma estable el gen B7 (B7-TNP).

15 Figura 13: Gráfico que muestra la activación específica de Treg TNP-Tg y su supresión de células T efectoras requiere de TNP y coestimulación de CD28. Para establecer si se requiere la señalización coestimuladora para la activación de Treg TNP-Tg, se repitieron los experimentos de cocultivo utilizando como APC células de mastocitoma P815 irradiadas ( $1,5 \times 10^5$ ) que fueron o bien transfectadas de forma estable (o no) con ADNc de B7. La proliferación de células de Teff se midió después de 48 horas mediante la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. Cada grupo se cultivó por triplicado y se repitió el experimento tres veces. Los datos mostrados representan la media (+ d.e.) de cultivos por triplicado de un experimento representativo. Las diferencias en el índice de estimulación entre Treg de Teff + tipo silvestre y Treg de Teff + TNP-Tg fueron significativas ( $P < 0,01$ ).

Figura 14: Fotografía de colon de ratones de tipo silvestre (izquierda) y ratones TNP-Tg (derecha) cuatro días después de la inducción de colitis con TNBS en una dosis alta mediante instilación intrarrectal de TNBS en el día 0.

25 Figura 15: Curva de mortalidad de los ratones Tg-TNP, ErbB2-Tg y TNP- $\Delta$ CD28-Tg de tipo silvestre (WT) después de la inducción de la colitis por TNBS mediante instilación intrarrectal de TNBS en el día 0.

Figura 16: Fotomicrografía de tejido teñido (H&E, 40x) de los dos colon de la Fig. 14.

30 Figura 17: Curva de mortalidad de los ratones WT, TNP-Tg, ErbB2-Tg y TNP- $\Delta$ CD28-Tg después de la inducción de la colitis con oxazolona (OXA; un hapteno/antígeno que es distinto de TNP). Estos resultados sirven como un control para la especificidad de Treg en el experimento cuyos resultados se muestran en las Figs. 14-16. La colitis se indujo usando el hapteno no relacionado, oxazolona, que se instiló por vía rectal en las cepas similares de ratones ( $n = 10$ ).

Figura 18: Citogramas de flujo de la tinción de Foxp3 de células T efectoras de ErbB2-Tg, TNP- $\Delta$ CD28-Tg y TNP-Tg de tipo silvestre después de una semana de cultivo en presencia de los siguientes "estímulos" (a través de la parte superior): anti-CD3, TGF- $\beta$ , anti-CD3+TGF- $\beta$ , TNP, o TNP + TGF- $\beta$ .

35 Figura 19: Gráficos que muestran la tasa de mortalidad o de supervivencia de los ratones de tipo silvestre sometidos a inducción de colitis por TNBS moderada (panel de la izquierda) y severa (panel de la derecha) después de transferencia adoptiva de las siguientes poblaciones de Treg: WT, ErbB2-Tg, TNP-Tg y TNP-  $\Delta$ CD28-Tg.

40 Figura 20: Gráfico que muestra la puntuación de severidad de la colitis de Wallach de los ratones de tipo silvestre sometidos a la inducción de la colitis con TNBS después de la transferencia adoptiva de células de donantes de WT, ErbB2-Tg o TNP-TG. La colitis por TNBS se indujo en ratones WT ( $n = 8$ ) en el día 0. Después de 16 horas, las Treg ( $1 \times 10^5$ ) de ratones TNP-Tg, ErbB2-Tg o WT fueron transferidos adoptivamente a los ratones receptores. Cada experimento fue repetido tres veces. Los datos mostrados representan la media de un experimento representativo.

45 Figura 21: Fotografía de los colones extirpados de los ratones de tipo silvestre en los que se indujo colitis con TNBS, después de la transferencia adoptiva de ratones de tipo silvestre, ErbB2-Tg y TNP-Tg en el experimento descrito en la Fig. 20.

Figura 22: Fotomicrografía de secciones de tejido de colon teñidas (H&E, 40x) de los ratones de tipo silvestre con colitis por TNBS después de la transferencia adoptiva de Treg de los siguientes donantes: (A) de tipo silvestre (B) ErbB2-Tg y (C) TNP-Tg. El panel D muestra colon de control normal.

50 Figura 23: Localización de Treg en el colon. Citogramas de flujo de Treg de tinción fluorescentes marcadas con el colorante intracelular carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) en la lámina propia del colon de ratones no

retados o ratones con colitis por TNBS. Las Treg marcadas se inyectan por vía intraperitoneal 24 horas después de la inducción de colitis con TNBS. Los linfocitos de la lámina propia se obtuvieron 16 horas después de la transferencia adoptiva de  $10^6$  Treg de tipo silvestre o TNP-Tg a los receptores indicados. Las Treg marcadas con CFSE eran 9 veces más abundantes en colonos enfermos. Los datos mostrados representan los porcentajes de células positivas para CFSE en las correspondientes entradas de un ratón representativo de cada grupo de cuatro ratones. Cada experimento se repitió dos veces.

Figura 24: Localización de células T reguladoras en el colon. La formación de imágenes *in vivo* de ratones WT que reciben Treg de tipo silvestre y TNP-Tg marcadas con DiR ( $1 \times 10^6$ ) 16 horas después de la inducción de colitis con TNP ( $n = 3$ ). Los ratones fueron sometidos a obtención de imágenes de cuerpo entero (sistema de obtención de imágenes IVIS® Serie 100) a intervalos de 12 horas. Se muestra un solo ratón representativo de los tres en cada grupo en todos los puntos de tiempo. Se realizaron dos experimentos independientes, con resultados similares.

Figura 25: Localización de las células T reguladoras en el colon. Evaluación microendoscópica fluorescente *in situ* (Cell Vizio) de células T reguladoras marcadas con CFSE que se acumulan en la capa mucosa preluminal colónica. El diseño experimental es idéntico al descrito en la Fig. 23. La figura muestra los marcos representativos tomados 48 horas después de la transferencia adoptiva. Cada grupo constaba de cuatro ratones, y cada experimento se repitió dos veces.

Figura 26: La administración intrarrectal de TNBS trae como resultado un efecto protector mediado por Treg en TNP-Tg de la colitis por oxazolona. (a) Tasas de mortalidad de los ratones de tipo silvestre y TNP-Tg a los que se les suministró  $\pm$  dosis bajas de TNBS, una semana después de la sensibilización previa sólo con oxazolona. (b) Imágenes de colonoscopia murina de ratones WT y TNP-Tg representativos. (c) Aspecto macroscópico de colonos representativos de varios grupos de ratones. (d) Apariencia microscópica de colonos que se muestran en c. (e) Transferencia adoptiva de las Treg (Tr) a ratones previamente sensibilizados con oxazolona (O) indujo una semana más tarde colitis con oxazolona (O) en presencia de baja dosis de TNBS (T). Se administraron a los ratones Treg de WT o TNP-Tg ( $n = 8$ ) 16 horas después de la inducción de colitis.

La Figura 27 muestra 8 figuras esquemáticas de las células T que son transducidas con un vector retroviral que porta uno de los 8 constructos de CR que incluyen la proteína fluorescente detectable, eGFP. Los representados en la mitad inferior de la figura son constructos bicistrónicos que codifican una fusión de GFP y el factor de transcripción Foxp3. Se usaron microscopía de luz y de fluorescencia para rastrear la expresión de la GFP en el citoplasma del núcleo de las células transducidas. Los constructos están etiquetados como sigue (donde "TpCR" se refiere a un "receptor quimérico tripartito" a pesar de que, algunos de estos CR eran "más" que tripartitas).

- a. TNP-TpCR: región de reconocimiento extracelular que consta de un scFv de un mAb específico de TNP específico.
- b. MD2-TpCR: región de reconocimiento extracelular que consta de un fragmento o motivo que se une a un LPS de la proteína MD2 humana, un correceptor de LPS (que interactúa con los receptores de TLR4). El fragmento de MD2 corresponde a los residuos 120-132 de la SEQ ID NO: 5. Las secuencias de tales ácidos nucleicos quiméricos utilizados aquí son las SEQ ID NO: 8 y 9.
- c. CD14-TpCR: región de reconocimiento extracelular que consta de un fragmento que se une a un LPS de la proteína CD14 humana, un receptor de LPS conocido. El fragmento de CD14 corresponde a los residuos 100-119 de la SEQ ID NO: 4. Las secuencias de tales ácidos nucleicos quiméricos utilizados aquí son las SEQ ID NO: 6 y 7.
- d. MD2-CD14-TpCR: la región de reconocimiento extracelular que consta tanto del fragmento de MD2 y como de los fragmentos de CD14 descritos anteriormente. Las secuencias de tales ácidos nucleicos quiméricos utilizados aquí son las SEQ ID NO: 10 y 11.

Cada uno de los constructos codificados como fracciones estimuladoras y coestimuladoras, secuencias unidas en tándem que codifican CD28 y FcR $\gamma$ . Los resultados se muestran como micrografías una al lado de la otra con microscopio de luz y de fluorescencia.

Figura 28. Una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de un CR tripartito específico de TNP como se usa en el presente documento. Las anotaciones incluyen el origen de las regiones (scFv, aquí el mAb "Sp6"), la región "CD28", y las regiones de FcR $\gamma$  (indicadas como "GAMMA"), así como sitios de restricción, secuencia guía, etc. La proteína madura comienza en el residuo del aminoácido 23.

Figura 29. Una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) de un plásmido pBullet que incluye un constructo que codifica CR que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el scFv de mAb HB 9081 (es decir, producido por un híbrido dado ATCC No. de acceso HB9081) fusionado C28/FcR $\gamma$ . Este mAb y, por lo tanto, el scFv, es específico para LPS. Las anotaciones muestran varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, la secuencia guía y secuencias de plásmido.

Figura 30A-30B. La Figura 30A es una secuencia anotada de aminoácidos de CD14 humana (SEQ ID NO: 4). Véase GenBank No. de Acceso P08571. Se observan una secuencia de señal y un motivo de unión a LPS (residuos 100-119). Esta proteína sirve como un receptor de LPS en las células. La Figura 30B es una secuencia anotada de aminoácidos de la proteína MD-2 humana (SEQ ID NO: 5). Véase GenBank No. de Acceso NP\_056179. Se observaron una secuencia de señal y un motivo de unión a LPS (residuos 120-132). Esta proteína de unión a LPS interactúa con TLR-4 como un correceptor.

Figura 31A-31B. La Figura 31A es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico que comprende al motivo de CD14, CD28-FcRy. La Figura 31B es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico, bicistrónico: motivo de CD14-CD28-FcRy-IRES-GFP-Foxp3. También se muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) del motivo de CD14 (residuos 110-119 de la SEQ ID NO: 4). Las anotaciones muestran varios sitios de restricción, principios y finales de las regiones de la proteína, la región IRES, etc.

Figura 32A-32B. La Figura 32A es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico que comprende el motivo de MD2-CD28-FcRy. La Figura 32B es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 9) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico, bicistrónico: motivo de MD2-CD28-FcRy-IRES-GFP-Foxp3. También se muestra la secuencia de aminoácidos del motivo de MD2 (residuos 120-132 de la SEQ ID NO: 4). Las anotaciones muestran diversos sitios de restricción, principios y finales de regiones de la proteína, la región IRES, etc.

Figura 33A y 33B. La Figura 33A es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 10) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico que comprende el motivo de MD2-motivo de CD14-CD28-FcRy. La Figura 33B es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 11) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico, bicistrónico: motivo de MD2-motivo de CD14-CD28-FcRy-IRES-GFP-Foxp3. También se muestra la secuencia de aminoácidos del motivo de MD2 (residuos 120-132 de la SEQ ID NO: 4) y la secuencia de aminoácidos del motivo de CD14 (residuos 100-119 de la SEQ ID NO: 3). Los nucleótidos 106-148 de la SEQ ID NO: 11 (doble subrayado) codifican un enlazador flexible (14 aminoácidos, SEQ ID NO: 12, también doble subrayado). Las anotaciones muestran varios sitios de restricción, principios y finales de las regiones de la proteína, la región IRES, etc.

La Figura 34 es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 13) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico que comprende MD2-CD28-FcRy (SEQ ID NO: 13). También se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína MD2 de longitud completa (SEQ ID NO: 4). La región de unión a LPS de esta secuencia de aminoácidos está subrayada. Las anotaciones muestran varios sitios de restricción, principios y finales de las regiones de proteínas, etc.

La Figura 35 es una secuencia anotada de nucleótidos (SEQ ID NO: 14) que muestra la secuencia de nucleótidos de un receptor quimérico, bicistrónico: MD2-CD28-FcRy-IRES-GFP-Foxp3. También se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína MD2 de longitud completa (SEQ ID NO: 4). La región de unión a LPS de esta secuencia de aminoácidos está subrayada. Las anotaciones muestran varios sitios de restricción, principios y finales de las regiones codificantes de proteínas, IRES, secuencia del vector, etc.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

#### Definiciones

"Linfocito T regulador" o "célula T reguladora" o "Treg", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones son sinónimos y tienen la definición estándar tal como se utiliza en la técnica. Las células Treg son una subpoblación especializada de las células T que actúan de una manera "reguladora" para suprimir la activación del sistema inmune y por lo tanto mantener la homeostasis del sistema inmune y la tolerancia a los antígenos propios. Las Treg en ocasiones han sido denominadas células T supresoras. Las células Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción de la familia *forkhead* Foxp3 (*forkhead box p3*). También pueden expresar proteínas de superficie CD4 o CD8. Por lo general, también expresan CD25. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, y a menos que se especifique lo contrario, las Treg incluyen Treg naturales e inducidas o Treg adaptativas y Treg que han sido creadas utilizando la tecnología de ADN recombinante. Las células Treg de origen natural (CD4+CD25+Foxp3+) surgen como todas las otras células T en el timo. Por el contrario, las células Treg adaptativas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmune normal. La activación específica de antígenos de células T efectoras humanas conduce a la expresión inducible de Foxp3 en un subgrupo de las células efectoras activadas, y este subgrupo puede desarrollar un fenotipo regulador (Treg). Una manera de inducir células T reguladoras es mediante la exposición prolongada de las células T efectoras a TGF- $\beta$ . Las células T también se pueden convertir en células Treg mediante transfección o transducción del gen Foxp3 en una población mixta de células T. Una célula T que es forzada a expresar Foxp3 adopta el fenotipo de Treg y tales Treg recombinantes también se definen en el presente documento como "Treg".

- "Treg redirigida" pretende ser un término exhaustivo para las Treg que portan un receptor quimérico (CR) como se describe y reivindica en el presente documento que le confiere a las células la capacidad de unirse a y ser activadas por un antígeno objetivo o ligando que es diferente de aquel para el cual una población de Treg puede haber sido previamente específica (tal como se controla por su TCR específico de antígeno endógeno). Las Treg redirigidas son "independientes de MHC" y "no restringidas a MHC" en el proceso de su activación y en sus acciones, ya que no requieren la asociación de un péptido derivado de su antígeno objetivo o ligando con MHC con el fin de reconocerlo. Sin embargo, para fines especiales, puede ser posible diseñar una Treg redirigida que reconozca un epítipo específico de una molécula de MHC en sí, por ejemplo, que funciona como un antígeno de trasplante. En tal caso estas Treg redirigidas aún no están restringidas a MHC.
- El término "antígeno o ligando objetivo seleccionado" significa una molécula a la que se pretende unir la región de reconocimiento extracelular de la Treg redirigida con el fin de activar esa Treg. Si el objetivo seleccionado es un antígeno, entonces puede surgir un anticuerpo en contra de él y las regiones de unión de tal anticuerpo utilizado para construir la región de reconocimiento extracelular de la Treg redirigida. Si la molécula objetivo es un miembro de un par receptor/ligando (definido a continuación), entonces el otro miembro de ese par se puede utilizar como parte de la región de reconocimiento extracelular de la Treg redirigida. Generalmente, en el diseño de una Treg redirigida para uso de acuerdo con esta invención, se identifica primero el tejido o sitio objetivo deseado o sitio donde la Treg se va a emplear y, a continuación, se identifica un antígeno o ligando que está presente en o cerca de este tejido o sitio objetivo deseado. A continuación, se identifica un anticuerpo o ligando/receptor que se une al mismo, o, si es necesario, se crea o se construye para su uso en la Treg redirigida.
- El término "ligando" como se usa en el presente documento, y en particular como parte del término "antígeno o ligando objetivo" o el término "par receptor/ligando" se refiere a una molécula que es capaz de unirse a y formar un complejo con otra biomolécula para servir a un propósito biológico. A menudo, la pareja de unión de un ligando se denomina un receptor de manera que las dos parejas de unión se denominan un "par receptor/ligando". Para el propósito de la presente especificación y reivindicaciones, el término "receptor", cuando se usa en el sentido de un "par receptor/ligando", tiene un significado más amplio que, por ejemplo, una definición típica de un "receptor" como una proteína en o sobre una célula que se une a un ligando específico. Más bien, pretende significar cualquier pareja de unión para un ligando. Cualquier miembro de un par de unión puede ser considerado como el "ligando", mientras que el otro miembro es considerado como el "receptor". Por lo tanto, un receptor clásico puede calificar como un "ligando" cuando se usa en el presente documento en el término "antígeno o ligando objetivo", ya que es un miembro de un par de unión receptor/ligando. Por ejemplo, IL-2 puede ser un ligando, ya que se une a y forma un complejo con otra biomolécula, es decir, un receptor de IL-2 (IL-2R), para servir a un propósito biológico. Sin embargo, IL-2R es también un "ligando", porque es una molécula que se une y forma un complejo con otra biomolécula, es decir, IL-2, para servir a un propósito biológico. Así, bajo el presente uso, si IL-2R se considera un ligando en el par de unión IL2R/IL-2, IL-2 puede ser considerado el receptor, y viceversa.
- Un "receptor quimérico", como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, es un polipéptido recombinante que incluye una región de reconocimiento extracelular que se deriva de una molécula y al menos una fracción de señalización intracelular que se deriva de una molécula diferente. En ese sentido, es quimérico.
- Un "ácido nucleico quimérico" es un polinucleótido recombinante que incluye una secuencia que codifica un receptor quimérico.
- Los términos "recombinante" o "en forma recombinante" cuando se aplican a un polinucleótido, polipéptido o célula significan que la molécula o célula se elaboran mediante técnicas de ingeniería genética, no existirían de no ser por la intervención humana.
- El término "fracción de polipéptido de señalización de células T" significa la porción de una molécula endógena a una célula T que media la señalización. Puede ser una parte de una molécula receptora de las células T que media la señalización, o una enzima de transducción de la señal secuencia abajo o una porción de la misma que media la señalización, es decir, que tiene actividad enzimática.
- El término "dominio del scFv derivado del anticuerpo" significa un anticuerpo de cadena sencilla en donde  $V_L$  de un anticuerpo específico se une al  $V_H$  del mismo mediante un enlazador o espaciador flexible.
- El término "un dominio extracelular de la proteína del MHC" se refiere a la divulgación de Meal DJ y colaboradores. (Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 11817-22), discutido más adelante, y Jodi MD y colaboradores, Nat. Biotechnol., 2002, 20: 1215-1220. Estas publicaciones describen células Treg redirigidas contra células T en un sistema murino. Utilizaron las cadenas  $I\alpha$  e  $I\beta$  del MHC clase II como regiones extracelulares de dos receptores quiméricos separados para su uso en una Treg redirigida. El término dominio extracelular de la proteína del MHC se define para poder abarcar lo que se utilizó en las publicaciones de Meal y colaboradores y Jodi y colaboradores cualquiera de sus análogos o fracciones que hubiera sido obvia para una persona experta en la técnica para sustituir por tales dominios con el propósito divulgado por Meal y colaboradores y por Jodi y colaboradores, es decir, para provocar la unión de la Treg redirigida a un linfocito T dirigido específicamente a un autoantígeno particular.

El término "espaciador flexible" significa cualquier fracción flexible de peptídico que facilitará la funcionalidad de la región de reconocimiento extracelular. Cuando esta región no está unida rígidamente a la región transmembrana, pero se permite un cierto grado de flexibilidad con respecto a la membrana celular, la capacidad de la región de reconocimiento para reconocer y unirse a su antígeno o ligando objetivo se ve facilitada. Los pequeños aminoácidos neutros, tales como glicina y serina, confieren tal flexibilidad. Ejemplos son Gly<sub>4</sub>Ser y Gly<sub>4</sub>Ser<sub>3</sub>.

La "superfamilia de las inmunoglobulinas" (Ig) significa el gran grupo de proteínas de la superficie celular y solubles que están implicadas en los procesos de reconocimiento, unión, o adhesión de las células. Las moléculas se clasifican como miembros de esta superfamilia con base en las características estructurales compartidas con inmunoglobulinas (también conocidas como anticuerpos); todas ellas poseen un dominio conocido como un dominio o plegamiento de la inmunoglobulina. Los miembros de la Ig incluyen diversos receptores antigénicos de la superficie de la célula, correceptores y moléculas coestimuladoras del sistema inmune, moléculas implicadas en la presentación de antígenos a los linfocitos, moléculas de adhesión celular y ciertos receptores de citoquinas. Están comúnmente, aunque no exclusivamente, asociados con funciones en el sistema inmunológico.

El término "bisagra" cuando se refiere a una región de una molécula de la Ig significa la región entre los dominios de C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2 que consiste en un pequeño número de aminoácidos. La bisagra es flexible y permite que la región de unión se mueva libremente con relación al resto de la molécula. En la región de bisagra son los puentes disulfuro que unen los dos dímeros, creando la unidad estructural tetramérica. Ejemplos de tales secuencias de bisagra de la inmunoglobulina se pueden encontrar en la patente estadounidense No. 6.165.476, que se incorpora aquí por referencia.

El término "receptor específico de antígeno de una célula T" se refiere a un receptor que se encuentra en una célula T que es específica del antígeno, es decir, naturalmente tiene una región extracelular que se une específicamente a un antígeno particular de preferencia a otro. Ejemplos de tales receptores específicos del antígeno de una célula T son las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$  del TCR, el dímero TCR $\alpha\beta$  y el dímero TCR.

El término "complejo TCR/CD3" a veces se llama el "complejo TCR". CD3 es un complejo de proteína compuesto de cuatro cadenas en mamíferos (las cadenas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y dos CD3 $\epsilon$ ), que se asocian con moléculas conocidas como el receptor de células T (TCR; véase más arriba) y con la cadena  $\zeta$  y la cadena  $\eta$  (como homo o heterodímeros) para generar una señal de activación en linfocitos T. Las colas intracelulares de estas moléculas de CD3 contienen un solo motivo conservado conocido como un "motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina" o ITAM en forma corta, que es esencial para la capacidad de señalización del TCR. Las cadenas CD3- $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  y las cadenas  $\zeta$  y  $\eta$ , también conocidas como cadenas CD3- $\zeta$  y CD3- $\eta$ , junto con el TCR, forman lo que se conoce como el complejo receptor de células T.

El término "proteína coestimuladora-receptora de células T" significa un receptor de la célula T que proporciona una señal coestimuladora. Durante la activación de las células T, la coestimulación a menudo es crucial para la generación de una respuesta inmune efectiva. Las células T requieren dos señales para ser plenamente activadas. Una primera, la señal específica de antígeno se proporciona a través del complejo receptor/CD3 de células T. Una segunda señal, la señal coestimuladora, es antígeno no específica del antígeno y es proporcionada por moléculas coestimuladoras expresadas en la membrana de las células T. Los ejemplos de proteínas coestimuladoras-receptoras de células T son CD28, OX40, CD40L, 4-1BB y PD-1.

La presente invención se basa en la concepción de que las células T reguladoras (Treg) que han sido modificadas para poseer especificidad antigénica similar al anticuerpo, puede ser aprovechada para suprimir la función de las células T efectoras *in vivo*. La acción de estas células Treg está mediada en una forma no específica del antígeno, principalmente por la liberación de citoquinas supresoras en la vecindad donde las células T reguladoras son activadas o estimuladas por un antígeno reconocido por su T<sub>p</sub>CR. Una vez activadas, las células T reguladoras pueden suprimir las respuestas de células T efectoras. Por lo tanto, la transferencia de estas células que han sido modificadas para expresar los CR (como se describe en el presente documento) en un sujeto en quien se desea suprimir una respuesta de células T efectoras y su inflamación concomitante o consiguiente, y su administración a, y activación en el sitio de tal actividad inflamatoria, produce efectos terapéuticos.

Por lo tanto, las enfermedades o condiciones objetivo preferidas para esta invención son enfermedades autoinmunes, más preferiblemente, enfermedades autoinmunes mediadas por células T específicas de un órgano. Otros ejemplos de la capacidad de respuesta inmune no deseada detectada en el presente documento son el rechazo de injerto de injertos de tejido y órganos sólidos, así como injertos de células suspendidas (por ejemplo, trasplantes de médula ósea (BM) o trasplante de células madre hematopoyéticas (HSV)). Otra enfermedad objetivo es la enfermedad de injerto contra huésped (GVH), que es una consecuencia común de un trasplante de BM o HSV no compatible. Una condición adicional considerada en esta invención es el rechazo de trasplantes (por ejemplo, de un riñón no compatible) donde las células efectoras inmunes del receptor rechazan el injerto.

Debido a que el factor de transcripción Foxp3 (un miembro de la familia forkhead) parece ser esencial para el desarrollo y la función de Treg, y es un marcador distintivo para estas células (junto con CD4 y CD25), la presente invención proporciona métodos para producir células T reguladoras, así como proporcionar las Treg producidas por estos

métodos, que se basan en la inducción de Foxp3 en las células T en un proceso de conducir las células a lo largo de la vía hasta la condición de Treg.

En otra realización, se transduce o transfecta el ADN que codifica Foxp3 en células T utilizando cualquier vector de expresión adecuado como vehículo de administración en un proceso para conducir estas células hasta convertirse en células T reguladoras. Más apoyo para esta concepción se encuentra en los reportes de que la prevención de la expresión de Foxp3 *in vivo* se traduce en animales con una propensión para el desarrollo de trastornos autoinmunes y linfoproliferativos (Sakaguchi S, y colaboradores, J Immunol 1995; 155: 1151-1164; Hori S y colaboradores, Science 2003; 299: 1057-1061; Khattri R, y colaboradores, citado más arriba; Fontenot JD y colaboradores, Nat Immunol. 2003; 4: 330-6).

La población de partida puede ser PBL totales, células T que han sido enriquecidas o aisladas de PBL o células T CD4+ que han sido enriquecidas o aisladas a partir de tales células T (ya sea que expresan CD25 o no). Estas células pueden ser redirigidas mediante la transducción del TpCR antes de, concomitantemente con, o después de la transducción del ADN que codifica ADN de Foxp3, preferiblemente en la forma de un vector de expresión de Foxp3. Walker MR. y colaboradores, 2005, Proc Natl Acad Sci USA. 102: 4103-8, han demostrado que las células Treg CD4+CD25+ humanas específicas del antígeno pueden ser generadas de nuevo a partir de células CD4+CD25-. La ventaja de la presente invención sobre el enfoque descrito por Walker y colaboradores es que la especificidad del antígeno y los requisitos de activación de Treg son independientes del MHC. Esta mejora importante hace que el aislamiento y la activación de células T reguladoras específicas del antígeno sean más simples y permite métodos terapéuticos (descritos a continuación) en los el antígeno se puede administrar convenientemente junto con las células Treg transferidas a un sitio deseado, tal como un sitio inflamatorio, ejemplificado por la de colon en la IBD.

#### Células T reguladoras inducibles contra las de origen natural

Las Treg "clásicas" de origen natural son derivadas del timo, expresan altos niveles de Foxp3 y suprimen la activación de los linfocitos efectoras. La activación específica del antígeno de células T efectoras humanas conduce a la expresión inducible de Foxp3 en un subgrupo de las células efectoras activadas, cuyo subgrupo puede desarrollar un fenotipo regulador (Treg). Estas células T reguladoras inducidas pueden suprimir (independientemente del contacto celular) células efectoras recién aisladas (Walker MR, y colaboradores, 2005, citado más arriba; Walker MR, y colaboradores, 2003, J Clin Invest. 112: 1437-1443). En ratones, tanto la inducción *in vitro* como *in vivo* de las Treg se logra mediante la exposición prolongada de las células efectoras a TGF- $\beta$  (Wan YR, y colaboradores, 2005, Proc Natl Acad Sci USA. 102: 5126-31; Mantini MC, y colaboradores, 2004, J Immunol 72: 5149-53; Mantini y colaboradores, 2006, citado más arriba). Esta población pequeña, generada periféricamente de células T reguladoras inducibles se cree que juegan un papel central en la regulación y que contienen las respuestas inmunes en curso tal como la falta de inducción de Treg se asocia con una propensión a la autoinmunidad.

#### Manipulación genética de las células reguladoras T CD4+CD25+

DE acuerdo con la presente invención, los enfoques que específicamente redirigen las células T reguladoras para suprimir la actividad de las células T patológicos son beneficiosos en condiciones inflamatorias, facilitando la localización de células T reguladoras en los sitios inflamatorios y su activación específica mediante antígenos asociados con la inflamación. Cuando se activan específicamente en las lesiones inflamatorias, se espera que tales células T reguladoras atenúen la enfermedad inflamatoria mediante la supresión de los linfocitos T efectoras patógenos en una forma no restringida al MHC, no específica del antígeno.

La activación independiente de MHC y la acción de las células Treg de acuerdo con la presente invención es una ventaja importante. Tal acción se contrasta con el reporte de Meal DJ y colaboradores. (Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 11817-22) de un estudio de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), que describe células Treg CD4+25+ redirigidas contra células T reactivas del epítipo 89-101 de proteína básica de mielina (MBP) por un CR que incluye el epítipo de MBP enlazado a la proteína del MHC clase II. Mediante el refuerzo de la interacción entre una célula Treg y las células T autorreactivas dirigidas contra el epítipo 89-101 de MBP, la actividad de Treg está enfocada específicamente al antígeno contra las células T autorreactivas. Un modelo de este tipo requiere un cierto grado de dependencia del MHC ya que CR único sólo puede tener dominios de un MHC único y por lo tanto sólo se puede utilizar para pacientes con esa HLA característica.

Por el contrario, las células Treg de la presente invención actúan para suprimir las células T efectoras patógenas de una forma independiente del MHC, haciéndolas más ventajosas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes/inflamatorias porque pueden elegir como blanco antígenos objetivo comunes compartidos entre muchos individuos. En el modelo de Meal y colaboradores, citado más arriba, las Treg actúan mediante acoplamiento con MHC y restringido al antígeno. A medida que estas células T reguladoras, que expresan el ligando que es reconocido por el TCR de las células T autorreactivas, son estimuladas por esta interacción y suprimen las células efectoras. Sin embargo, como enfoque clínico este sufre de la desventaja de que se requeriría compatibilidad completa del MHC dl donante-receptor en la población humana en la que la diversidad de MHC (HLA) es sustancial. Por otra parte, este enfoque estaría limitado a la supresión de clones que son autorreactivos contra un único epítipo peptídico reconocible en el contexto del

MHC-II definido (HLA-DR). Una ventaja adicional significativa de la presente invención es que supera el requisito de que el antígeno patogénico se conocido. De hecho, los antígenos asociados con enfermedades en un gran número de trastornos autoinmunes humanos, incluyendo IBD humana, no son aún conocidos y pueden muchos.

El enfoque de "cuerpo T" de la presente invención

5 El enfoque del "cuerpo T" fue diseñado por uno de los presentes inventores y sus colegas como una modalidad novedosa para la redirección y activación específica de linfocitos T efectores hacia objetivos predefinidos, sobre todo los asociados con procesos neoplásicos (por ejemplo, Pin thus JHU y colaboradores, *J Clin Invest* 2004; 114: 1774-1781) y enfermedades infecciosas (Bitton N, y colaboradores, *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 260: 271-300). El enfoque del cuerpo T estaba destinado a superar la relativa inaccesibilidad de los anticuerpos a ciertos sitios (tal como tumores sólidos) y la ineficacia general de los linfocitos infiltrantes del tumor para combatir tumores sólidos mediante la combinación en una población de células efectoras de las propiedades de los brazos humoral y celular del sistema inmune (Gross G y colaboradores, 1989; citado más arriba. Eshhar Z, y colaboradores, *Br J Cancer Suppl*, 1990; 10: 27-9).

15 Los receptores quiméricos preferidos del cuerpo T comprenden una porción de unión al ligando, preferiblemente (1) una región variable del anticuerpo de cadena única (scFv) dirigida contra un antígeno asociado a la enfermedad, ligado a (2) un espaciador extracelular opcional y una región transmembrana y (3) una o más fracciones intracitoplasmáticas de células T coestimuladoras y moléculas estimuladoras/de señalización. Tales CR como los desarrollados inicialmente permiten un reconocimiento específico similar a anticuerpos, no restringido al MCH, alojamiento y penetración de tejidos neoplásicos. Dentro de los tejidos objetivo, la activación específica del antígeno de las células T efectoras que portan al receptor quimérico permite la destrucción mediada por células T de las células tumorales ya sea por citotoxicidad directa o por la inducción de una respuesta inflamatoria local.

25 Aunque el dominio del scFv es la unidad de reconocimiento preferida de la presente invención, en otras realizaciones, puede ser sustituida por otra estructura que sirve como un ligando de direccionamiento (o compañero de unión al ligando) que facilitará traer las células Treg que expresan el CR a un sitio seleccionado o un antígeno seleccionado. Capon y sus colegas han divulgado una cantidad de CR de este tipo, tal como uno donde un polipéptido compañero de unión al ligando se fusiona en su terminal C al terminal N de una región constante de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Roberts MR. y colaboradores, *Blood* 1994; 84: 2878-89; Ashkenazi A y colaboradores, *Int Rev. Immunol.* 1993; 10: 219-27; Chamow SM y colaboradores, *Int J Cancer Suppl.* 1992; 7: 69-72. Véanse también las patentes estadounidenses Nos. 6.710.169; 6.407.221; 6.406.697; 6.319.494; 6.117.655; 6.103.521; 6.077.947; 5.741.899; 30 5.714.147; 5.514.582; 5.455.165; 5.428.130; 5.359.046; 5.336.603; 5.225.538; y 5.116.964. Todos estos documentos se incorporan por referencia en su totalidad.

El polipéptido CR de la presente invención se caracteriza en términos generales por comprender (1) una porción extracelular o un dominio capaz de unirse a un ligando (tal como un antígeno objetivo) de una manera no restringida a MHC, (2) un espaciador extracelular opcional y un dominio transmembrana y (3) una región citoplasmática (uno o más dominios) capaz de activar una vía de señalización intracelular.

40 Ejemplos de CR preferidos de células T comprenden un primer dominio de unión, un ejemplo preferido de los cuales es un fragmento scFv extracelular derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb) específico para un antígeno seleccionado. El dominio anterior se fusiona a un dominio espaciador (preferiblemente un dominio de bisagra de la familia de Ig que proporciona espaciamiento y flexibilidad), un dominio transmembrana, una región coestimuladora, por ejemplo, partes de una molécula de CD28, y una fracción de señalización intracelular adicional para células T. Ejemplos de estos últimos incluyen una cadena  $\zeta$  o una cadena  $\eta$  asociada al complejo TCR/CD3, o una región citoplasmática que contiene ITAM, tal como la cadena  $\gamma$  de un receptor del Fc de Ig (FcR $\gamma$ ). Un ITAM es un "motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina; para una revisión, véase Humphrey MB y colaboradores, *Immunol Rev.* Dic de 2005; 208: 50-65; Pitcher LA y colaboradores, *Trends Immunol.* 2003; 24: 554-60; Isakov N, *Receptors Channels.* 1998; 5: 243-53; Daron M, *Annu Rev. Immunol.* 1997; 15: 203-34; Isakov N, *J Leukoc Biol.* 1997, 61: 6-16; Cambier JC, *J Immunol.* 1995; 155: 3281-5; Flaswinkel H y colaboradores, *Semin Immunol.* 1995; 7: 21-7, todos los cuales se incorporan por referencia en su totalidad. También es posible utilizar las porciones intracelulares de moléculas receptoras TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$  en el CR para este propósito. La fracción de señalización de un receptor de citoquina también puede estar presente en la cadena del receptor quimérico para su uso en la presente invención. Por ejemplo, la adición de la porción de señalización del receptor de IL-2 hará que la célula Treg actúe además como si hubiera sido sometida a IL-2 externa tras la unión del dominio de direccionamiento extracelular al antígeno o ligando objetivo seleccionado. Además, la adición de la fracción de señalización del receptor de TGF $\beta$  inducirá una célula T efectora para convertirse en una célula Treg y por lo tanto esto también puede ser una adición útil a la cadena del receptor quimérico de la presente invención. Tales CR expresados en las células T son conocidos por ser funcionales y, tras la exposición al antígeno, promueven la producción de citoquina (y, cuando se expresan en un tipo de célula efectora apropiada en el estado de la técnica, promovieron la lisis de células objetivo que portan el antígeno (Stancovski I, y colaboradores, *J Immunol* 1993; 151: 6577-82)).

Una configuración inicial de un CR con base en scFv comprendía un dominio de reconocimiento extracelular y una

fracción de señalización intracelular. La activación completa de tales cuerpos T a través del CR requirió ya sea de estimulación previa del cuerpo T o activación de una vía coestimuladora por la exposición a células presentadoras de antígeno (APC) que portan CD08/CD86 (B7).

5 La creación de un receptor quimérico tripartita (TpCR) por uno de los presentes inventores y por otros (Pule MA, y colaboradores, Mol Ther. 2005; 12: 933-41)), en donde se añadió el dominio de señalización de la molécula coestimuladora CD28 al dominio citoplasmático del CR, permitió la activación mediada por antígeno tanto de las vías de señalización estimuladoras y coestimuladoras independiente de las interacciones B7-CD28 (Eshhar y colaboradores, 2001, citado más arriba). Este enfoque facilita la activación completa de los linfocitos que expresan scFv, dando como resultado efectos mejorados (en el caso de las células T efectoras, antitumorales mejorados; Pin thus JHU y colaboradores, citado más arriba).

15 Otro dominio de señalización intracelular útil para la presente invención es todo o parte del dominio citoplasmático de una fosfotirosina quinasa (por ejemplo, una molécula de la familia Syk) que está fusionado al CR. Véase, por ejemplo, Eshhar Z & Fitzer-Attas CJ, Adv Drug Deliv Rev. 1998; 31: 171-82; Fitzer-Attas CJ y colaboradores, J Immunol. 1998; 160: 145-54; y Eshhar Z y colaboradores, Springer Semin Immunopathol. 1996; 18 (2): 199-209. El uso de tal fracción de señalización no pasa por eventos de señalización próximos a la membrana que a menudo son defectuosos en las células T de los sujetos con inflamación aguda o crónica o cáncer.

Dominios/regiones coestimuladoras y señales en el receptor quimérico tripartita

20 La expresión retroviral mediada de CR en las células T en general requiere la activación de células T cuya activación se consigue normalmente mediante el uso combinado de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Tal activación previa fue suficiente para cebar las células T que responden a una señal mediada a través del CR tras la interacción con el antígeno para el que el CR es específico tanto *in vitro* como *in vivo* (por ejemplo, Schwartz RH; Annu Rev Immunol 2003; 21: 305-34). Una señal coestimuladora es ventajosa para la función óptima y sostenida de las células T y reactivación impulsada por el antígeno, incluso mediante objetivos que a menudo carecen de ligandos para moléculas coestimuladoras.

25 La estimulación del antígeno solo de los CR que carecen de una estructura o mecanismo para señalización coestimuladora es generalmente inadecuada para activar a los linfocitos en descanso o sin alteración (Brockner T y colaboradores, J Exp Med 1995; 181: 1653-9). Por lo tanto, en ausencia de señalización coestimuladora por CD28, los linfocitos T en reposo normalmente experimentan anergia o apoptosis (Boussiotis VA y colaboradores, Immunol Rev 1996; 153: 5-26). Para una discusión adicional de CD28 y sus interacciones con B7, consultar también, L. Chen (ed.) 30 The B7-CD28 Family Molecules, Landes Bioscience, 2003, que se incorpora por referencia en su totalidad.

35 Para superar estas limitaciones en los CR utilizados en la presente invención, el primer dominio (reconocimiento), preferiblemente un dominio de scFv, se enlaza preferiblemente a través de un espaciador de bisagra de la Ig y segmentos transmembrana al segmento intracelular de una molécula de señalización coestimuladora, preferiblemente CD28, y luego a una región de activación intracelular, tal como de la cadena  $\zeta$  de CD3 o la cadena  $\gamma$  de FcR. Se encontró que la coexpresión de dos CR, cada uno con el mismo scFv, el primero enlazado a  $\zeta$  de CD3 y el segundo a CD28, proporciona las señales estimuladoras y coestimuladoras necesarias para la activación de células T (Beecham EJ y colaboradores, J Immunother, 2000; 23: 631-42).

40 Por lo tanto, en una realización preferida en la presente invención, un sitio de reconocimiento extracelular, preferiblemente un sitio de reconocimiento con base en el anticuerpo tal como un scFv, se enlaza a un dominio intracelular de CD28 "en serie" y además se enlaza a la región de señalización intracelular de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR. Tal constructo era 20 veces más potente en la estimulación de la producción de IL-2 tras la exposición al antígeno en fase sólida (en comparación con los CR que expresan transfectantes que carecen del dominio de CD28 (Finney HM y colaboradores, J Immunol 1998; 161: 2791-7)). Intracelularmente, este dominio en el CR se une a la subunidad p85 de fosfatidilinositol 3'-quinasa.

45 Uno de los presentes inventores diseñó un CR tripartita novedoso compuesto de un fragmento de reconocimiento de scFv fusionado a la parte que no se une al ligando del dominio extracelular (ECD) de CD28, toda la transmembrana y dominios intracelulares de CD28, y el dominio estimulador intracelular de FcR $\gamma$  ("scFv-CD28- $\gamma$ ") (Eshhar y colaboradores, 2001, citado más arriba). Los PBL humanos transducidos con un constructo de ácido nucleico que codifica este CR fueron específicamente estimulados para producir IL-2. La activación dependió de la actividad 50 coestimuladora de CD28.

55 El laboratorio de los presentes inventores ha generado varias líneas de ratones Tg que expresan CR bajo el control de secuencias reguladoras específicas de células T. Los linfocitos T de ratones no modificados sin imprimación, que son Tg para las respuestas potentes manifestadas por el TpCR scFv-CD28- $\gamma$  (proliferación, secreción de IL-2, y rescate de la apoptosis) tras la estimulación únicamente por el antígeno afin en forma inmovilizada (Friedmann-Morvinski D y colaboradores, citado más arriba).

De acuerdo con la presente invención, moléculas distintas de, o además de, CD28 son explotadas para proporcionar señales coestimuladoras cuando se incluye en la presente configuración de CR. Los ejemplos preferidos de estas son los miembros de la familia "coestimuladora inducible" (ICOS), que incluye OX40 (CD 134), al ligando CD40 (CD40L, CD154), PD-1 ("receptor 1 de muerte programada"), y 4-1BB (CD137). Cada uno de estos pares ligando/receptor posee funciones distintas que difieren de acuerdo con la naturaleza del estímulo y la "historia antigénica" de las células T en las que se expresan. Por ejemplo, la señalización de CD28 está acompañada por inducción de ICOS, que, a su vez, coestimula la activación de células T CD4+. El acoplamiento de OX40 (estudiado en el contexto de inmunoterapia adoptiva específica del tumor) mejoró la supervivencia y las acciones antimetastásicas de las células T efectoras mediante un mecanismo que depende de células T auxiliares CD4+ (Weinberg AD, Trends Immunol 2002; 23: 102-9). La activación de OX40 promueve la expresión de proteínas antiapoptóticas *Bcl-XL* y *Bcl-2* y, en consecuencia, mejora la supervivencia y por lo tanto el número de células T CD4+ específicas del antígeno, dando como resultado una memoria más fuerte de células T CD4+ específicas del antígeno. El acoplamiento del receptor coestimulador 4-1BB (CD137) con su ligando, 4-1BBL, aumentó la proliferación, supervivencia y producción de citoquinas inducidas por TCR tanto en células T CD4+ como CD8+ (Cheuk AT y colaboradores, The Cancer Gene 2004; 11: 215-26). La supervivencia celular se asoció con una mayor expresión de los genes antiapoptóticos *bcl-XL* y *bfl-1*. En general el par que interactúa ligando/receptor 4-1BB/4-1BBL actúa para amplificar señales coestimuladoras existentes, en particular las que emanan de CD28 (Guinn BA y colaboradores, J Immunol 1999; 162: 5003-10). Las células T CD4+ humanas expresan PD-1 y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, tras la activación. Los anticuerpos para el receptor pueden ser agonistas o antagonistas de la vía apoptótica. El acoplamiento de PD-1 puede promover la coestimulación mediada por ICOS o CD28. (por ejemplo, Bennett F y colaboradores, J Immunol 2003; 170: 711-8).

La actividad de los dominios coestimuladoras de CD28, ICOS, OX40 (CD134), y 4-1BB (CD137) en los CR también se conoce en células T CD4+ y CD8+ humanas (Finney HM y colaboradores, J Immunol 2004; 172: 104-13). En ese estudio, los genes tripartitos se sometieron a electroporación en las células para evitar la activación previa de las células. Cuando las células T que portan CR fueron estimuladas por su antígeno específico (CD33), mejoró dramáticamente la liberación de citoquina y la actividad citotóxica en comparación con las células en las que los CR carecían de estructuras de señalización coestimuladoras. La inclusión del dominio de señalización 4-1BB como fracción coestimuladora en un TpCR en linfocitos T humanos con especificidad contra el antígeno CD 19 (anti-CD 19-1BB- $\zeta$ ) dio lugar a una potente citotoxicidad contra las células objetivo de leucemia linfoblástica aguda que portan CD19 *in vitro* (Imai C, y colaboradores, 2004; 18: 676-84).

Aunque la presente invención incluye el uso de un dominio intracelular o parte de cualquiera de estas secuencias coestimuladoras en el CR, no es seguro que la señalización evocada por estas moléculas tenga ventajas prácticas sobre el uso de las secuencias coestimuladoras CD28 solas. Por lo tanto, a pesar de que el desempeño de CD28 parece hasta ahora ser muy satisfactorio tanto *in vitro* como *in vivo*, la presente invención incluye dentro de su alcance el uso de sistemas coestimuladores adicionales o alternativos para CD28 para la generación de células T reguladoras que se comportan de manera óptima en la supresión de las células T efectoras y el tratamiento autoinmune/inflamatorio y otras condiciones como se describe aquí. 4-1BB ha sido utilizado con éxito como una alternativa a CD28 en cuerpos T. Ver Zhang y colaboradores, J. Immunol, 2007; 179: 4910-4918.

#### Transferencia de células T reguladoras redirigidas a los sujetos receptores

El uso de células T transferidas *in vivo* en terapia adoptiva requiere que las células transferidas sobrevivan, superen los mecanismos de control homeostáticos del huésped que pueden servir para obstaculizar la aceptación de estas células, y migren (permanezcan, o circulen) y se acumulen o se localicen en, el(los) sitio(s) objetivo deseado(s).

El sistema inmune utiliza estímulos internos para regular el tamaño total de combinaciones de linfocitos. El número total de linfocitos T periféricos se mantiene bastante constante, a pesar de la producción de nuevas células, renovación de las células existentes, y la expansión clonal de células específicas del antígeno durante una respuesta inmune (Jameson SC. Nat Rev Immunol 2002; 2: 547-56). Estos "estímulos internos", incluyen citoquinas y ligandos del MHC del mismo péptido para el TCR. Se cree que al menos dos mecanismos generales son los responsables de los efectos homeostáticos de las células T espectadoras en la limitación de la proliferación: (1) la inhibición por interacciones físicas de las células T con células T; y/o (2) competencia por los "recursos" limitados (por ejemplo, IL-7 y el acceso a las APC con ligandos adecuados propios del MHC). Las citoquinas más importantes en este proceso son las que señalizan a través de receptores que contienen una cadena y común, denominadas colectivamente "citoquinas  $\gamma$ C". Estas incluyen IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, e IL -21. El control homeostático de la expansión de células T no modificadas (examinadas *in vitro*) está soportado por IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21 a través de la región transmembrana CD28, mientras que sólo parece requerirse de IL-7 *in vivo* (Jameson, citado más arriba).

El agotamiento de los linfocitos o "destrucción de linfocitos" se lleva a cabo preferiblemente para acondicionar un receptor de las células T reguladoras transducidas de la presente invención. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, irradiación, tratamiento con ciertos antimetabolitos tales como fludarabina, etc. Tales tratamientos han sido utilizados en combinación con terapia adoptiva de células T en otros contextos. Se sabe que el agotamiento de los linfocitos *in vivo* realizado como una etapa previa de la transferencia adoptiva de células refuerza la actividad inmunoterapéutica antitumoral en ratones y en seres humanos (como se estudió particularmente

5 con células T efectoras autólogas reactivas a los tumores; Klebanoff CA y colaboradores, Trends Immunol 2005; 26: 111-7). En ensayos clínicos, se observaron tasas de respuesta objetivas del 50% en pacientes con tumores metastásicos sólidos que habían sido sometidos primero a agotamiento de linfocitos. Los mecanismos que se cree que son la verdadera razón de tales efectos incluyen: la eliminación de los 'sumideros' de citoquina celular para citoquinas yC homeostáticas (tales como IL-7, IL-15 y, posiblemente, IL-21 (que sirven para activar y expandir las células T efectoras )), la inducción de apoptosis de células tumorales y necrosis junto con la activación de APC, y, lo más importante para la presente invención, el deterioro de las células Treg CD4+CD25+ que suprimen las células T efectoras.

10 Como se ha indicado, el tratamiento con citoquinas homeostáticas se puede utilizar para mantener las poblaciones de Treg en el receptor.

15 El presente grupo de inventores encontró que la activación de las células T en general y, de cuerpos T en particular (tal como la que se requiere durante manipulaciones *ex vivo* para expresar el CR con ciertos vectores) subreguló la expresión del receptor de quimoquinas CXCR4, deteriorando de este modo la vuelta al reposo de las células T en respuesta a la quimoquina SDF-1, por ejemplo. SDF-1 es un quimioatrayente para células T que expresan el CXCR4 (Bleul CC y colaboradores, JExp Med 1996; 184: 1101-9; Beider K y colaboradores, Blood 2003; 102: 1951-8). El uso de cuerpos T humanos específicos de ErbB2-T; estos investigadores mostraron que esta vuelta al reposo es un paso esencial para que las células T efectoras actúen *in vivo*, medido como inhibición del progreso del cáncer de próstata avanzado e incluso la cura (Pin thus y colaboradores, citado más arriba). Con base en el conocimiento anterior, de acuerdo con la presente invención, las células Treg redirigidas deben o bien volver al reposo/migrar a los sitios objetivo deseados o ser administrados a tales sitios.

20 Persistencia de las respuestas de células T que portan TpCR

25 Un factor clave para el éxito de la terapia de células T adoptivamente transferidas (que hasta ahora ha sido examinado más a fondo con las células T efectoras en el cáncer) es el mantenimiento de la función de las células T transducidas (efectoras). En una realización de la presente invención, se desea mantener la función de las células T reguladoras que han sido administradas para realizar una función de supresión. En otra realización, puede ser preferible que las Treg actúen en "ráfagas" más cortas para reducir una respuesta efectora T más aguda (en lugar de una crónica).

30 Debido a que los linfocitos que se encuentran en pacientes con tumores incluyen células Treg CD4+ CD25+ que suprimen las células T efectoras (Wang HY y colaboradores, Immunity 2004; 20: 107-18; Curiel TJ, y colaboradores, Nat Med 2004; 10: 942- 9), tal actividad supresora "endógena" debe ser superada para optimizar la acción de las células T efectoras redirigidas. En la presente invención, el objetivo es lo contrario: se administran las células Treg redirigidas a un sujeto que lo requiera para reprimir o bien inhibir las respuestas inmunes/inflamatorias que caracterizan las condiciones autoinmunes, el rechazo de trasplantes, etc.

Ejemplos de ensayos clínicos utilizando células T redirigidas

35 Si bien los ensayos clínicos utilizando células T reguladoras, de acuerdo con la presente invención aún no han sido llevados a cabo, se describen a continuación una serie de ensayos que utilizaron células T efectoras redirigidas que portan CR. Se pueden aprovechar diversas lecciones aprendidas en estos ensayos para llevar a cabo la presente invención.

40 En la fase I de un ensayo en sujetos infectados con el VIH, se administraron linfocitos autólogos que portan un CR CD4-ζ (Mitsuyasu RT, y colaboradores, 2000, Blood 96: 785-93). De 24 pacientes, 11 recibieron también infusiones concurrentes de IL-2 durante 5 días. El tratamiento fue bien tolerado. En algunos pacientes, se observó una disminución transitoria de la carga viral en plasma y la mucosa rectal (el depósito de tejido para el VIH). Todos los sujetos dieron negativo para el retrovirus competente para la replicación (el vector de administración) por hasta 1 año después de la infusión.

45 Cell Genesys, Inc. llevó a cabo ensayos clínicos de fase I en pacientes con cáncer colorrectal utilizando un CR anti-TAG72-ζ elaborado a partir del mAb humanizado CC49 (Warren R y colaboradores, En: 7ª Conferencia Internacional sobre Terapia Génica del Cáncer; 1998).

El grupo de Junghans probó 24 dosis de linfocitos que portan CR cuya especificidad del antígeno fue dirigida a CEA en pacientes con cáncer colorrectal. Se suministraron hasta 10<sup>11</sup> células/paciente. El tratamiento fue tolerado de forma adecuada (Junghans R y colaboradores, Proc Am Assoc Can Res, 2000, 41: 543).

50 Hwu y colaboradores en el Instituto Nacional del Cáncer llevaron a cabo un ensayo clínico de fase I en pacientes con cáncer de ovario usando cuerpos T que expresan un CR dirigido contra la proteína de unión anti-folato murino de MoV18. Se infundieron grandes dosis de células modificadas en los pacientes junto con la administración controlada de IL-2. No se reportaron efectos secundarios adversos. Se encontraron anticuerpos neutralizantes específicos para

determinantes de mAb de MoV18 murino en los sueros de varios pacientes (Kershaw MH y colaboradores, Clin Canc Res, 2006; 12: 6106-15.

5 Un ensayo clínico en fase I en cáncer de células renales (CCR) empleó linfocitos T modificados genéticamente específicos de G250 autólogo (Lamers CHJ y otros, Daniel den Hoed, Cancer News, 2004, 2: 8-10). Las infusiones de estas células fueron clínicamente bien toleradas. Después de 4-5 infusiones, los pacientes comenzaron a desarrollar alteraciones de las enzimas hepáticas, un hallazgo explicado por la reactividad de las células T infundidas con G250L expresado en el epitelio del conducto biliar, aunque a niveles bajos. El tratamiento se limitó por lo tanto a dosis bajas de cuerpos T que expresan CR. Los resultados mostraron en cualquier caso que las células T redirigidas ejercieron funciones dictadas por CR *in vivo*.

10 Se han iniciado otros dos ensayos clínicos de fase I a pesar de que sus resultados aún no se han reportado para el mejor conocimiento de los inventores. Un ensayo de fase I trató pacientes con neuroblastoma con PBL y CTL específicos del virus de Epstein Barr, que expresan ambos receptores de células T quiméricas específicas de GD-2 (Brenner MK. www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00085930, 2005). El otro ensayo emplea CTL CD8+ específicas de CD20 modificada genéticamente para el linfoma folicular recidivante (Wang J, y colaboradores, Mol Ther 2004; 9: 577-15 86).

Los presentes inventores reconocen que ciertos acontecimientos pueden interferir con la eficacia de la terapia utilizando células Treg que expresan CR *in vivo* en humanos, por ejemplo:

(1) la formación de anticuerpos anti-idiotípicos neutralizantes dirigidos a un idiotipo de la parte de scFv del CR que podría reducir la esperanza de vida o la eficacia de las células T reguladoras;

20 (2) la baja proporción de células modificadas que eventualmente alcanzaron los sitios objetivo; y

(3) el daño potencial al tejido sano que expresa el antígeno específico.

25 El uso de células T reguladoras de acuerdo con la presente invención tiene un riesgo mucho menor de (3). Como se describe aquí, la administración directa de células T reguladoras a los sitios de inflamación debe superar la limitación de (1) - (3). Se espera que el ajuste de los regímenes de dosis (número de células, la frecuencia de administración) utilizando consideraciones clínicas de rutina para limitar el impacto de los factores limitantes anteriores.

De acuerdo con la presente invención, se administra una cantidad eficaz de las células Treg redirigidas a un sujeto. Los vehículos preferidos para las células Treg son regulados de fosfato, preferiblemente 0,01-0,1 M, más preferiblemente 0,05 M, o solución salina al 0,8%. Los diluyentes o portadores aceptables para diversas vías de administración son bien conocidos.

30 Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de un determinado tipo de células para una enfermedad o condición en particular está dentro de la experiencia de la técnica. La dosificación administrada será dependiente de la edad, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. La determinación de las cantidades eficaces puede hacerse fácilmente empíricamente por parte de aquellos ordinariamente capacitados en la técnica sin 35 experimentación indebida.

Las dosis típicas están entre aproximadamente  $10^6$  y aproximadamente  $10^{11}$  células Treg por inyección o infusión, más preferiblemente, aproximadamente  $10^7$  hasta aproximadamente  $10^{10}$  células. Si se va a administrar un antígeno con las células (o por separado, pero en un sitio en el que se pretende activar las células), se prefiere una dosis de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg/de peso corporal, preferiblemente de 0,1 a 50 mg/kg/de peso corporal.

40 Una cantidad eficaz de células Treg es aquella que se necesita para inducir un cambio medible, en general una disminución en la severidad de cualquier síntoma medible de la enfermedad, preferiblemente más de un síntoma, y lo más preferiblemente, que daría lugar a la cesación de los síntomas y la curación de la enfermedad o condición. Por ejemplo, sin limitar la invención, la disminución anterior puede ser al menos aproximadamente del 10%, más preferiblemente al menos aproximadamente del 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente del 30%, incluso 45 más preferiblemente, al menos aproximadamente del 40%, y más preferiblemente, al menos aproximadamente del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99%. Está dentro de la capacidad de un médico tratante determinar cuando se han logrado estos objetivos terapéuticos, y ajustar la dosis o frecuencia de administración en consecuencia, o cesar el tratamiento adicional.

50 Las células Treg de la invención pueden administrarse una vez o en múltiples ocasiones, a través de una o diversas rutas. Las células se pueden administrar diariamente, o, preferiblemente, en días alternos, preferiblemente semanalmente o cada dos semanas. La administración puede hacerse en un intervalo de varios días a semanas, o incluso meses o años. La frecuencia y duración de la administración pueden determinarse empíricamente, o con base

en la historia clínica y la experiencia del sujeto.

Las composiciones celulares de la presente invención se pueden administrar mediante cualquiera de una serie de medios y rutas conocidas en la técnica. La administración es preferiblemente parenteral. Las vías preferidas incluyen, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraarticular, intracerebroventricular, intraluminal (preferiblemente en el lumen del íleon o colon), rectal o la vía tópica. También se incluye la ruta "intratecal", que se pretende que abarque inyección, infusión o instilación directamente en una cavidad o espacio (teca) que rodea un órgano o región corporal en la que se produce una respuesta inflamatoria/inmune no deseada. Dichos espacios incluyen el espacio pleural, peritoneal, el espacio subaracnoideo o espacio dural, o el espacio pericárdico. El término genérico para la administración en una envoltura que encierra un órgano se denomina "intratecal" (véase, por ejemplo, la definición en Dorland's Medical Dictionary, vigesimonovena edición, WB Saunders (2000) y en Stedman's Medical Dictionary, vigesimoséptima edición, Lippincott, Williams & Wilkins (2000)) que significa "dentro de una envoltura". Como se usa en este documento, este término pretende ser más amplio que una definición más comúnmente utilizada, que se limita a los espacios intracraneales.

Las composiciones, métodos y productos de esta invención son aplicables a los usos humanos y veterinarios. El sujeto preferido es un ser humano.

#### Ratones transgénicos que expresan receptores quiméricos específicos de TNP

Se describen en la presente memoria varias cepas de ratones Tg que expresan al TpCR específico de TNP, que fueron producidos recientemente por los presentes inventores y sus colegas (Friedmann-Morvinski D, 2005). Estos ratones son la fuente de células T efectoras y células T reguladoras específicas de TNP y se utilizan como animales de experimentación en los que se evalúa la inducción de la colitis mediante el hapteno reactivo "clásico", TNBS. Como control de estas células que portan CR, se usan células de ratones TpCR Tg específicos de erbB-2 que fueron producidos en el laboratorio de los presentes inventores, ya que expresan un CR específico para un antígeno irrelevante.

Todas las células T maduras y células NK en estos ratones Tg expresan el constructo scFv-CD28-FcRy. Las células T de Tg no manipulado pueden ser activadas completamente mediante TNP inmovilizado sobre plástico sin la necesidad de sensibilización previa. (Friedmann-Morvinski D, y colaboradores, citado más arriba). Los resultados en los Ejemplos de este documento muestran que las Treg CD4+CD25+ esplénicas aisladas de tales ratones suprimen específicamente la proliferación y la secreción de citoquinas mediante las células T efectoras específicas de TNP. Además, estas Treg son responsables del retraso en el desarrollo y la atenuación de la colitis inducida por TNBS en estos animales. De importancia es el hecho de que el nivel de células T reguladoras en la periferia de las cepas que expresan TpCR específico de TNP es mayor que en ratones de tipo silvestre (WT) y que las células T reguladoras no requieren de activación previa para exhibir su actividad supresora *in vivo*. Se cree que es el resultado de la reactividad cruzada del mAb SP6, del cual se deriva el scFv del TpCR.

#### Administración de ADN que codifica el CR en células T

La modificación genética de las células T periféricas humanas se logra en una realización mediante el uso de vectores retrovirales (Eshhar Z, y colaboradores, 2001, citado más arriba). Como ejemplo no limitante, se utiliza el vector pBullet, en el que se introduce el ADNc que codifica CR (Weijtens ME, y colaboradores, 1998). Se usa un constructo de expresión bicistrónico en el que se expresan el ADNc de TpCR y de eGFP bajo el control del LTR. Esto sirve para generar una célula de empaquetamiento basado en PG13 que se utiliza para el pseudotipado del vector retroviral con el virus de la leucemia del mono gibón (GALV). Se hizo una clasificación por citometría de flujo con base en la expresión de eGFP, y se seleccionan las células de empaquetamiento que producen viriones de alto título para conseguir una alta eficacia de la transducción.

Para transducir los linfocitos humanos de donantes sanos, los linfocitos se activan en cultivo con mAb anti-CD3 y anti-CD28 unido a la placa (o el uso de microperlas comerciales recubiertas con estos anticuerpos, por ejemplo de Invitrogen, Miltenyi Biotec, Inc.) y se transfieren a placas revestidas con placas de RetroNectin<sup>MR</sup> (fragmento de fibronectina CH-296) junto con sobrenadantes frescos tomados de las células de empaquetamiento. Al final del proceso que toma 5-8 días, las células se propagan en presencia de IL-2 y, a continuación se recogen y se utilizan. Siguiendo este procedimiento *ex vivo*, 45-70% de las células son positivas para la expresión de CR (y GFP).

Los reactivos adicionales útiles son anticuerpos antiidiotípicos contra idiotipos del scFv del TpCR. Estos permiten la marcación directa y visualización de TpCR en las membranas celulares. Tales anticuerpos contra el scFv SP6 (ejemplificado más abajo) han sido elaborados y utilizados por los presentes inventores.

Una secuencia de nucleótidos anotada (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) del TpCR específico de TNP usado en este documento se muestra en la Figura 27. La proteína madura comienza en el residuo de aminoácido 23 de la SEQ ID NO: 2.

Una secuencia preferida que excluye el scFv anterior, y que puede enlazarse con cualquier otra región apropiada de unión al ligando, preferiblemente un scFv específico diferente para otro antígeno, es la definida por las secuencias anteriores que comienzan en la región de CD28. Por lo tanto, una secuencia preferida que codifica nucleótidos es de los nucleótidos 2203 - 2523 de la SEQ ID NO: 1 y los aminoácidos 260-367 de la SEQ ID NO: 2. Los nucleótidos adicionales que comprenden un sitio de restricción 5', y aminoácidos "inadvertidamente" codificados por los mismos, también se pueden incluir en una secuencia preferida. La secuencia de codificación adicional añadida en el extremo 3' de 2203 a 2523 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos adicionales codificados por la misma y añadidos al terminal C de 260 a 367 de la SEQ ID NO: 2, pueden estar presentes, siempre que permitan la secuencia codificada, tal como se expresa en las Treg redirigidas, para funcionar como un TpCR en las formas descritas en este documento. Los expertos en la técnica de la tecnología de clonación y de ADN recombinante entenderán cómo modificar estas secuencias para lograr el objetivo deseado sin experimentación indebida.

Los vectores de expresión que comprenden las secuencias anteriores también se utilizan en la presente invención, en la producción de las Treg que expresan TpCR.

#### Generación y expresión de TpCR y el gen de fusión Foxp3-GFP y su expresión

Las células T redirigidas son "convertidas" en Treg haciéndoles expresar tanto el factor de transcripción Foxp3 como el TpCR específico del antígeno. Tal manipulación permite la producción de grandes números de Treg para la evaluación y uso terapéutico. El éxito de la transducción o expresión conjuntas se prueba mediante la inclusión de un gen de fusión Foxp3-GFP en el mismo constructo que un TpCR para expresar ambos en las mismas células. Este enfoque es particularmente útil cuando las poblaciones de células de partida son PBL humana en los que las Treg constituyen sólo aproximadamente 3-5% de las células T CD4+. Esto evita las complicaciones de otro enfoque, también dentro del alcance de la invención, en el que se requiere la propagación a gran escala de Treg para la transducción eficaz con vectores retrovirales. Además, simplificará el aislamiento de las Treg y evaluación de su destino *in vivo*.

En un ejemplo no limitante, se clona ARN mensajero (ARNm) para Foxp3 a partir de células T reguladoras purificadas usando PCR. Se clona ADNc de Foxp3 en un plásmido eGFP Clontech para crear una proteína de fusión Foxp3-GFP. Se clona la proteína de fusión en el vector pBullet que contiene TpCR insertado después de un IRES para crear un vector de expresión bicistrónico. Tanto un vector retroviral del gen único Foxp3-GFP como un vector retroviral del gen doble TpCR-IRES-Foxp3-GFP bicistrónico son transducidos en células T aisladas de sangre periférica humana CD4+ CD25- después de su activación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Las células resultantes se analizan por la expresión de los tres genes mediante FACS utilizando (1) anticuerpos antiidiotípicos específicos para el idiotipo del scFv, o anticuerpos de la región anti-bisagra y (2) GFP intracelular y Foxp3 mediante la tinción de células fijadas con anticuerpos primarios específicos para Foxp3 (Alexis Biochemicals, Lausana, Suiza).

En otra realización, se utilizan los protocolos de expresión secuencial (primero TpCR y luego los genes Foxp3-GFP) o los protocolos de expresión conjunta. Una vez que los genes se expresan, se puede obtener un número relativamente grande de células T reguladoras y se separan por medio de un clasificador de células (clasificación de células activadas por fluorescencia FACSaria (Becton Dickinson, Mountain View, CA), clasificando las células que expresan conjuntamente GFP y TpCR.

El constructo de Foxp3 puede estar en la forma de un vector bicistrónico que incluye ADN que codifica una molécula informadora tal como una proteína fluorescente. Las moléculas informadoras adecuadas son bien conocidas en la técnica e incluyen proteínas fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicas, por ejemplo la proteína fluorescente verde (GFP) o la proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP) o un homólogo fluorescente de la misma, la proteína luciferasa de luciérnaga (codificada por el gen Luc), las enzimas cloranfenicol acetil-transferasas (CAT), o LacZ bacteriana, ( $\beta$ -galactosidasa) o el gen de la timidina quinasa (codificada por el gen HSV1 TK. GFP y EYFP se detectan por fluorimetría o histoquímica de fluorescencia; algunas enzimas se detectan mediante el uso de un sustrato cromogénico que se convierte en un producto coloreado que se puede utilizar en la detección colorimétrica histoquímica de la actividad enzimática. La luciferasa se mide por la activación de la luciferina que emite luz a una longitud de onda conocida. Las moléculas informadoras pueden ser detectadas *in vivo* mediante técnicas de detección no invasivas tales como la formación de imágenes ópticas por fluorescencia (FOI), formación de imágenes ópticas por bioluminiscencia (BOI), un dispositivo acoplado cargado y enfriado (CCD), formación de imágenes ópticas mediante una cámara (CCOI) y tomografía por emisión de positrones (PET).

Se demostró que la infección de linfocitos T CD4+CD25- humanos con vectores retrovirales que portan el gen Foxp3 convierte estas células en unas que tienen un fenotipo de Treg (Walker y colaboradores, 2005, citado más arriba; Wan y colaboradores, 2005, citado más arriba).

Cualquier método para introducir ADN en una célula y expresarlo puede ser utilizado en la presente invención, incluyendo, pero no limitado a vectores tales como vectores retrovirales o lentivirales, electroporación, lipofección, y similares.

La funcionalidad de las Treg redirigidas se puede determinar mediante pruebas de cocultivo como se describe en los Ejemplos. Si se van a utilizar APC en estos ensayos, una fuente preferida es la de monocitos irradiados. El antígeno se carga en APC humanas irradiadas que lo presentarán a células T efectoras y células T reguladoras. En el caso de antígenos tales como CEA, se pueden usar células de carcinoma de colon humano transfectadas de forma estable con el epítipo de CEA. En dichos ensayos de cocultivo, se puede detectar la activación específica de células T reguladoras que portan TpCR a través del TpCR. La activación de Treg se evalúa mediante el examen de la acción de estas células en la (1) proliferación de células T efectoras y (2) el perfil de secreción de citoquinas, centrándose en IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  (utilizando kits comerciales de ELISA, por ejemplo, el kit de ELISA Ready-Set Go, eBioscience, CA). Se prefiere analizar TGF- $\beta$  y/o IL-10 como una indicación del fenotipo de las células Treg.

En una realización preferida, la presente invención dirige Treg a los sitios de inflamación del colon, mediante la introducción en dichas células de CR con especificidad de tipo anticuerpo. En los sitios de inflamación se activan las células T reguladoras redirigidas para suprimir la respuesta inmune asociada a la IBD. Las Treg dotadas con especificidad predefinida migran y regresan a los sitios inflamados en el colon, donde se someten a la activación y, como resultado, suprimen las células T efectoras que median los procesos de la enfermedad.

Las presentes Treg redirigidas representan una forma novedosa de 'cuerpos T' discutidos más arriba y se emplean como una modalidad terapéutica novedosa en la IBD. Estos cuerpos T son células T que han sido modificadas genéticamente para expresar TpCR en donde una región variable del anticuerpo es la unidad de reconocimiento enlazada a los dominios coestimuladores y estimuladores de células T que permiten la activación específica de estas células T, pero en una forma que es independiente del MHC y no restringida al MHC. Sobre la base de estudios previos utilizando modelos de tumores descritos anteriormente, estas células T reguladoras redirigidas se ponen a prueba en modelos murinos de modelos de IBD.

Un aspecto importante de esta invención es la concepción de los inventores de que, en el contexto del tratamiento de la IBD, el(los) antígeno(s) asociado(s) con el colon a los que se redirigen y enfocan los cuerpos T no son necesariamente los autoantígenos patógenos reconocidos por las células T efectoras autoagresivas. Por lo tanto, esta invención puede explotar el fenómeno de reactividad "espectadora" - donde la presencia de los antígenos pertinentes en los sitios de las reacciones inflamatorias sirven para atraer y "mantener" o localizar las Treg redirigidas, permitiéndoles ser activadas y ejercer su efectos supresores de una forma paracrina - que actúan sobre las células efectoras objetivo en el entorno con independencia de las diferencias en la especificidad del antígeno de las células T efectoras y las células Treg.

Antígenos del colon CEA y de LPS como objetivos para las Treg humanas redirigidas en la IBD

Se sacó ventaja de un modelo de IBD específico de hapteno que se basa en la especificidad por el hapteno TNP para estudiar los efectos supresores de las Treg. En la enfermedad humana, otros antígenos que se expresan en el tejido intestinal o del colon, ya sea normalmente o en el estado de la enfermedad en cuestión son los objetivos preferidos. Incluyen el antígeno carcinoembrionario, CEA, y los antígenos de la flora bacteriana tales como lipopolisacáridos, LPS.

La IBD humana es idiopática hasta el punto en que el(los) antígeno(s) patógeno(s) sigue(n) siendo desconocido(s). La falta de conocimiento del antígeno parece ser un obstáculo para la implementación clínica de los cuerpos T. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, no hay ningún requisito de que un antígeno patógeno también deba ser el antígeno objetivo para el redireccionamiento y activación de las Treg. La activación de Treg es de hecho específica del antígeno y por lo tanto depende de los TCR, o en las presentes células T reguladoras, de la especificidad basada en anticuerpos, asociada con la coestimulación junto con la activación/mediada por las fracciones de señalización intracelulares de los presentes constructos. Sin embargo, una vez se activan las células T reguladoras, su acción supresora es independiente del antígeno, y se lleva a cabo mediante la secreción de citoquinas supresoras (por ejemplo, TGF- $\beta$  e IL-10), incluso después de que se ha eliminado el antígeno de activación. Por lo tanto, la inducción de la activación de Treg del colon por cualquier antígeno local asociado al colon promoverá la activación y proliferación potente de Treg, mientras que la acción de estas células en la inhibición de procesos inflamatorios locales procede de forma independiente del antígeno. CEA se sobreexpresa significativamente en el tejido enfermo del colon en pacientes con colitis ulcerosa activa en comparación con individuos normales y con pacientes con IBD inactiva (Smithson JE y colaboradores, J Pathol. 1996; 180: 146-51; Pavelic ZP y colaboradores, Anticancer Res. 1991; 11: 1671-5). Esta expresión mejorada en el tejido de CEA era independiente de los cambios displásicos y es un resultado de la reacción de la mucosa al proceso inflamatorio mismo. Por lo tanto, CEA es un candidato preferido para la focalización de TpCR de Treg en la colitis ulcerosa activa.

Un segundo antígeno candidato (o ligando "no antigénico") al cual se pueden redirigir las Treg es endotoxina o LPS, derivada de la membrana externa de las bacterias Gram negativas residentes en el colon. En una realización, la parte similar al anticuerpo (scFv) la región de reconocimiento extracelular del CR se puede derivar de un anticuerpo anti-LPS, tal como el mAb producido por el hibridoma con ATCC con No. de acceso HB9081. La secuencia de nucleótidos de un scFv elaborada a partir de este mAb se muestra como una anotación en la Figura 29 como parte de la secuencia completa de un plásmido (pBullet) que comprende este scFv - SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, una Treg que expresa un TpCR que muestra este scFv extracelularmente, en un sitio donde LPS está presente tal como el tejido de colon inflamado (si el lumen del intestino, la lámina propia o incluso los ganglios linfáticos regionales y otros tejidos linfático

asociados al intestino) se unirá al LPS y será activada para causar la supresión de las células T efectoras en el entorno de una forma no específica del antígeno e independiente del MCH.

Se conocen en la técnica varios tipos de receptores de LPS que no son anticuerpos. CD 14 (SEQ ID NO: 4) es una clase de receptor de LPS que es una glicoproteína de 356 aa anclada a GPI. Contiene un péptido señal de 19 aa, un dominio extracelular que contiene 11 dominios de repetición ricos en leucina (LRR), 4 sitios de N-glicosilación y un número desconocido de sitios de O-glicosilación. Se han descrito al menos 2 formas solubles de CD 14, una retiene GPI y se libera de la superficie de la célula que da lugar a una molécula de aproximadamente 48 kDa y la otra se libera antes de la adición del anclaje a GPI que resulta en un mayor peso molecular (> 48 kDa).

Si bien LPS interacciona con CD 14, CD 14 no es capaz de iniciar una señal de activación transmembrana porque es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI). De este modo, LPS debe interactuar con un receptor(es) transmembrana que es responsable de la transducción de señales. LPS es reconocido por el receptor de tipo toll TLR4 y MD-2 (SEQ ID NO: 5; humano), una molécula asociada con el dominio extracelular de TLR4. CD14 mejora en gran medida la formación de complejos LPS-TLR4-MD-2, al parecer cargando LPS sobre TLR4-MD-2 pero no en la propia interacción entre LPS y TLR4-MD-2. (Akashi S, y colaboradores, J. Exp Med 198: 1035-1042 (2003)).

La interacción de LPS con MD-2 en un complejo TLR4-MD-2 activa una cascada de transducción de señal intracelular que conduce a la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias, en particular TNF- $\alpha$  (Dauphinee SM y colaboradores, 2006, Lab. Invest. 86, 9-22). Los pacientes con IBD muestran aumento de los niveles en colon y suero de endotoxina, LBP, CD14, y MD-2 (Pastor Rojo O, y colaboradores, 2006, Inflamm Bowel Dis., Dic 19 (epub); Amati L y colaboradores, Curr. Pharm Des 2003; 9: 1937-1945; Cario E y colaboradores, J Immunol. 2006; 176: 4258-66). Este cambio se correlaciona con la actividad de la enfermedad, y los niveles de citoquinas proinflamatorias vuelven a la normalidad después del tratamiento.

Un motivo de MD-2 humano, por ejemplo, a partir de los aminoácidos 119-132 (14 residuos) de la SEQ ID NO: \_ puede sustituir a MD-2 en el complejo MD-2-TLR4 uniéndose a la fracción de lípido A de LPS, que (Mancek M y colaboradores, Biochem Biophys Res Comm 2002; 292: 880-5; Kobayashi M y colaboradores, J Immunol 2006; 176: 6211-8).

Por lo tanto, en un TpCR preferido de la presente invención, la región de reconocimiento extracelular comprende, en lugar de una estructura similar a un anticuerpo (por ejemplo, un scFv), un receptor que se une a un ligando que no está actuando como un "antígeno". Un ligando preferido en la presente invención es LPS. Por lo tanto, la región de reconocimiento extracelular puede comprender cualquiera de las siguientes estructuras de los receptores:

(a) CD14 (SEQ ID NO: 4),

(b) un motivo de unión a LPS de CD 14, tales como los residuos 100-119 de la SEQ ID NO: 4,

(c) MD-2 de longitud completa (SEQ ID NO: 5),

(d) un motivo de unión a LPS de MD-2 (residuos 120-132 de la SEQ ID NO: 5),

(e) una combinación de un CD 14 y un MD-2 o

(f) una combinación de un motivo de CD14-motivo y un motivo de MD-2 (como la codificada por el segmento relevante del ácido nucleico quimérico de la SEQ ID NO: 10).

Cualquiera de estos constructos, cuando se despliega en una superficie de Treg, permitirán a la Treg redirigida unirse a, y ser activada por moléculas de LPS, por ejemplo, en los sitios inflamatorios del colon, y por lo tanto ejercer sus actividades supresoras alrededor de esos sitios. Nuevamente, esto es un ejemplo de unión/reconocimiento del receptor-ligando que no es "similar al anticuerpo" pero sin embargo permite que el TpCR actúe de acuerdo con esta invención y active células T reguladoras de una manera no específica del antígeno (e independiente del MHC).

La presente invención incluye una realización en la que las Treg redirigidas que portan un TpCR están diseñadas para ser específicas para un antígeno, denominado en este documento como "AgX", que puede tener una relación inherente con el tejido objetivo o la enfermedad a tratar. En esta realización, las Treg específicas para AgX se activan específicamente en un sitio seleccionado administrándolas junto con AgX a ese sitio. El sitio es uno donde se encuentran las células T efectoras y activas, donde la inflamación en curso debe ser suprimida. El receptor similar al anticuerpo específico de AgX de las Treg reconocerá AgX sin necesidad de presentación de antígenos, MHC, etc., y las fracciones de señalización enlazadas en el TpCR servirán para activar las células T reguladoras para liberar citoquinas inhibitoras en ese sitio. Este proceso dará lugar a la supresión no específica de las células T efectoras en curso y la actividad inflamatoria.

Los métodos y composiciones descritos en este documento son útiles para cualquiera de una serie de enfermedades

5 autoinmunes que implican actividad de células T efectoras no deseadas como una causa subyacente o como consecuencia de la fisiopatología. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, IBD, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, uveorretinitis autoinmune, orquitis autoinmune, insulinitis autoinmune, ovaritis autoinmune, psoriasis, polimiositis autoinmune y similares. Véase, por ejemplo, Theofilopoulos, A., en: Stites, DP y colaboradores, eds., *Basic and Clinical Immunology*, Lange Medical Publications, Los Altos, CA, 1988)).

Habiendo descrito ahora en forma general la invención, la misma se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención, salvo que se especifique de ese modo.

#### Ejemplo I

#### 10 Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se utilizan en varios de los Ejemplos que se presenta a continuación, así como en la realización de ciertas realizaciones de la invención.

#### Fraccionamiento y aislamiento de las células

15 Las células T reguladoras CD4+CD25+ se purificaron a partir de linfocitos esplénicos o poblaciones de células mononucleares de sangre periférica utilizando diversos métodos. Un método utilizó separación con perlas magnéticas (MACS). Los bazo se mezclaron suavemente en HBSS/5% de FCS para preparar suspensiones de células individuales.

20 Las células T CD4+ se purificaron mediante selección negativa por incubación con perlas MACS de CD4 conjugadas con biotina (Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA). La purificación adicional de las células CD4+CD25+ se realizó mediante incubación con anticuerpos anti-CD25 o anti-CD45RB<sup>allo</sup> conjugados con ficoeritrina (PE), seguido de incubación con microperlas de anti-PE (Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA). La separación magnética se realizó utilizando columnas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las Treg altamente purificadas (> 99%) y la subpoblación de linfocitos T efectoras, se aplica la clasificación de células a alta velocidad, utilizando el sistema de clasificación de células BD FACSAria (®) (BD Bioscience)

25 Se aislaron linfocitos de la lámina propia del colon como se describió previamente (Han X y colaboradores, *Gastroenterology*. 2005; 129: 185-203). En resumen, se diseccionó la mucosa del colon, seguido de incubación con una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) libre de Ca<sup>2+</sup> - Mg<sup>2+</sup> que contiene ditiotreitolo 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 min para eliminar el moco, y luego se incubaron en serie dos veces en medio que contiene EDTA 0,75 mM (Sigma-Aldrich) durante 60 minutos en cada incubación. Los sobrenadantes de estas incubaciones que contienen epitelio y una población de linfocitos intraepiteliales se descartan, y se combinan los fragmentos residuales y se tratan con 2 mg/ml de colagenasa A (Worthington Biomedical, Freehold, NJ) y 0,01% de DNasa (Worthington) en aire humidificado a 37°C por 2 horas. Las células se sedimentaron a continuación dos veces a través de una solución isotónica de Percoll al 40%, después de lo cual se purifican adicionalmente por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (40%/75%).

#### 35 Inducción in vitro de células T reguladoras

40 Las Treg de origen natural se derivan del timo, expresan altos niveles del factor de transcripción *forkhead* Foxp3 y suprimen la activación de los linfocitos efectoras. Se ha descubierto que la activación específica del antígeno de células T efectoras humanas puede inducir la expresión de Foxp3 en un subgrupo de las células efectoras activadas, que a su vez desarrollan un fenotipo regulador. Se demostró que estas células T reguladoras inducidas son capaces de supresión dependiente del contacto con células de células efectoras recién aisladas (Walker y colaboradores, 2003, citado más arriba). En ratones, la exposición prolongada de las células efectoras a TGF-β induce Treg tanto *in vitro* como *in vivo* (Fantini y colaboradores, *J Immunol*. 2004 y 2006, citado más arriba). Esta población pequeña, generada periféricamente de células T reguladoras inducibles puede ser central en la regulación y la contención de la respuesta inmune en curso, mientras que la incapacidad para inducir tales células T reguladoras puede ser responsables de una propensión a desarrollar autoinmunidad.

50 Para probar si tal inducción se produjo después de la estimulación de las células T efectoras a través del TpCR, de tipo silvestre, se aislaron células T efectoras TNP-Tg, ErbB2-Tg y TNP-CD28Δ-Tg mediante clasificación por FACS y se cultivaron durante 7 días en presencia de cualquiera de (1) Ab anti-CD3, (2) TGF-β murino, (3) mAb para TNP, (4) Ab anti-CD3 + TGF-β, o (5) Ab anti-TNP + TGF-β. Se evaluó la inducción de Foxp3 en las células que se "desarrollan" a partir de estas células T efectoras después de siete días de cultivo utilizando tinción intracelular de Foxp3.

La activación específica del antígeno de células T efectoras humanas conduce a la expresión inducible de Foxp3 en un subgrupo de células efectoras activadas, que a su vez desarrollan un fenotipo regulador. Estas células T reguladoras

inducidas son capaces de supresión dependiente del contacto con células de células efectoras recién aisladas. En ratones, tanto la inducción *in vitro* como *in vivo* de las Treg se puede lograr con la exposición prolongada de las células efectoras a TGF- $\beta$  (Fantini y colaboradores, 2004, 2006, citado más arriba). Los presentes inventores adoptaron esta tecnología para inducir células T reguladoras redirigidas de murino a partir de células T efectoras redirigidas (véase la Figura 3).

#### Animales

Se usaron varias cepas de ratón en los estudios descritos a continuación y se utilizan en diversas otras realizaciones de la invención. Estas incluyen líneas de ratones transgénicos que expresan específicamente TpCR anti-TNP o anti-ErbB2 (que contienen cadenas de señalización CD28-FcR $\square\square$ ) bajo el control de un promotor de CD2, así como una línea de ratones transgénicos que expresan CEA humano (Saha A y colaboradores, Immunology 2006, 118: 483-496).

Todos los ratones transgénicos fueron nuevamente cruzados con ratones Balb/c. Los ratones Balb/c de tipo silvestre sirven como controles de rutina y receptores de las células transferidas de forma adoptiva.

Se usa un modelo de colitis de transferencia de células en ratones Rag<sup>-/-</sup> y SCID deficientes.

Todos los procedimientos invasivos fueron y se realizan bajo anestesia general con ketamina y xilazina (127,5 y 4,5 mg/kg, respectivamente). Las inyecciones subcutáneas (s.c.) se llevan a cabo bajo anestesia local con xilocaína al 10% en aerosol.

#### Inducción y evaluación de la colitis:

Para inducir colitis mediada por hapteno TNP se sensibilizaron los ratones con 150  $\mu$ l de agente haptención, el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS, Sigma-Aldrich) a una concentración de 2,5% v/v en etanol al 50% mediante pintura en la piel en el día 1. En el día 8, se administraron 150  $\mu$ l de TNBS al 1% en etanol al 50% por vía rectal a través de un catéter 3,5 F bajo anestesia general.

La colitis inducida por OXA se indujo mediante la sensibilización de los ratones con oxazolona (4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona; Sigma-Aldrich) a una concentración de 3% v/v en etanol al 100% mediante pintura de la piel en día 1, seguido de la administración intrarrectal de 150  $\mu$ l a una concentración de 1% v/v en etanol al 50% en el día 8.

En modelos preferidos de colitis por transferencia de células, se transfieren células T CD45RB<sup>alto</sup> (no modificadas) a ratones inmunodeficientes de ambiente singénico (Powrie F y colaboradores, JExp Med. 1994; 179: 589-600. Este modelo de inflamación de la mucosa permite separar la función de las células Treg y de las células T efectoras en un sitio inflamatorio.

En todos los modelos, la colitis se evalúa después de la inducción utilizando los siguientes parámetros: grado de ulceraciones del colon, adherencias intestinales y peritoneales, espesor de la pared, y el grado de edema de la mucosa. Cada parámetro se clasifica en una escala de 0 (completamente normal) a 4 (más grave) por parte de dos observadores ciegos, experimentados. Para la evaluación histológica de inflamación, se remueve el tejido del colon distal (últimos 10 cm) y se fija en formaldehído al 10%. Se tiñen cinco secciones en parafina de cada ratón con hematoxilina-eosina usando técnicas estándar. El grado de inflamación se clasifica de forma semicuantitativa en secciones transversales microscópicas del colon de 0 a 4 como sigue: Grado 0: Normal, sin signos de inflamación; Grado 1: muy bajo nivel de infiltración de leucocitos; Grado 2: bajo nivel de infiltración de leucocitos; y Grado 3: alto nivel de infiltración con alta densidad vascular y engrosamiento de la pared intestinal; Grado 4: infiltrados transmurales con la pérdida de células caliciformes, alta densidad vascular, engrosamiento de la pared, e interrupción de la arquitectura normal del intestino.

#### Colonoscopia de murino

Para la supervisión continua de la patología de la colitis, se ha utilizado un sistema endoscópico de vídeo del ratón de alta resolución, Becker C y colaboradores, Gut. 2005; 54: 950-4. El sistema de endoscopia experimental (de Karl Storz, Tuttlingen, Alemania) consiste de un endoscopio miniatura (1,9 mm de diámetro exterior), una fuente de luz de xenón, una cámara de triple chip, y una bomba de aire. Los parámetros para la clasificación de la colitis incluyen el engrosamiento de la pared intestinal, la granularidad, la consistencia fecal, la deposición de fibrina y el patrón vascular. Se utiliza tinción del colon mediante cromoendoscopia con azul de metileno, cuando sea apropiado, para visualizar el patrón clave. Se usan pinzas de biopsia flexibles 3 Fr para la toma de la biopsia. Las biopsias se colocan ya sea en formalina para la inclusión en parafina, seccionamiento y posterior inmunohistoquímica, congelación en nitrógeno líquido para obtener criosecciones, o se obtienen y utilizan para el aislamiento del ARN. Un rendimiento típico de un espécimen de biopsia es de aproximadamente 2  $\mu$ g de ARN.

Obtención de imágenes *in vivo*:

Para seguir la migración (también denominada como retorno o tráfico) de células T reguladoras redirigidas en ratones, se usó una cámara CCD de cuerpo entero (sistema de formación de imágenes IVIS® serie 100, Xenogen, Alameda CA). Se marcaron las Treg redirigidas con el colorante de carbocianina lipofílica de infrarrojo cercano (NIR) yoduro de 1,1-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina (DiR, Invitrogen, EE.UU.). Este colorante tiene máximos de absorción y de fluorescencia a 750 y 782 nm, respectivamente, permite la marcación directa segura de membranas de las células linfoides humanas con niveles muy bajos de absorción de luz y de autofluorescencia en tejidos vivos (Miller MJ y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100: 2604-9; Kalchenko V y colaboradores, presentado para su publicación, 2007). Se realizó una visualización adicional *in vivo* de las Treg marcadas con succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) en la mucosa del colon mediante inserción intrarrectal de un microendoscopio confocal de 300 y 650 µm de diámetro (Cell Vizio, MKT, París, Francia). Esta modalidad única, no probada previamente en modelos de colitis, permite una evaluación repetida *in vivo* del retorno de las células T reguladoras marcadas con CFSE a las capas más internas de tejido del colon después de inducción de la inflamación.

Determinación de los niveles de citoquinas en el colon

Se determina la expresión de ARNm en el colon de citoquinas seleccionadas para permitir la evaluación de los efectos de Treg redirigidas en la respuesta inmune local intestinal, en particular, los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNFα e IFNγ) y antiinflamatorias (TGFβ e IL10), así como los niveles del factor de transcripción TH<sub>1</sub> Tbet y el factor de transcripción TH<sub>2</sub> GATA-3. Los niveles de citoquina en el colon se evalúan mediante la medición de la expresión de ARNm y los niveles de proteína.

Las muestras para aislamiento de ARNm se remueven del colon de los ratones usando colonoscopia *in vivo* o durante el sacrificio. El ARN total se aísla y se procesa y se produce ADNc por RT-PCR. En todos los experimentos, los ratones se dividieron en los siguientes grupos: ratones no manipulados, ratones con colitis inducida, y ratones con colitis inducida con transferencia adoptiva de células T reguladoras (de origen natural, inducidas o redirigidas, véanse en el presente documento experimentos detallados de transferencia adoptiva). Se utilizan los siguientes conjuntos de oligonucleótidos y condiciones de amplificación:

	SECUENCIA	SEQ ID NO:	Condiciones de amplificación
TNF-α	sentido	5'-AGTCCGGGCAGGTCTACTTT-3'	60°/30 ciclos
	antisentido	5'-GAGGCAACCTGACCACTCTC-3'	
IFN-γ	sentido	5'-TCTGGAGGAACTGGCAAAA-3'	63°/35 ciclos
	antisentido	5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'	
TGF-β	sentido	5'-TACAGGGCTTTTCGATTCAGC-3'	63°/35 ciclos
	antisentido	5'-CGCACACAGCAGTTCTTCTC-3'	
IL-10	sentido	5'-TCCTTGGAAGCAATTGAAG-3'	63°/35 ciclos
	antisentido	5'-AACTGGCCACAGTTTTTCAGG-3'	
T-bet	sentido	5'-CTAAGCAAGGACGGCGAATGT-3'	60°/35 ciclos
	antisentido	5'-GGCTGGGAACAGGATACTGG-3'	
GATA-3'	sentido	5'-GCCTGCGGACTCTACCATAA-3'	54,8°/30 ciclos
	antisentido	5'-CAGGGATGACATGTGTCTGG-3'	
GAPDH	sentido	5'-GTGTTCCCTACCCCAATGTG-3'	60°/25 ciclos
	antisentido	5'-CTTGCTCAGTGTCTTGTG-3'	

La expresión relativa de ARNm en comparación con el GAPDH de mantenimiento se evalúa utilizando software de imágenes NIH y promediada a partir de los ratones en cada grupo.

Los niveles de expresión de proteína de IL-10 e IFN- $\gamma$  en tejido de colon se cuantifican mediante un sistema de ELISA basado en citofluorometría. En resumen, se aíslan las proteínas enteras de especímenes de colon en ausencia de detergente. Se usan inmediatamente proteínas (100  $\mu$ g) para la determinación de citoquinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Inmunohistoquímica de Foxp3 de muestras de colon:

Se lleva a cabo la inmunofluorescencia de Foxp3 para estimar *in situ* el direccionamiento de Treg en el colon enfermo, usando TSA Cy3 y un microscopio de fluorescencia (Olympus). En resumen, se fijan criosecciones en acetona fría durante 10 minutos, seguido de incubación secuencial con metanol, avidina/biotina (Vector Laboratories, CA), y reactivo de bloqueo de proteína para eliminar la tinción de fondo no específica. Se incuban luego los portaobjetos durante la noche, con anticuerpos primarios específicos para Foxp3 (por ejemplo, de Alexis Biochemicals, Lausana, Suiza). Posteriormente, se incuban los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios biotilados, y se tratan con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante y se tiñen con tiramida (Cy3 o FITC). Antes del examen, los núcleos se tiñen con colorante de contraste Hoechst 3342 (Molecular Probes, Ohio).

Ejemplo I

15 Caracterización fenotípica de células T reguladoras específicas para TNP

Los inventores han producido ratones transgénicos (Tg) que expresan un receptor quimérico tripartita (TpCR) específico de TNP que sirven como fuente de células Treg redirigidas específicas para el hapteno trinitrofenilo (TNP). Este hapteno ha servido como un antígeno "clásico" desde hace años en el estudio tanto de anticuerpos como de inmunidad mediada por células T. Una forma químicamente reactiva de este hapteno, TNBS, es un agente sensibilizador de contacto que induce y evoca respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), así como la inducción de colitis en animales, como se describe en el presente documento.

La generación de Treg específicas para el TNP se logró mediante la creación de los ratones Tg que expresan TpCR específico para TNP que comprende un scFv del mAb Sp6 mAb específico para TNP enlazado a una molécula de CD28 troncada que se insertó entre el scFv y la parte citoplasmática de la cadena  $\gamma$  de FcR (abreviado como  $\gamma$  en el presente documento (véase la Figura 1). Este constructo incluye la región de bisagra, la región transmembrana y la región citoplasmática de CD28, pero carece del sitio de unión B7 (ligando).

Para la forma troncada de CD28 (TpCR/CD28, Figura 1) que no incluye el dominio de señalización intracelular de CD28, los inventores clonaron el vector en el mismo sitio. Como control, se usó un ratón Tg que expresa TpCR específico para otro antígeno irrelevante (Erb-B2).

Para la expresión de TpCR en células T de ratones Tg, se clonó un constructo que comprende un scFv-CD28- $\gamma$  derivado de Sp6 anti-TNP en un vector basado en mini gen humano promotor/reforzador de CD2 humana. Se generaron ratones Tg en el Departamento del Instituto Weizmann para Recursos Veterinarios mediante microinyección pronuclear de óvulos fertilizados de (BALB/cx C57BL/6)F<sub>1</sub> derivados de hembras donantes hiperovuladas. Ratones creadores fueron seleccionados por PCR del ADN de muestras de la cola. Se obtuvieron varias cepas creadoras que expresan alto nivel del TpCR en sus superficies celulares. Estos fueron retrocruzados por más de nueve generaciones ya sea con ratones BALB/c o C57BL/6 para obtener ratones con MHC homogéneo.

Los estudios a continuación describen la caracterización de diversas subpoblaciones de Treg en las diferentes cepas de ratones transgénicos TNP-Cr, y la expresión de TpCR en estas células T reguladoras.

Ejemplo II

40 Aislamiento de Treg en las que TpCR específico de TNP son altamente expresadas

Se aislaron las Treg utilizando separación doble con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) o mediante clasificación de células fluorescentes en las que se clasificaron las células CD4+CD25+ marcada de manera fluorescente usando el sistema de clasificación de células FACSAria.

Se evaluó la expresión de Treg de TpCR específica de TNP mediante células restringidas para Foxp3 (considerado el marcador "estándar dorado" de las Treg) y mAb marcado con PE específico para el anticuerpo TNP (generado en laboratorio de los inventores). Los controles incluyeron grupos teñidos con los controles del isotipo apropiado. Como se muestra en la Figura 2, las Treg de ratones TNP-Tg, pero no de ratones de tipo silvestre, expresaron altos niveles de TpCR específica de TNP.

Ejemplo III

Los ratones TNP-Tg poseen un mayor número de población de Treg Foxp3+

5 Se tiñeron linfocitos periféricos del bazo así como linfocitos asociados al intestino de la lámina propia del colon. Como se muestra en la Figura 3, se elevó modestamente la población de células CD4+CD25+ (representada como la relación de células CD4+CD25+ entre células T CD4+) en ratones TNP-Tg en comparación con los ratones de control (ratones ErbB2-Tg y TNP-CD28 sin Tg, de tipo silvestre). Por el contrario, se observó un mayor número de células Foxp3+ en animales TNP-Tg en comparación con los animales de control en comparación con todos los otros tipos de ratón (Figura 4).

10 Para resolver lo que parecería ser una inconsistencia entre la población de Treg Foxp3+ muy elevado en ratones TNP-Tg y la población Treg CD4+CD25+ moderadamente elevada en estos ratones, se aislaron células efectoras CD4+CD25- mediante clasificación celular hasta un nivel de 99% de pureza. Se tiñeron las células aisladas para Foxp3 (Figura 5). Como se esperaba, no se observó una coloración positiva de Foxp3 en las células T efectoras de ratones, Tg-ErbB2 y TNP-CD28 sin Tg de tipo silvestre. Por el contrario, las células T efectoras de TNP-Tg presentaron una población significativa de células Foxp3+. Esta observación fue validada adicionalmente en poblaciones enteras de células de bazo que fueron tenidas conjuntamente para Foxp3 y CD25 (Figura 6). La presencia de una población de Treg Foxp3+  
15 CD25 significativamente mayor en ratones TNP-Tg está soportada por otros resultados recientes del laboratorio de los inventores que muestran que el mAb Sp6 a partir del cual se derivó el scFv del TpCR específico de TNP reconoce los antígenos endógenos del timo de reacción cruzada. Esto se traduce ya sea en la supresión o liberación temprana del timo a la periferia antes que varios otros subconjuntos de células T inmaduras, incluyendo Treg CD25- inmaduras.

#### Ejemplo IV

20 La inducción de colitis con TNBS en ratones TNP-Tg elevó significativamente el número de células que expresan Foxp3+ en poblaciones de linfocitos periféricos y derivados del colon

25 La inducción de colitis por TNBS trajo como resultado una elevación adicional de las Treg Foxp3+ de bazo (Figura 7) y colon (Figura 8) en TNP-Tg (Figura 7 y 8, respectivamente). Estos resultados demostraron que ocurrió una expansión de Treg específicas de TNP después de la inducción de la colitis en ratones Tg, lo que refleja la proliferación de Treg después de la activación específica del antígeno por TNP.

#### Ejemplo V

##### Caracterización funcional *in vitro* de Treg redirigidas

30 Una condición previa esencial para la utilidad de Treg que expresan al TpCR específico de TNP en el tratamiento de autoinmunidad es la verificación de su actividad reguladora, a saber, una capacidad para suprimir la proliferación de células T efectoras en una forma dependiente de la dosis. También se examinó si dicha activación de Treg se produce como resultado de la señalización de TpCR, y si en realidad era independiente de la interacción CD28-B7. Una serie de experimentos de cocultivo examinó las Treg de diferentes cepas de Tg, como se describe a continuación.

#### Ejemplo VI

35 Treg que contienen al receptor quimérico específico de TNP específicamente suprimió la actividad de las células T efectoras

40 Para caracterizar si las Treg de TNP-Tg retuvieron sus propiedades anérgicas, se purificaron células Treg CD4+CD25+ y células T efectoras CD4+CD25- partir de diferentes creadores del ratón Tg (ratones de tipo silvestre (WT) y de control anti-TNP, anti-Erb-b2) se purificaron a partir de esplenocitos a granel. Se incubaron  $10^5$  células *in vitro* durante 24h, 48h o 72 horas (Figura 9) y se activaron de forma no específica con Ab anti-CD3 y anti-CD28, o específicamente con TNP modificado con globulina gamma de ave de corral (FyG-TNP). Se midió la proliferación de células T usando la absorción de un colorante (sal de tetrazolio XTT) o timidina marcada en forma radioactiva. Se midió la secreción de IL2 usando coloración de XTT de la línea celular CTLL-2 que depende de IL-2.

45 Todas las poblaciones de células efectoras mostraron una proliferación significativamente mayor y secreción de IL2 después de estimulación no específica con Ab anti-CD3 + anti-CD28. La estimulación específica mediante FyG-TNP se tradujo en proliferación y secreción de IL2 por las células T efectoras que contienen el receptor quimérico de TNP, pero no por dichas células T de ratones Tg anti-Erb-B2 o WT. Por el contrario, las Treg de ratones de tipo silvestre, ratones Tg receptores quiméricos de TNP y ratones Tg Erb-B2 retuvieron sus propiedades anérgicas: no experimentaron una proliferación medible o secreción de IL2 cuando se sometieron al estímulo no específico o Ag específico.

50 Para caracterizar si la activación policlonal podría activar la acción supresora de las Treg de TNP-Tg, se cocultivaron estas Treg en microplacas de 96 pozos (0,2 mL) con células presentadoras antígeno irradiadas (APC) y células T efectoras (CD4+ CD25-) en una relación de 1:1. Se activaron las células en estos cultivos, ya sea mediante (1)

"imitación" del antígeno inmovilizado (anti-CD3 + anti-CD28) o (2) Concanavalina A soluble (ConA). La proliferación de células T se midió como la captación de timidina y se midió la secreción de IL2 como el crecimiento de las células de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2 (coloración con XTT).

5 La Figura 10 muestra un experimento de ConA. La estimulación no específica (policlonal) de las Treg indujo a que estas células exhibieran una potente inhibición de la proliferación de células T efectoras y secreción de IL2, independientemente del origen de las Treg o la presencia del receptor quimérico. Por lo tanto, la manipulación genética de las Treg del tipo descrito aquí conserva sus propiedades supresoras.

#### Ejemplo VII

Estimulación específica del antígeno de células Treg redirigidas con TNP

10 Resultados en la supresión de la proliferación de células T efectoras.

15 Para estudiar la estimulación de Treg específicas del antígeno a través del TpCR, se realizaron experimentos de cocultivo en los que las APC cargadas con TNP proporcionaron la presentación de Ag (Figura 11). Las comparaciones de estimulación específicas TNP se llevaron a cabo, comparando las Treg de TNP-Tg versus las de tipo silvestre (Figura 11, panel izquierdo) o las Treg de ErbB2-Tg y TNP-Tg (Figura 11, panel derecho). En ausencia de la estimulación de TNP, no se produjo la proliferación de células T efectoras (las barras más a la izquierda en ambas gráficas). Por el contrario, la incubación con las APC modificadas con TNP dio como resultado:

(1) una marcada proliferación de células T efectoras de TNP-Tg pero no de tipo silvestre o de ErbB2-Tg en ausencia Treg; y

20 (2) la activación de las Treg de TNP-Tg, pero no de WT o Erb-b2-Tg, que se manifiesta como supresión de la proliferación de células efectoras por las Treg específicas TNP únicamente.

Estos resultados probaron la forma específica del antígeno de activación y función de las células Treg de TpCR específica de TNP en respuesta al antígeno, TNP.

25 El cocultivo de relaciones variables de células T reguladoras específico de TNP y de células T efectoras específica de TNP (Figura 12) demostró la inhibición exitosa específica del antígeno por las Treg en una relación de 1 una célula Treg a 8 células T efectoras.

Se llevaron a cabo estudios que apoyan la existencia de los efectos espectadores. Se indujo colitis en ratones como anteriormente usando OXA tal como se describe en el Ejemplo I. La transferencia adoptiva de Treg solas específicas TNP no protegió a estos animales de la colitis. Sin embargo, en presencia de cantidades traza de TNP aplicado al colon, los animales fueron protegidos de esta colitis inducida por OXA.

30 Ejemplo VIII

La actividad supresora de las Treg redirigidas a TpCR es independiente de los receptores coestimuladores

35 Para evaluar el papel de la señalización coestimuladora en el modelo TpCR-Tg anterior, se llevaron a cabo experimentos de cocultivo usando como APC (a) células P815 modificadas con TNP, una línea celular que no expresa B7, o (b) células P815 modificadas genéticamente cargadas con TNP que expresan en forma estable el gen B7 (Figura 13). La estimulación de células T efectoras de TNP-Tg con células TNP-P815 indujo proliferación, que fue marcadamente suprimida por Treg de TNP-Tg. La expresión de B7 en estas APC no promovió ninguna supresión adicional mediada por Treg. Se concluyó que la supresión máxima de Treg se produjo independientemente de B7. También se observó alguna supresión con Treg de tipo silvestre. Esto se explica por la activación previa de estas células antes de su recolección. Con base en estos resultados, se puede concluir que la inclusión del dominio de señalización intracitoplasmático de CD28 en el TpCR de células Treg redirigidas da como resultado una activación completa de su actividad supresora cuando son estimuladas por Ag independientemente de la presencia de coestimulación de B7-CD28.

#### Ejemplo IX

Caracterización funcional de la actividad de Treg específica de TNP *in vivo* en colitis murina

45 TNBS es un potente inductor de las respuestas de células T tal como la sensibilización por DTH/contacto. Este hapteno reactivo también induce colitis autoinmune cuando se aplica al colon de ratones previamente sensibilizados. Para determinar si las Treg que contienen TpCR podrían suprimir la autoinmunidad, se empleó el modelo de colitis aguda

5 mediada por TNBS. La administración intrarrectal de TNBS conduce a su unión con las proteínas del colon, volviendo a estas proteínas modificadas inmunogénicas de manera que provocan una respuesta inmune mediada por células T. El efecto supresor de las Treg transferidas en forma endógena o exógena a una enfermedad inflamatoria autoinmune fue probado en este modelo. Se utilizó un hapteno diferente, oxazolona (OXA) con propiedades de sensibilización similares y que induce colitis experimental como un control de *in vivo*.

Ejemplo X

Los ratones transgénicos cuya población completa de Treg expresa al receptor anti-TNP quimérico, son resistentes a la colitis inducida por TNBS

10 Se indujo colitis mediada por el hapteno TNP en ratones Tg y WT sensibilizando primero los animales con 150 mL del ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS, Sigma-Aldrich) con una concentración de 2,5% en etanol al 50% pintado sobre la piel el día 1. El día 8, se administró el antígeno por vía rectal (150 µL de TNBS al 1% en etanol al 50%; colitis de alta dosis). Los ratones WT desarrollaron colitis severa en el lapso de 2-5 días después de la administración rectal de TNBS (Figura 14, panel izquierdo). Por el contrario, el 90% de los ratones TNP- Tg tenían colones de apariencia normal (Figura 14, derecha). Los puntajes de severidad de la colitis fueron los siguientes:

Animales	Puntuación de colitis (unidades arbitrarias)	Mortalidad
Tipo silvestre	12 ± 3,1	90 ± 20%
TNP-ΔCD28-Tg	11,1 ± 4	
ErbB2-Tg	12,7 ± 3,2	
TNP-Tg	2 ± 2 (p<0,05)	20 ± 20% (p<0,01)

15

Para producir curvas de mortalidad, se repitieron los experimentos anteriores con dosis más bajas de TNBS (75 µL de TNBS al 1% en etanol al 50%). Se observaron diferencias similares en la severidad de la colitis y en la mortalidad (Figura 15). Microscópicamente, los colones de ratones de tipo silvestre, TNP-ΔCD28-Tg y ErbB2-Tg mostraron inflamación severa, necrosis, hemorragia y en algunos casos perforación, mientras que aquellos de ratones TNP-Tg parecían normales o casi normales (Figura 16).

20

25 La evidencia de la especificidad del antígeno de la protección de la colitis mediada por hapteno provino de estudios de colitis inducida por OXA. Como se muestra en la Figura 17, no se observaron diferencias en la mortalidad entre ratones de tipo silvestre, TNP-Tg, TNP-ΔCD28-Tg y ErbB2-Tg. Lo mismo puede decirse para las puntuaciones de colitis macroscópicas y microscópicas. A partir de estos experimento *in vivo*, se concluyó que la presencia de una población de células Treg que expresa uniformemente al receptor quimérico anti-TNP resulta en un mayor grado de protección contra la inflamación inducida por TNBS, que se manifiesta como inflamación reducida del colon y supervivencia significativamente mejor. Es de destacar que la inclusión de la señalización coestimuladora con CD28 en el CR mejora significativamente la función supresora de las Treg de TNP-Tg.

25

Ejemplo XI

30 La estimulación prolongada con TNP combinado con TGF-β promueve la conversión que conduce de células T efectoras específicas de TNP en Treg específicas de TNP.

35 Las Treg de origen natural se derivan del timo, expresan altos niveles de Foxp3 y suprimen la activación de linfocitos efectoras. La activación específica del antígeno células T efectoras humanas puede inducir expresión de Foxp3 en un subgrupo de las células efectoras activadas, que a su vez desarrollan un fenotipo regulador. Se demostró que estas células T reguladoras inducidas son capaces de supresión dependiente del contacto de la célula de células efectoras aisladas recientemente (Walker y colaboradores, 2003, citado más arriba). En ratones, se ha demostrado que la exposición prolongada de células efectoras a TGF-β induce Treg tanto *in vitro* como *in vivo* (Fantini y colaboradores, 2004, 2006, citado más arriba). Esta pequeña población, de células Treg inducibles generadas periféricamente puede ser importante en la regulación y contención de la respuesta inmune en curso, mientras que la incapacidad para inducir  
40 tales células Treg puede ser responsable de la propensión a desarrollar autoinmunidad.

40

Para probar si tal inducción ocurrió después de la estimulación de células T efectoras a través del TpCR, se aislaron células T efectoras de tipo silvestre, TNP-Tg, ErbB2-Tg y TNP-CD28 sin Tg mediante clasificación por FACS y se cultivaron durante 7 días en presencia ya sea de (1) Ab anti-CD3, (2) TGF-β, (3) mAb para TNP, (4) Ab anti-CD3 + TGF-

$\beta$ , o (5) Ab anti-TNP + TGF- $\beta$ . La inducción de Foxp3 en células que se "desarrollan" a partir de estas células T efectoras fue evaluada después de siete días de cultivo utilizando coloración de Foxp3 intracelular (Figura 18).

5 En el tiempo 0 hasta el tiempo de la clasificación de células T efectoras, no se observó coloración de Foxp3. Una semana de estimulación con anti-CD3 + TGF- $\beta$ , pero no con TNP + TGF- $\beta$ , se tradujo en un aumento de 2 veces en células Foxp3 + en células efectoras T de tipo silvestre, ErbB2-tg y TNP-CD28 sin Tg. Por el contrario, se observó un aumento dramático de 30 veces en células Foxp3+ en células efectoras de NP-Tg después de exposición a TNP + TGF- $\beta$ . Curiosamente, no se observó inducción de Foxp3 en células T efectoras de TNP-Tg después de incubación con Ab anti-CD3 o con TGF- $\beta$ , probablemente debido a una atenuación significativa de la expresión de CD3 en células T de TNP-Tg (Morvinsky-Friedman y colaboradores, en prensa).

10 Los resultados anteriores demostraron que la estimulación específica de antígeno a través del TpCR en presencia de TGF- $\beta$ , condujo a la inducción de Treg específicas de Ag a partir de células T efectoras, que contribuye además a la expansión de Treg. Este cambio era dependiente tanto de la especificidad del antígeno de la unidad de reconocimiento de Ab del TpCR y la fracción de señalización de CD28 intracitoplasmática.

15 De acuerdo con la presente invención, la inducción de Treg de esta forma permite la generación de grandes poblaciones de Treg que contienen TpCR que pueden ser utilizadas en la terapia de autoinmunidad basada en células.

#### Ejemplo XII

La transferencia adoptiva de las Treg de TNP-Tg en ratones WT con colitis por TNBS mejora los síntomas y la supervivencia.

20 Se llevaron a cabo estudios para establecer que las Treg de TNP-Tg son responsables de la resistencia de los ratones TNP-Tg a la colitis por TNBS y para evaluar su capacidad terapéutica en la autoinmunidad. Se aislaron y administraron Treg de tipo silvestre, de TNP-Tg y de ErbB2-Tg en diferentes cantidades a ratones de tipo silvestre un día después de la inducción de colitis por TNBS. Como se describió anteriormente, la transferencia adoptiva de grandes cantidades de Treg de cualquier origen ( $\geq 2 \times 10^5$ ) causó una atenuación no específica de la colitis por TNBS. Se cree que esto es el resultado de la presencia de una población suficientemente grande de células Treg activadas previamente que pueden ejercer su actividad supresora en ausencia de estimulación o especificidad del antígeno. Por el contrario, la transferencia adoptiva de cantidades más pequeñas ( $5 \times 10^4$ ) de Treg de TNP-TG, pero no de Treg de tipo silvestre o ErbB2-Tg, prolongó la supervivencia (Figura 19), mejoró los puntajes de severidad de la colitis de Wallach (Figura 20), y mejoró significativamente la apariencia macroscópica (Figura 21) y microscópica (Figura 22) del tejido del colon. La Figura 21 muestra un marcado acortamiento del intestino, una manifestación de inflamación del colon (en ratones de WT y ErbB2-Tg, pero no en TNP-Tg). La Figura 22 muestra la severidad de la inflamación transmural, necrosis, sangrado de la mucosa y pérdida de la arquitectura normal en colonos de ratones WT con colitis por TNBS que habían recibido control (WT y ErbB2-Tg), pero no en colonos de TNP-Tg.

#### Ejemplo XIII

35 Migración/Tráfico de Treg redirigidas a sitios de inflamación: las Treg de TNP-Tg transferidas en forma adoptiva se localizan en los colonos en colitis inducida por TNBS

40 Se realizaron estudios para obtener apoyo adicional para el papel de las Treg de TNP-Tg en la atenuación de la colitis por TNBS al demostrar que estas células de hecho se localizan en el tejido del colon inflamado. Se aislaron Treg de WT y de TNP-Tg y se tiñeron con el colorante intracelular fluorescente, succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Después de la tinción, se administraron  $10^6$  Treg por vía intraperitoneal (ip) para ratones WT de control o para ratones WT en los cuales se había inducido colitis por TNBS 12 horas antes. Dieciséis horas después de este tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se aislaron linfocitos de la lámina propia de sus colonos. El protocolo utilizado fue descrito anteriormente para aislar los linfocitos de lámina propia. Después de eso, se examinaron las células para determinar la presencia de células positivas para CFSE mediante análisis FACS. Como se muestra en la Figura 23, cantidades muy pequeñas de Treg transferido adoptivamente de TNP-Tg o WT alcanzaron los colonos de ratones normales. La inducción de la colitis condujo a un pequeño aumento (0,5% a 0,8%) en el número de Treg coloreadas con CFSE de WT en tejido de colon. Por el contrario, la transferencia adoptiva de Treg de TNP-Tg marcadas con CFSE a ratones con colitis condujo a un aumento significativo en la población Treg en el colon, en el intervalo de 0,4% a 3,6%. Esto demuestra que las Treg de TNP-Tg se localizan en un órgano objetivo expuesto a TNBS, donde ejercen su función supresora.

#### 50 Ejemplo XIV

Acumulación de Treg de TNP-Tg transferidas en forma adoptiva dentro de la capa mucosa de los colonos de ratones con colitis por TNBS.

Un aspecto importante de la comprensión del papel de las Treg para la terapia adoptiva de la inflamación autoinmune de la Treg en órganos enfermos, donde se espera que ellas ejerzan sus efectos supresores. Para demostrar la localización de TNP-Tg-Treg, se marcaron las Treg de WT y TNP-Tg con CFSE y se transfirieron a ratones WT 24 horas después de la inducción de la colitis con TNBS. Si bien se observaron un número muy pequeño de Treg de WT marcadas con CFSE en células extraídas de la lámina propia de colon de ratones no modificados o a los que se les indujo colitis con TNBS, se observó un incremento de nueve veces en las Treg de TNP-Tg (Figura 23).

Para estudiar la cinética de localización de Treg de TNP-Tg de animales vivos, se empleó el sistema de formación imágenes IVIS® serie 100 (Xenogen, Alameda CA). Se administraron Treg de tipo silvestre y TNP-Tg,  $1.5 \times 10^6$ , marcadas con el colorante carbocianina lipofílica de infrarrojo cercano yoduro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina (DiR, Invitrogen EE.UU.), en forma ip a ratones WT con o sin colitis por TNBS, que se controlaron diariamente con la cámara CCD de cuerpo entero de IVIS (Figura 24). Se observó una señal fluorescente abdominal anterior fuerte, que refleja el grueso de las células Treg inyectadas, en ratones no modificados 24-48 horas después de la inyección intraperitoneal de las Treg y desaparecieron después de eso, debido a la redistribución de las Treg. En ratones con colitis por TNBS, se observó una señal abdominal leve durante 72 horas, que probablemente refleja autofluorescencia relacionada con la inflamación. En ratones con colitis por TNBS que recibieron Treg marcadas de WT, se podía reconocer una señal fluorescente abdominal entre moderada y débil hasta 96 horas después de la transferencia de Treg. Por el contrario, las Treg de TNP-Tg administradas a ratones WT con colitis por TNBS mostraron una señal fluorescente abdominal distinta hasta por una semana después de la transferencia de las células, sustancialmente más fuerte que aquella de las Treg de tipo silvestre en todos los puntos de tiempo. Estos resultados reflejan la localización persistencia de Treg de TNP-Tg dentro de los colones durante la colitis.

Para determinar si las Treg de TNP-Tg alcanzan la capa interna mucosa del colon, la ubicación donde la mayor parte del daño de la mucosa inducida por TNBS tiene lugar, se empleó un sistema de microendoscopia confocal Cell Vizio (Cell Vizio, MKT, París, Francia). Un microendoscopio confocal de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro insertado en forma rectal permitió la visualización de células marcadas con CFSE en un espesor de pared intestinal de hasta 150  $\mu\text{m}$  (Figura 25). Se pueden visualizar numerosas Treg de TNP-Tg, marcadas con CFSE transferidas en forma adoptiva en la capa mucosa interna de ratones WT con colitis por TNBS tan pronto como 12 horas después de la transferencia de sistémica Treg. Este resultado indica que las Treg de TNP-Tg localizadas en respuesta a TNBS colónicas, en un lapso de horas desde su administración, y que ellas alcanzan las capas mucosas colónicas más profundas, donde ellas ejercen sus funciones supresoras.

### 30 Ejemplo XV

La administración de Treg de TNP-Tg específicas para un antígeno espectador (TNBS) cura la colitis mediada por un antígeno patogénico (oxazolona)

En contraste con la colitis mediada por hapteno, en la que el antígeno provocador es predefinido, se desconoce el antígeno que causa la enfermedad en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Para permitir la aplicación del enfoque del "cuerpo T" en IBD, se analizaron las Treg no modificadas que contienen TpCR para determinar si pueden ser activadas por un antígeno "espectador" predeterminado asociado con colitis o con el colon, para realizar su acción supresora no específica del antígeno. Para este fin, se sensibilizaron previamente ratones WT y TNP-Tg únicamente a oxazolona. Se introdujeron por vía rectal una mezcla de oxazolona y bajas dosis de TNBS. Como se muestra en la Fig. 26a, una exposición concomitante de ratones WT con TNBS y oxazolona, fue asociada con una tasa de mortalidad del 100% en una semana, en comparación con solamente una mortalidad del 15% en una semana de ratones TNP-TG ( $P < 0,01$ ). En forma similar, fue evidente una inflamación mucosa significativa tanto en ratones WT como TNP-Tg con colitis por oxazolona (no mostrada), y fue más severa en ratones de tipo silvestre a los que se les suministro TNBS + oxazolona (Fig. 26b, caja I) dando como resultado un sangrado severo, deposición de fibrina y desprendimiento de la mucosa del colon.

45 En marcado contraste, los ratones TNP-Tg a los que se les administró TNBS + oxazolona mostraron una mucosa colónica de apariencia normal con áreas dispersas de colitis leve (Fig. 26b, cuadro II). Macroscópicamente y microscópicamente, los colones de ratones WT tratados concomitantemente TNBS y oxazolona mostraron una colitis severa, en forma opuesta a los colones casi normales en ratones TNP-TG (Figs. 26c y 26d, respectivamente).

50 Notablemente, este efecto protector "espectador" también se presentó cuando se transfirieron adoptivamente Treg de TNP-Tg a ratones de tipo silvestre sensibilizados previamente con oxazolona que recibieron un refuerzo intrarrectal con una mezcla de oxazolona y bajas dosis de TNBS (Fig. 26e,  $P < 0,01$ ). Por el contrario, las Treg de WT transferidas adoptivamente no tenían este efecto curativo, y las dosis muy bajas de TNBS en ausencia de sensibilización previa fueron insuficientes por sí mismas para inducir colitis por TNBS. Estos resultados demuestran que la activación de Treg por un antígeno espectador (TNBS) causa una mejora en la colitis que ha sido inducida por un antígeno diferente sin reactividad cruzada (oxazolona).

### Ejemplo XVI

Administración de Foxp3 a núcleos de células por vectores que comprenden receptores quiméricos

Se realizó un experimento para comprobar que el Foxp3 puede ser expresado después de la transducción de las células A273 con constructos de vectores retrovirales diseñados para transducir células Treg. Se generó un gen fusionado que incluía secuencias de eGFP que codifican proteína fluorescente verde (denominada como eGFP o GFP). Este fue modificado como un constructo bicistrónico con la sola secuencia de GFP o enlazada con una secuencia que codifica Foxp3 (después de una IRES) en vectores que comprendían un constructo receptor quimérico con las siguientes regiones de reconocimiento extracelular: Véase la descripción de la Figura 27 para discusión de los constructos receptores quiméricos utilizados. 273 células transducidas con vectores que comprenden los mismos receptores quiméricos pero con un solo gen eGFP bicistrónico (sin Foxp3) sirvieron como controles para la expresión de Foxp3.

Los resultados se muestran en la Figura 27. La mitad superior de la figura muestra los controles únicos de GFP, mientras que la mitad inferior de la figura muestra los constructos GFP-Foxp3. Los rectángulos de dos paneles en la Figura muestran imágenes microscópicas de fluorescencia (mitad derecha) y microscópicas de luz (mitad izquierda) del mismo material (para visualizar y localizar la GFP).

Todo el grupo de control expresó la eGFP en su citoplasma únicamente. Por el contrario, en las células que fueron transducidas con los constructos de fusión eGFP-Foxp3, los núcleos eran fluorescente (apareciendo como imágenes nucleares brillantes) debido al transporte y expresión del factor de transcripción Foxp3 en los núcleos.

En otro experimento no mostrado aquí, la expresión del receptor quimérico elaborado a partir de la proteína MD2 de longitud completa (SEQ ID NO: 5) o la proteína CD14 (SEQ ID NO: 4) fue confirmada por la capacidad de las células transducidas, que expresaron la región extracelular del CR en su superficie, para unirse al ligando de MD2 y CD14, LPS bacteriano, que se proporciona en forma biotinilada y revelado por unión secundaria de avidina fluorescente.

Ejemplo XVII

Los vectores que comprenden receptores quiméricos con regiones extracelulares que se unen a LPS

Se han elaborado constructos de ácido nucleico y vectores que codifican regiones extracelulares que comprenden un dominio de anticuerpo anti-LPS (por ejemplo, SEQ ID NO: 3 o la porción del mismo que codifica scFv) y se pueden elaborar otros. Tales vectores expresan dominios de polipéptidos extracelulares que se muestra que se unen a LPS, por ejemplo, en un ensayo usando LPS biotinilado y avidina marcada en forma detectable (por ejemplo, marcada en forma fluorescente). Véase también el Ejemplo XVI más arriba.

Se han elaborado constructos de ácido nucleico y vectores que codifican regiones extracelulares que comprenden un polipéptido no anticuerpo que se une a LPS (por ejemplo, SEQ ID Nos: 6-11, 13 y 14). Tales constructos incluyen aquellos bicistrónicos que también comprenden Foxp3. Se pueden elaborar otros de tales constructos usando el método descrito anteriormente, junto con métodos bien conocidos en la técnica. Tales constructos (tales como SEQ ID NO: 13 y 14) incluyen aquellos que codifican la proteína CD14 de longitud completa (SEQ ID NO: 4) o MD2 (SEQ ID NO: 5) y constructos que codifican motivos de los mismos que se unen a LPS (tal como las SEQ ID Nos: 6-9) y combinaciones (tal como las, SEQ ID Nos: 10 y 11). Los constructos que se elaboran incluyen aquellos con regiones estimuladoras/coestimuladoras intracelular de CD28-FcRy y aquellos que utilizan otros del tipo divulgado en el presente documento.

Las células Treg se redirigen como se describe en este documento usando los constructos anteriores, incluyendo aquellos que han sido elaborados y probados y aquellos que pueden ser elaborados.

Tales células Treg se administran a sujetos que sufren de IBD, tal como colitis ulcerosa. Las células Treg se administran en cantidades de acuerdo con los ejemplos anteriores, o en cantidades que son fácilmente determinadas como efectivas por aquellos expertos en la técnica utilizando únicamente experimentación de rutina, y a través de vías de administración como se ejemplificó anteriormente y se divulgó a través de este documento. Estas células Treg redirigidas que expresan una región de anticuerpo que se une a LPS u otra fracción que se une a LPS en su superficie (CD14, MD2, fragmentos de las mismas, o combinaciones de éstas), como parte de sus CR son capaces de reducir los síntomas, intensidad, severidad y duración de la IBD en el sujeto en un grado significativo comparado con sujetos de control no tratados o sujetos de control a los que se les administró Treg de control. (tales células Treg de control son aquellas no transducidas que expresan los presentes CR, o aquellas redirigidas que son específicas para los antígenos o ligandos que no presentes en el sitio de la IBD). La introducción de moléculas o epítopos relacionados con LPS que se unen a estos mismos receptores extracelulares en las células Treg redirigidas a los sitios de administración (y/o acción esperada) de las células Treg redirigidas facilita aún más su actividad terapéutica.

Reivindicaciones

- 5 1. Una población linfocitos T redirigidos con un fenotipo regulador (células T redirigidas), estando las células T redirigidas dotadas con especificidad hacia un antígeno o ligando objetivo, cuyo antígeno o ligando objetivo es uno que está presente o expresado en un sitio o tejido de una respuesta inmune o inflamatoria no deseada, cuyas células comprenden cada una, una molécula quimérica de ácido nucleico que se expresa, en una cadena continua única, un polipéptido receptor quimérico que comprende una región de reconocimiento extracelular, una región transmembrana y una región de señalización intracelular, de tal manera que la región extracelular de la mismos se despliega sobre la superficie de dichas células, en donde dicha molécula quimérica de ácido nucleico comprende:
- 10 (a) un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicha región de reconocimiento extracelular específica para dicho antígeno o ligando objetivo, cuya región no comprende un dominio extracelular de proteína del MHC; y en donde dicha región se une al antígeno o ligando objetivo en una forma no restringida al MHC o en una manera no dependiente del MHC;
- (b) un segundo segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicha región transmembrana; y
- 15 (c) un tercer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicha región señalización intracelular que comprende una combinación de fracciones del polipéptido de señalización de células T.
2. La población de células T redirigidas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha región de reconocimiento extracelular se une al antígeno o ligando objetivo en una forma independiente del acoplamiento del ligando coestimulador en una célula objetivo.
- 20 3. La población de células T redirigidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha región reconocimiento extracelular comprende un dominio de scFv derivado del anticuerpo que es específico para el antígeno o ligando objetivo
4. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha región de reconocimiento extracelular se enlaza a dicha región transmembrana a través de un espaciador flexible, preferiblemente una bisagra de una molécula de la superfamilia de inmunoglobulinas.
- 25 5. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha región intracelular comprende un fracción de señalización de (i) una cadena de polipéptido de un receptor específico del antígeno de una célula T y/o (ii) un cadena polipéptido de un receptor de una célula T que tiene una región que comprende un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM), preferiblemente una fracción de señalización de una cadena de polipéptido seleccionado del grupo que consiste de una cadena del complejo TCR/CD3, y la cadena y de un receptor de Fc de Ig (FcR $\gamma$ ).
- 30 6. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha región intracelular incluye una fracción de señalización de una proteína coestimuladora-receptora de célula T, preferiblemente al menos una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste de CD28, OX40, CD40L, 4-1BB (CD137) y PD-1.
- 35 7. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha región de señalización intracelular incluye una enzima de transducción de señal que (a) es una enzima en la ruta de transducción de la señal de un receptor específico del antígeno de una célula T o (b) es una enzima con la correspondiente especificidad y actividad que la enzima de (a), derivada de un linfocito que no es de las células T, preferiblemente un miembro de la familia quinasa Syk.
- 40 8. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho ácido nucleico quimérico incluye además una secuencia de nucleótidos que codifica FoxP3 que provocará que la Treg redirigida exprese Foxp3.
9. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho antígeno o ligando objetivo es uno que está presente o expresado en un sitio o tejido objetivo de una respuesta autoinmune o inflamatoria mediada por Las células T efectoras autoagresivas.
- 45 10. La población de las células T redirigidas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha respuesta autoinmune o inflamatoria y dicho antígeno o ligando objetivo se seleccionan del grupo que consiste de:
- (a) enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en donde dicho antígeno o ligando es uno que se expresa en colon o íleon enfermo;

- (b) artritis reumatoide, en donde dicho antígeno o ligando es un epítipo de colágeno o un antígeno presente en las articulaciones;
- (c) esclerosis múltiple, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno neuronal.
- (d) tiroiditis autoinmune, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno de tiroides;
- 5 (e) gastritis autoinmune, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno gástrico;
- (f) uveítis autoinmune o uveorretinitis, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno S u otro antígeno uveal o retinal
- (g) orquitis autoinmune, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno testicular;
- (h) ooforitis autoinmune, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno de ovario;
- 10 (i) psoriasis, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno queratinocito u otro antígeno presente en la dermis o epidermis;
- (j) vitiligo, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno de melanocito;
- (k) prostatitis autoinmune, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno de próstata;
- 15 (l) cualquier respuesta inmune no deseada, en donde dicho antígeno o ligando es un antígeno de activación expresado en células T efectoras presentes en el sitio de la respuesta inmune no deseada;
- (m) rechazo de tejidos, en donde dicho antígeno o ligando es la molécula del MHC que tiene el haplotipo del tejido trasplantado o una porción de esa molécula del MHC; y
- (n) una condición inflamatoria, en donde dicho antígeno o ligando es uno que se expresa en células no linfoides del linaje hematopoyético que participa en la inflamación.
- 20 11. Una composición farmacéutica inmunorreguladora para supresión de una respuesta inmune/inflamatoria o tratamiento de una enfermedad o condición inmune/inflamatoria, que comprende:
- (a) una población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y
- (b) un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutica e inmunológicamente aceptable.
- 25 12. Un método para producir la población de células T redirigidas de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende las etapas (a) - (d):
- (a) proporcionar una población de linfocitos o células T, obtenida de un sujeto, y, opcionalmente, enriquecer o aislar y propagar dicha población de linfocitos o células T;
- (b) inducir un fenotipo de células Treg en dichas células mediante estimulación o activación adecuada de las células por exposición a TGF- $\beta$  u otra citoquina que induce la expresión de Foxp3 induciendo de este modo el fenotipo de Treg;
- 30 (c) antes o después de la etapa (b), transfectar o la transducir las células *ex vivo* con un vector de expresión que codifica de dicho receptor quimérico que se exprese en dicha célula T; y
- (d) opcionalmente, el crecimiento o expansión de las células obtenidas como anteriormente *in vitro*, o que comprende las etapas (e) - (h);
- 35 (e) proporcionar una población de linfocitos o células T, obtenida de un sujeto y, opcionalmente enriquecer o aislar y propagar, una población de linfocitos o células T;
- (f) transfectar o transducir las células *ex vivo* con un vector que codifica al receptor quimérico;
- (g) antes, después, o concomitantemente con la etapa (f), transfectar o la transducir las células *ex vivo* con un constructo de expresión de ácido nucleico recombinante que codifica Foxp3; y

(h) opcionalmente, cultivar o expandir las células obtenidas como anteriormente *in vitro*.

5 13. La población de células T redirigidas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en una cantidad efectiva, para uso en un método para mediación de una respuesta inmune o inflamatoria o en el tratamiento o alivio de los síntomas de una enfermedad o condición inmune/inflamatoria en un sujeto mamífero, mediante la administración a un sitio de células T efectoras que van a suprimir una cantidad de dichas células Treg efectivas para suprimir dicha actividad de células T efectoras.

10 14. La población de células T redirigidas para uso de acuerdo con la reivindicación 13, para el tratamiento o alivio de los síntomas de una enfermedad o condición inmune/inflamatoria en un sujeto mamífero que es mediada por actividad indeseada de células T efectoras, que incluye además, ya sea antes, concomitantemente con, o después de la administración de las células Treg redirigidas, la introducción al sitio o tejido objetivo de dicha respuesta inmune o inflamatoria, un antígeno o ligando exógeno y dicho antígeno o ligando objetivo es dicho antígeno o ligando exógeno.

15. Una molécula de ADN quimérica que comprende:

15 (a) un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región de reconocimiento extracelular específica para un antígeno o ligando objetivo, cuya región no comprende un dominio extracelular de proteína del MHC, y en donde dicha región se une al antígeno o ligando objetivo de una manera no restringida al MHC o de una manera que no depende del MHC; dicho antígeno o ligando objetivo siendo uno que está presente o expresado en un sitio o tejido de una respuesta inmune o inflamatoria no deseada;

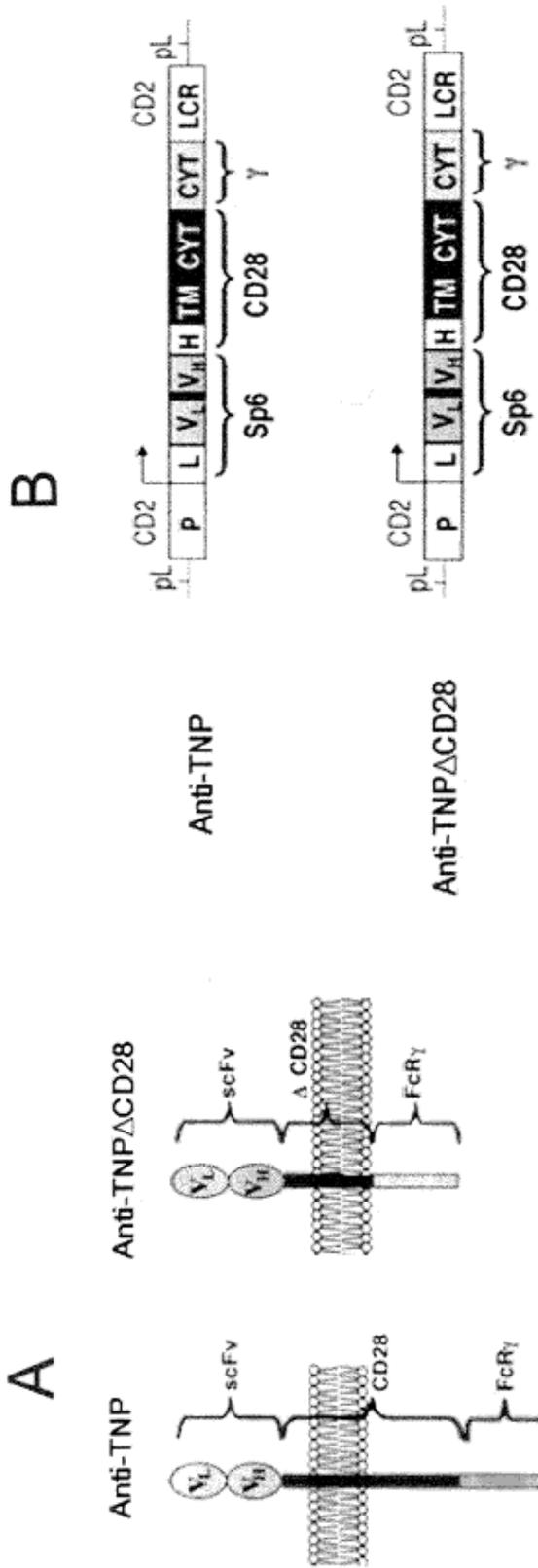
(b) un segundo segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región transmembrana;

20 (c) un tercer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una región de señalización intracelular que comprende una combinación de fracciones de polipéptidos de señalización de células T, y

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica Foxp3 que, tras la transfección o transducción de la molécula quimérica de ácido nucleico en una célula T, causará que la célula T transfectada o transducida exprese Foxp3,

25 en donde, después de la transfección o la transducción de la molécula quimérica de ácido nucleico en una célula T, la célula T expresa un polipéptido receptor quimérico que comprende dicha región de reconocimiento extracelular, dicha región transmembrana y dicha región de señalización intracelular en una sola cadena continua, con la células T desplegando la región extracelular en la superficie celular y expresa Foxp3, convirtiéndose así en un linfocito T redirigido dotado de con el fenotipo de la célula Treg.

30 16. La molécula quimérica de ADN de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicha región de reconocimiento extracelular se une al antígeno o ligando objetivo en una forma independiente del acoplamiento del ligando coestimulador en una célula objetivo.



**Fig. 1**

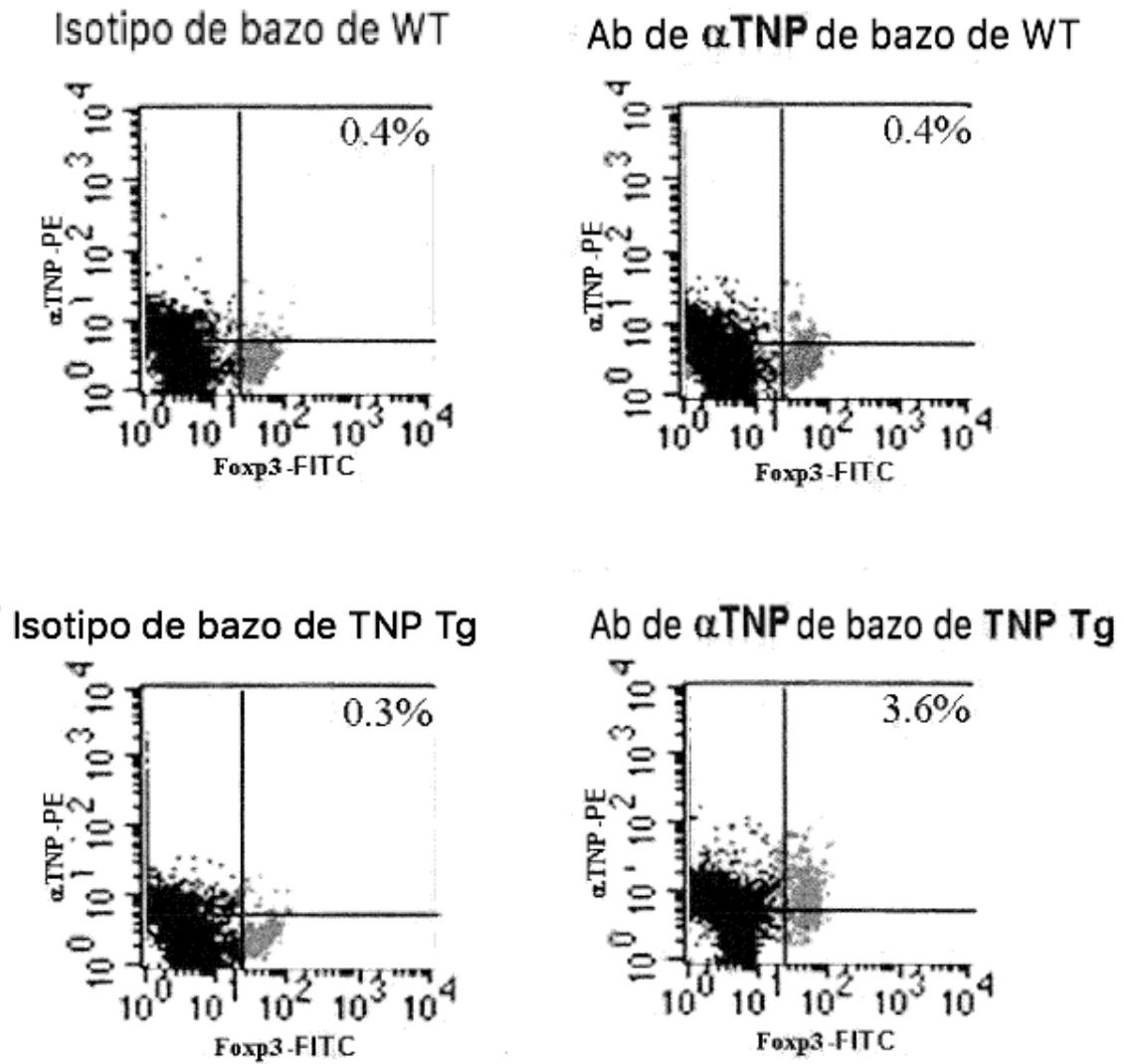
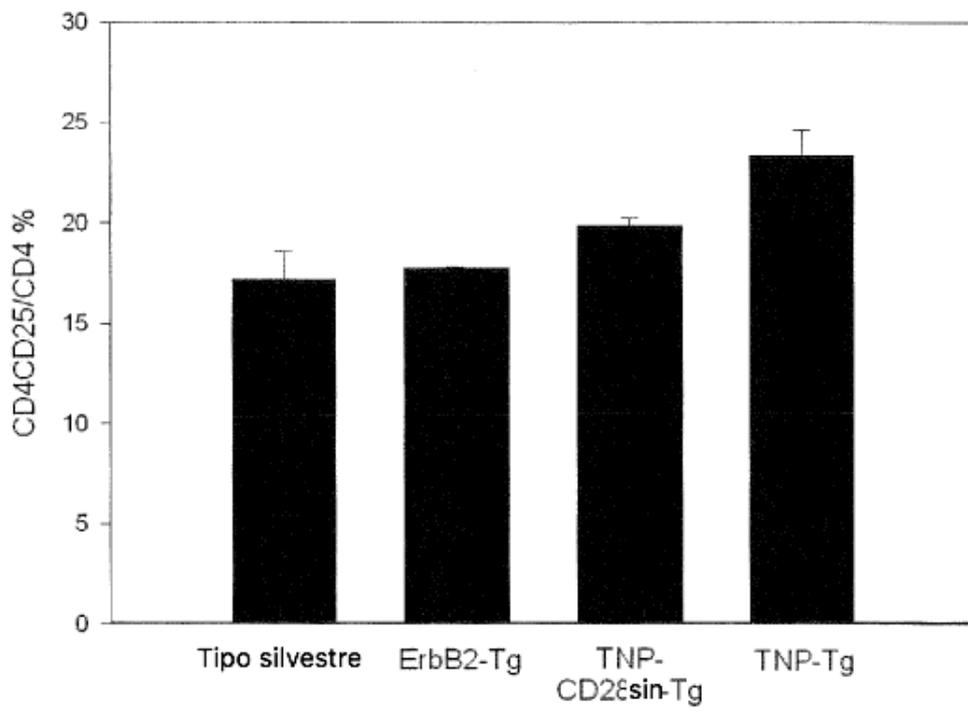


Fig. 2



**Fig. 3**

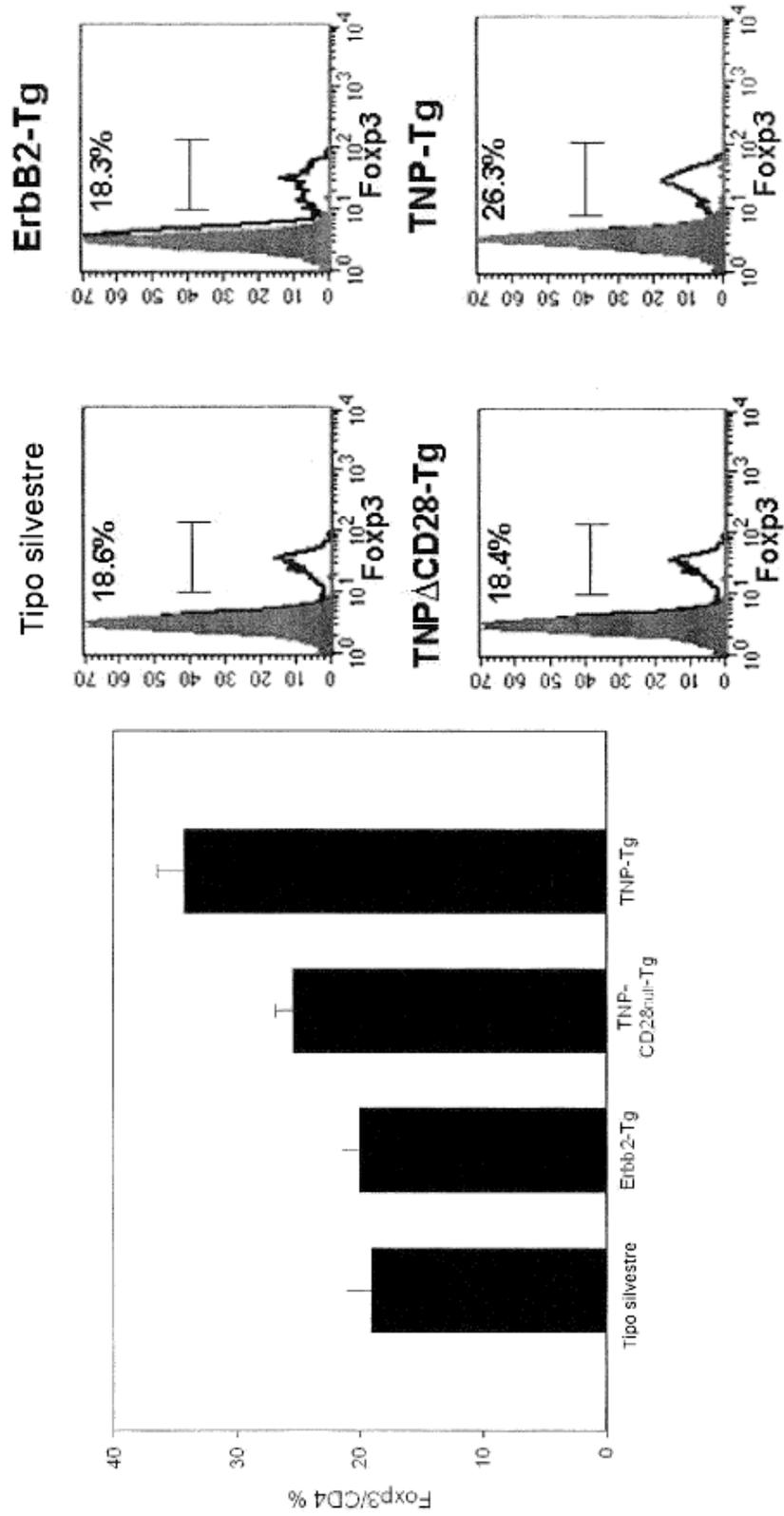


Fig. 4

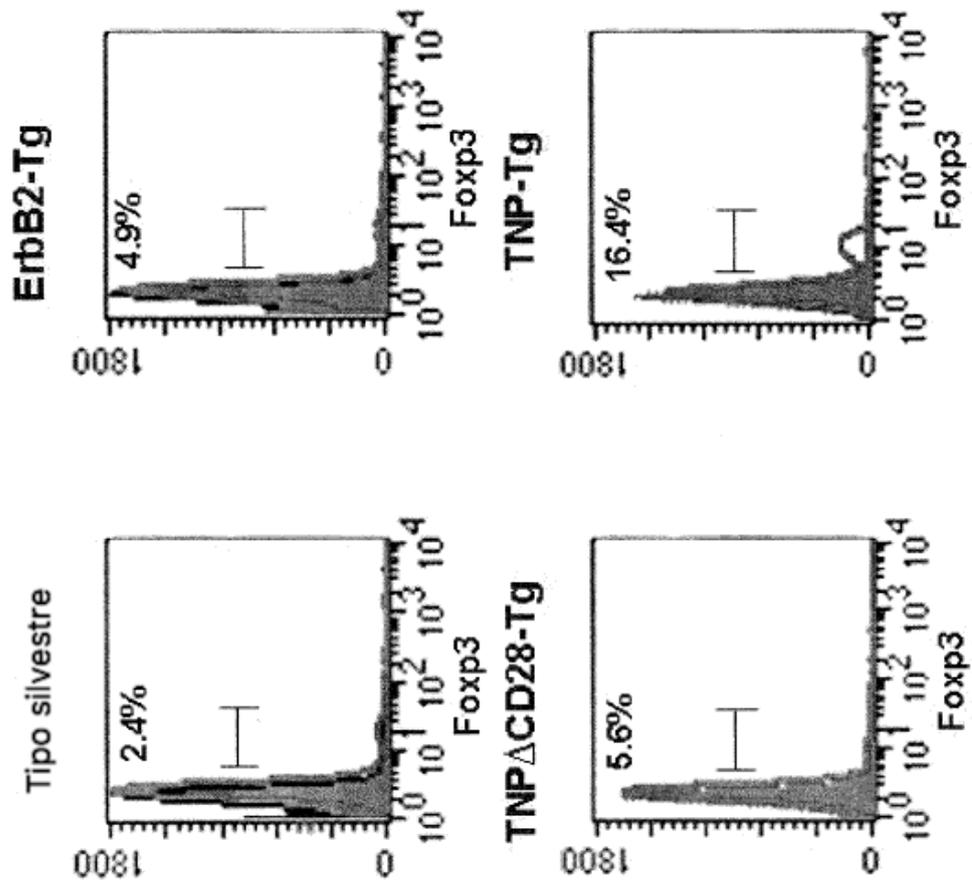


Fig. 5

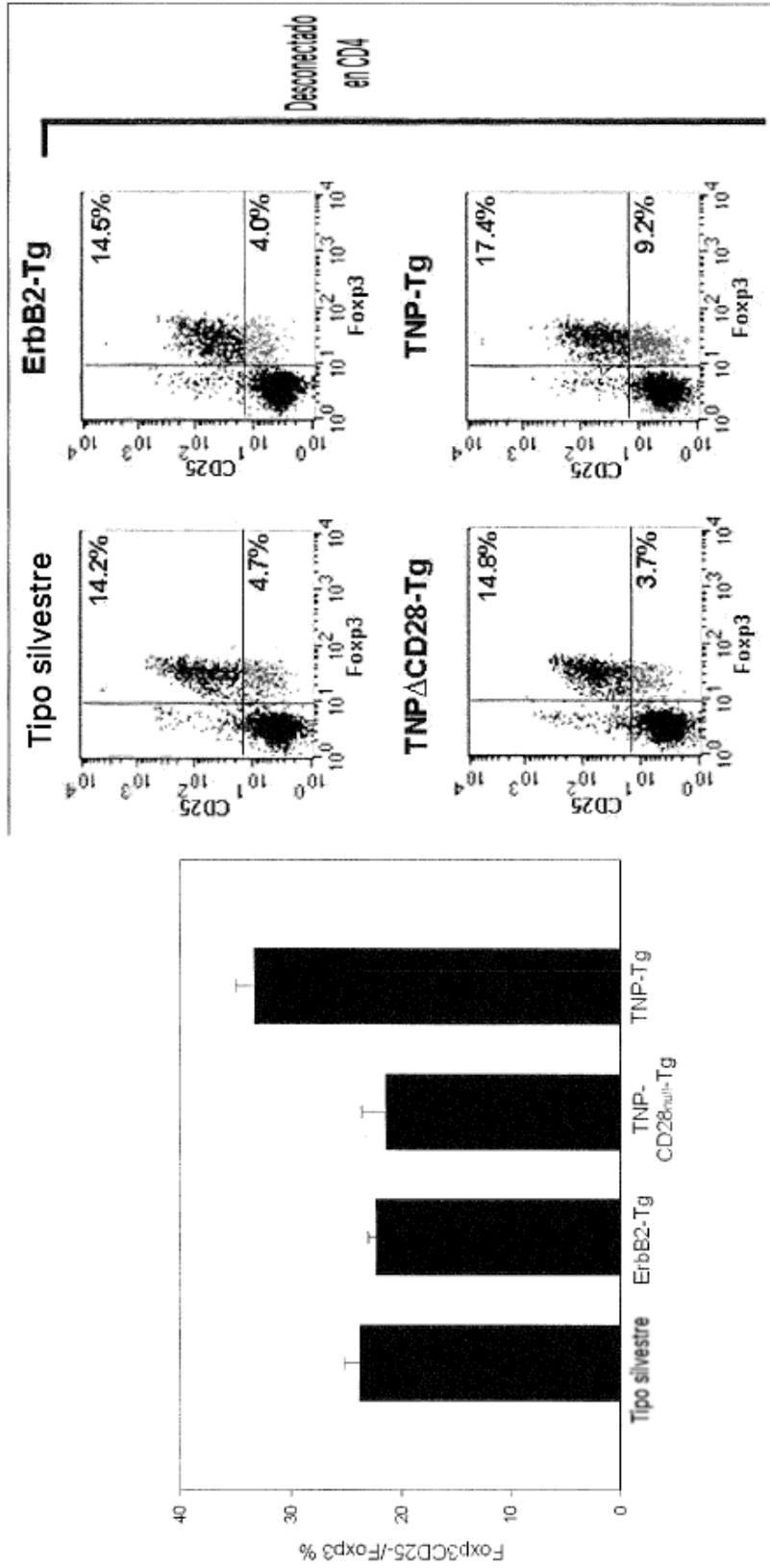


Fig. 6

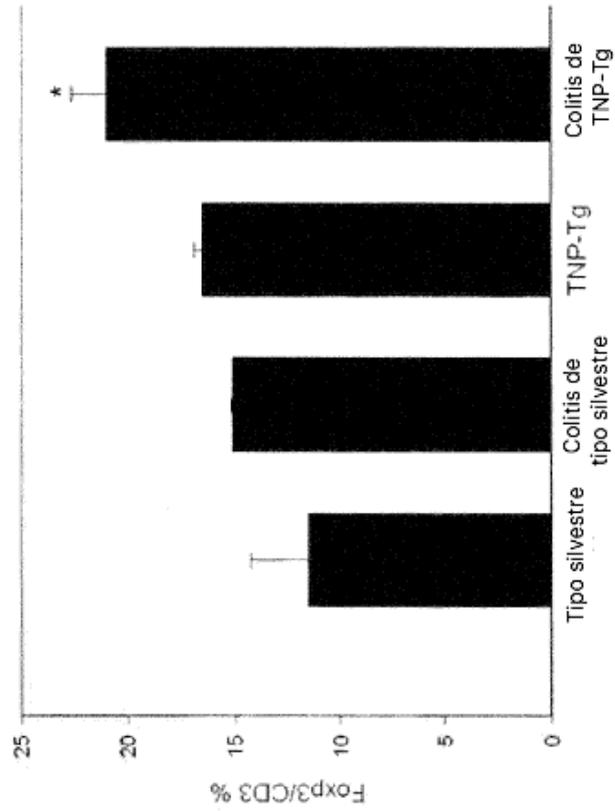


Fig. 8

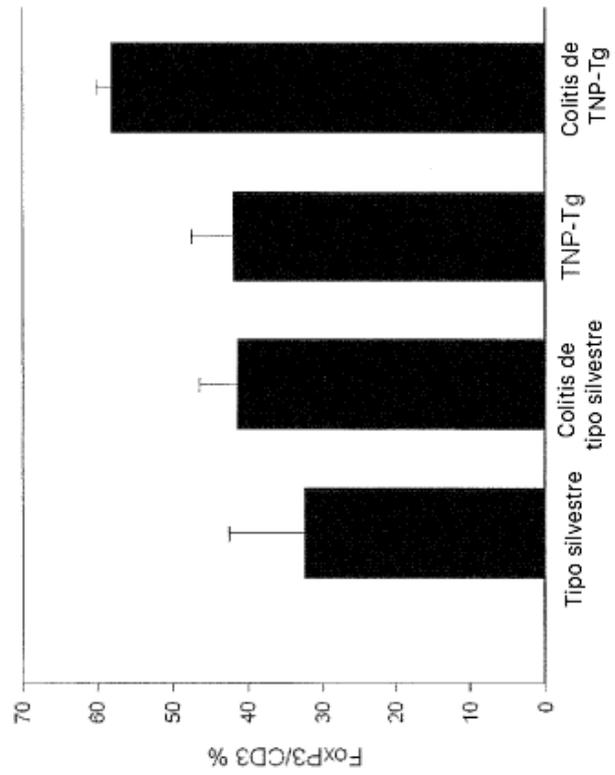
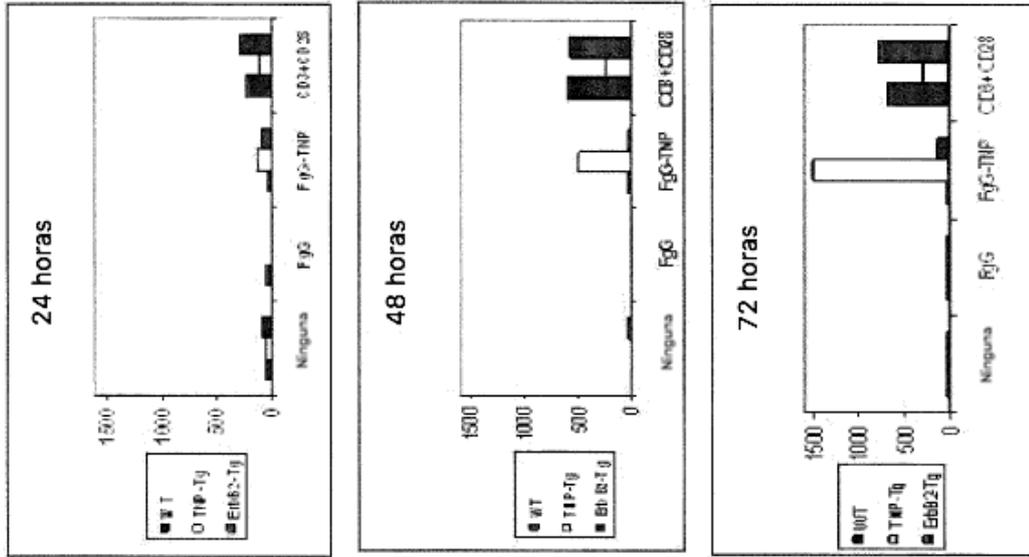


Fig. 7

Proliferación de T efect.



Proliferación de Treg

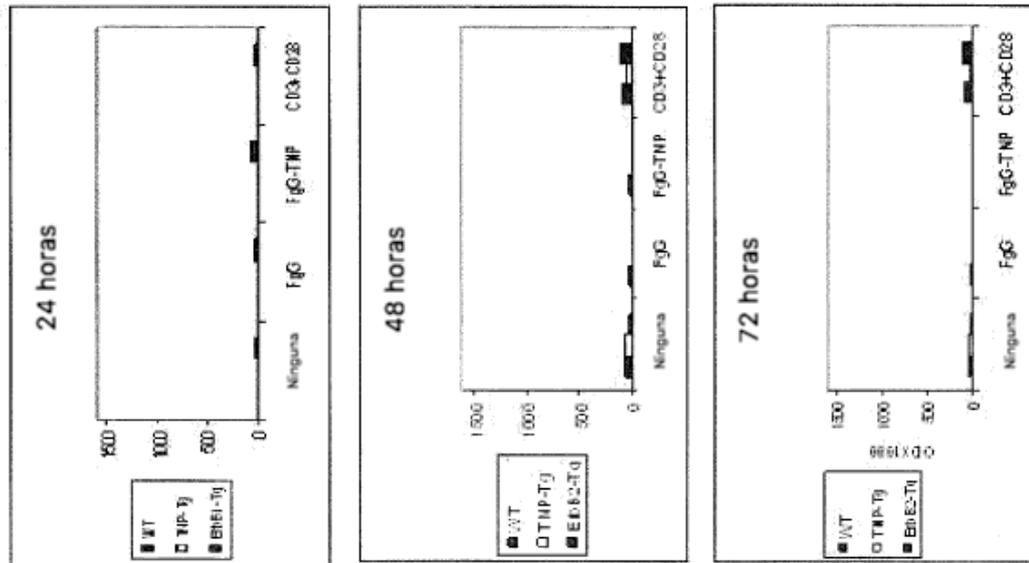


Fig. 9

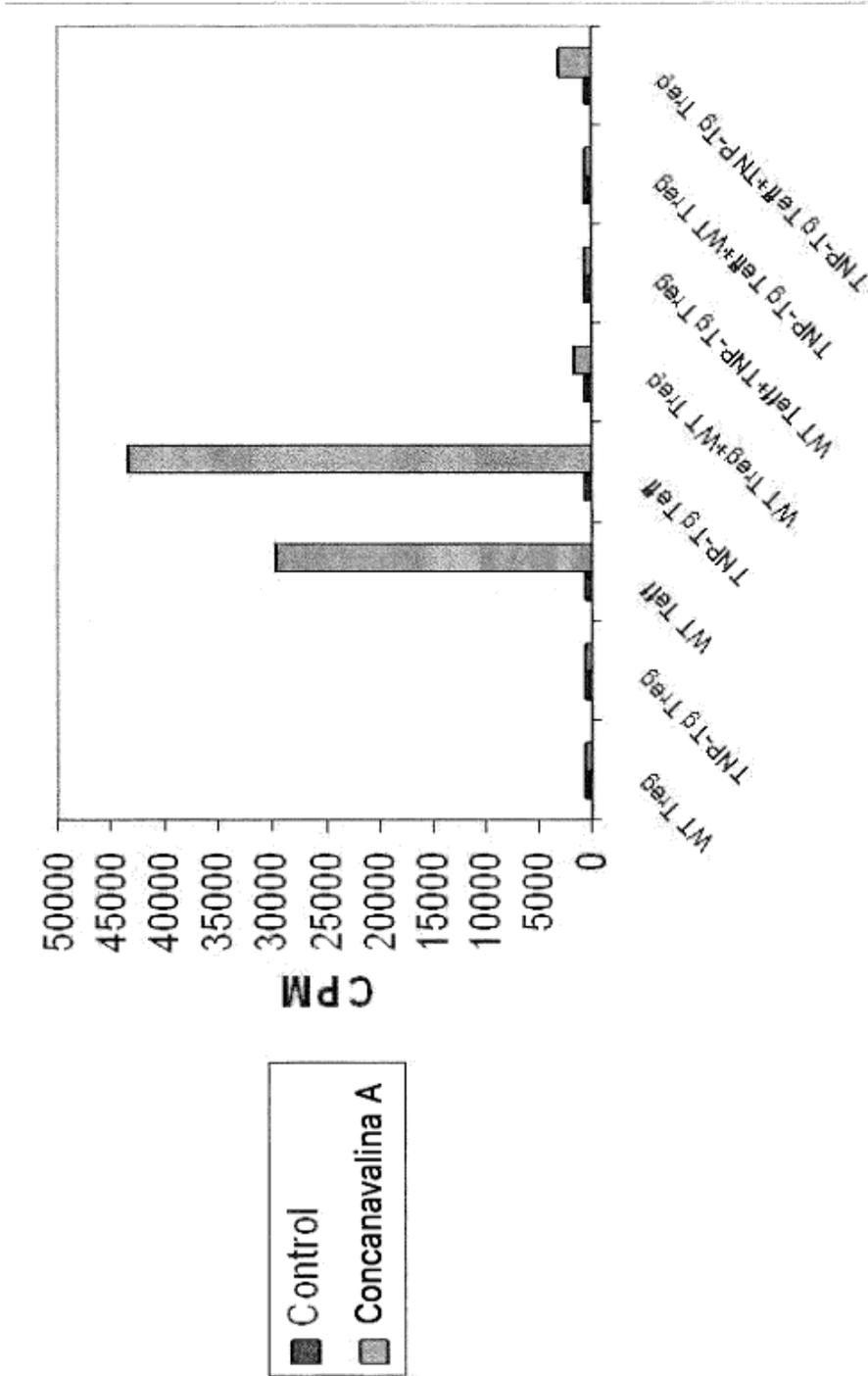


Fig. 10

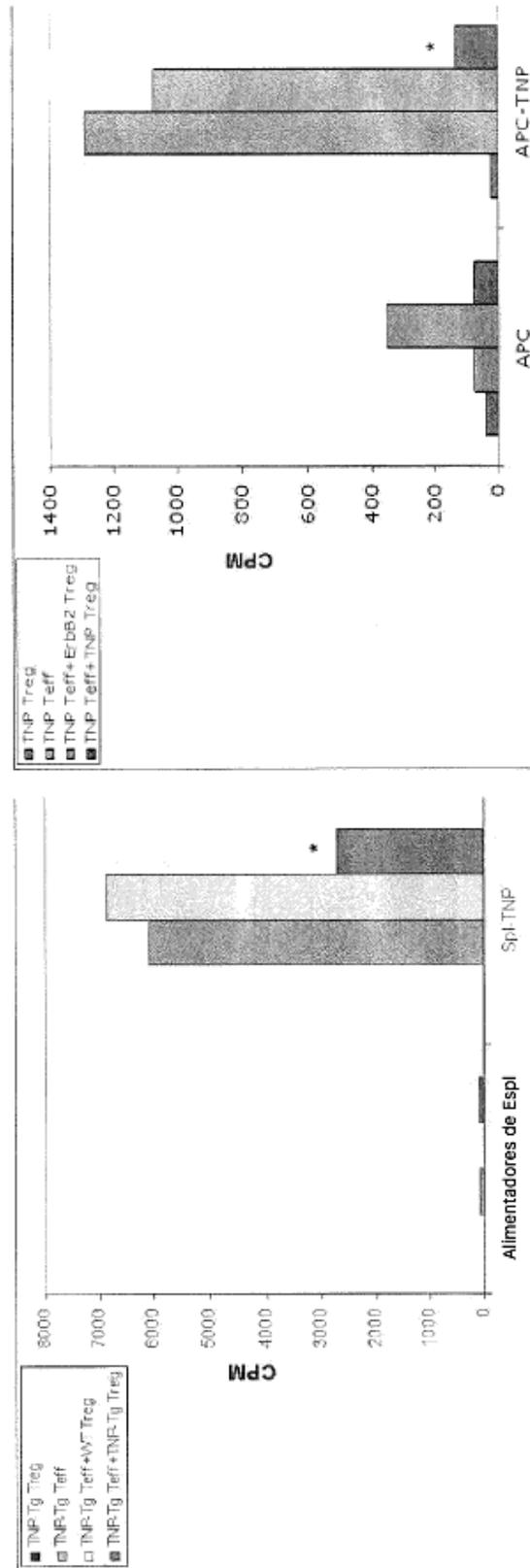


Fig. 11

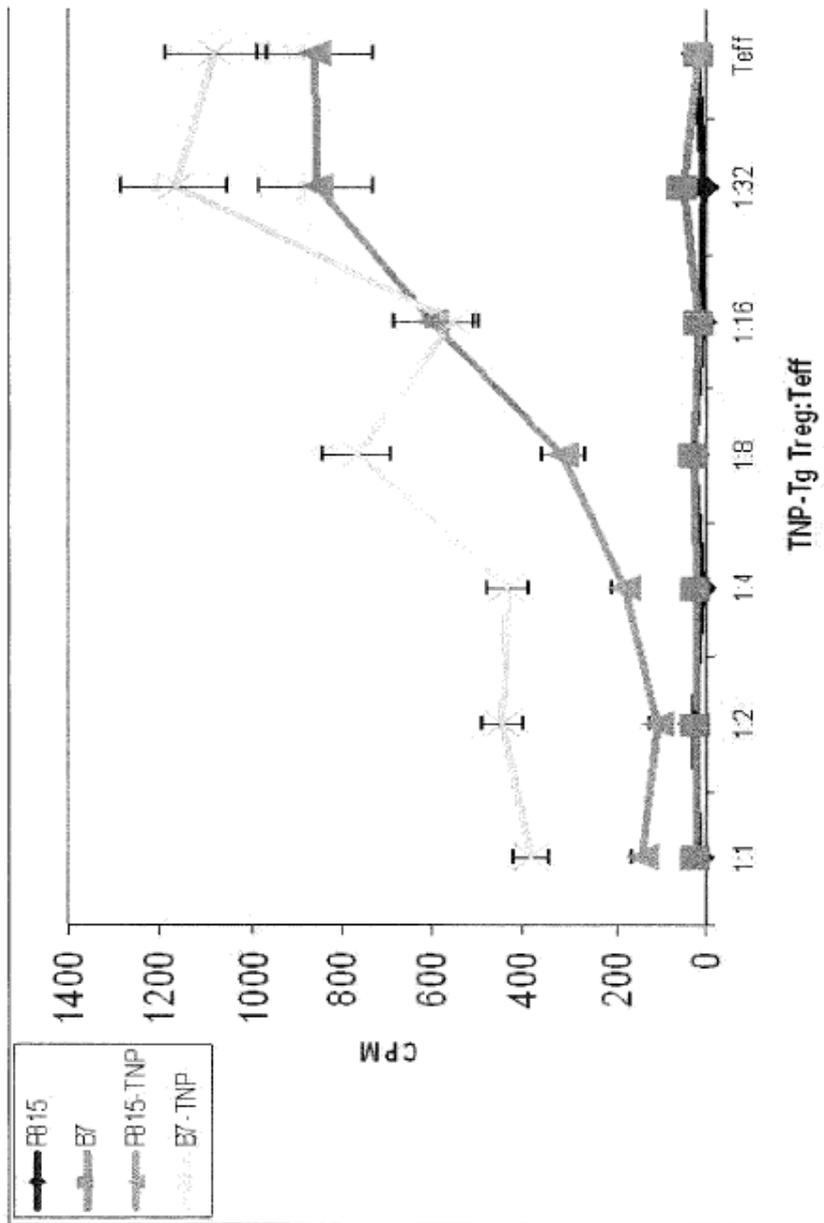


Fig. 12

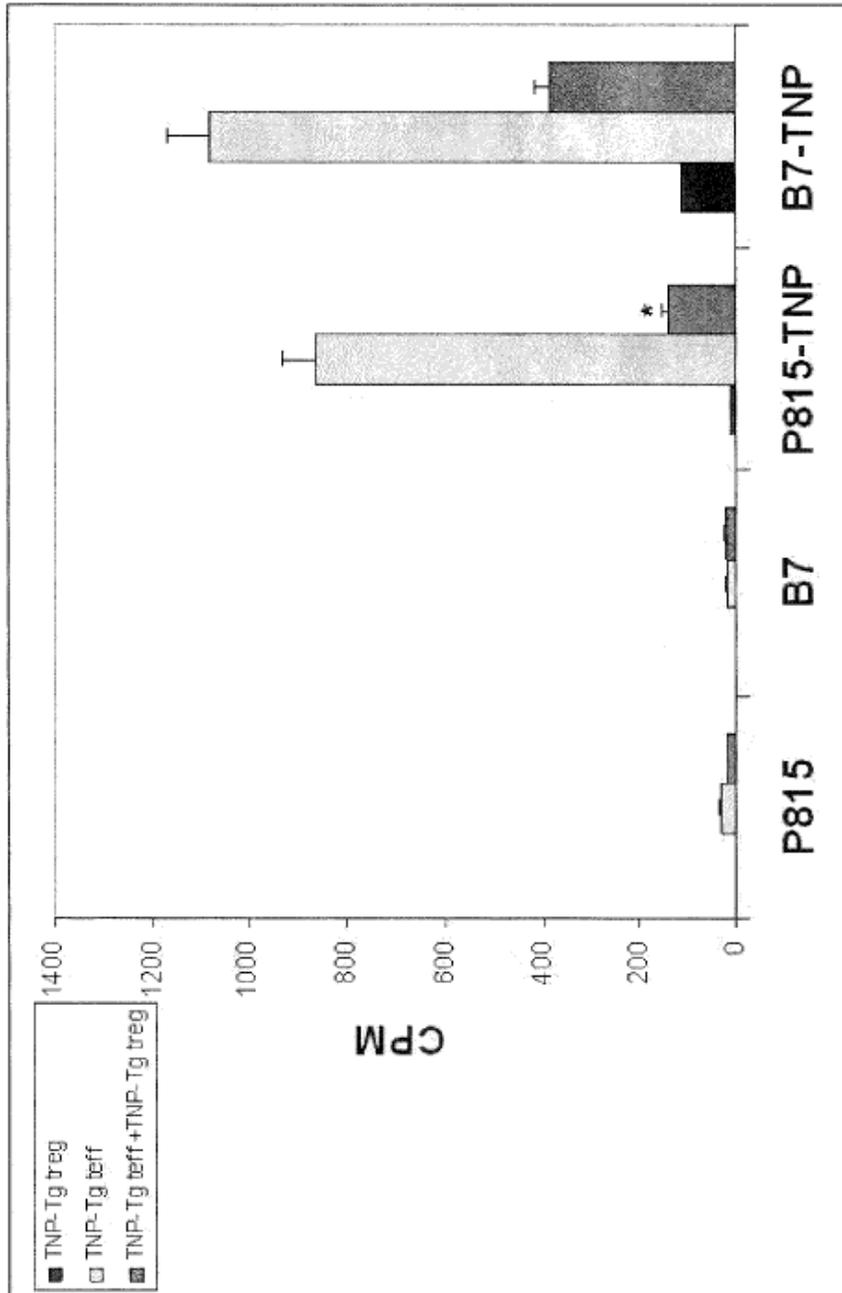


Fig. 13



**Fig. 14**

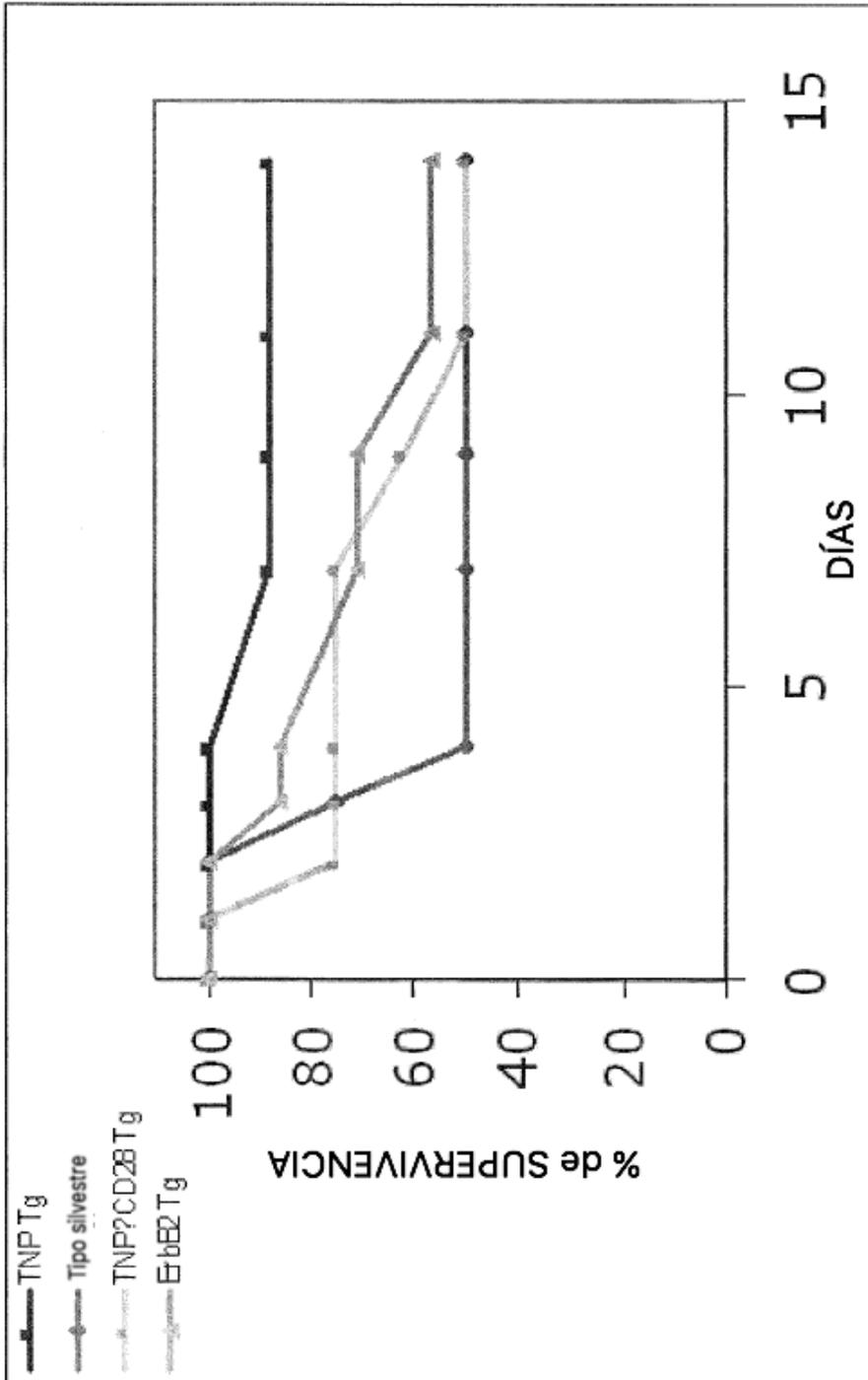


Fig. 15

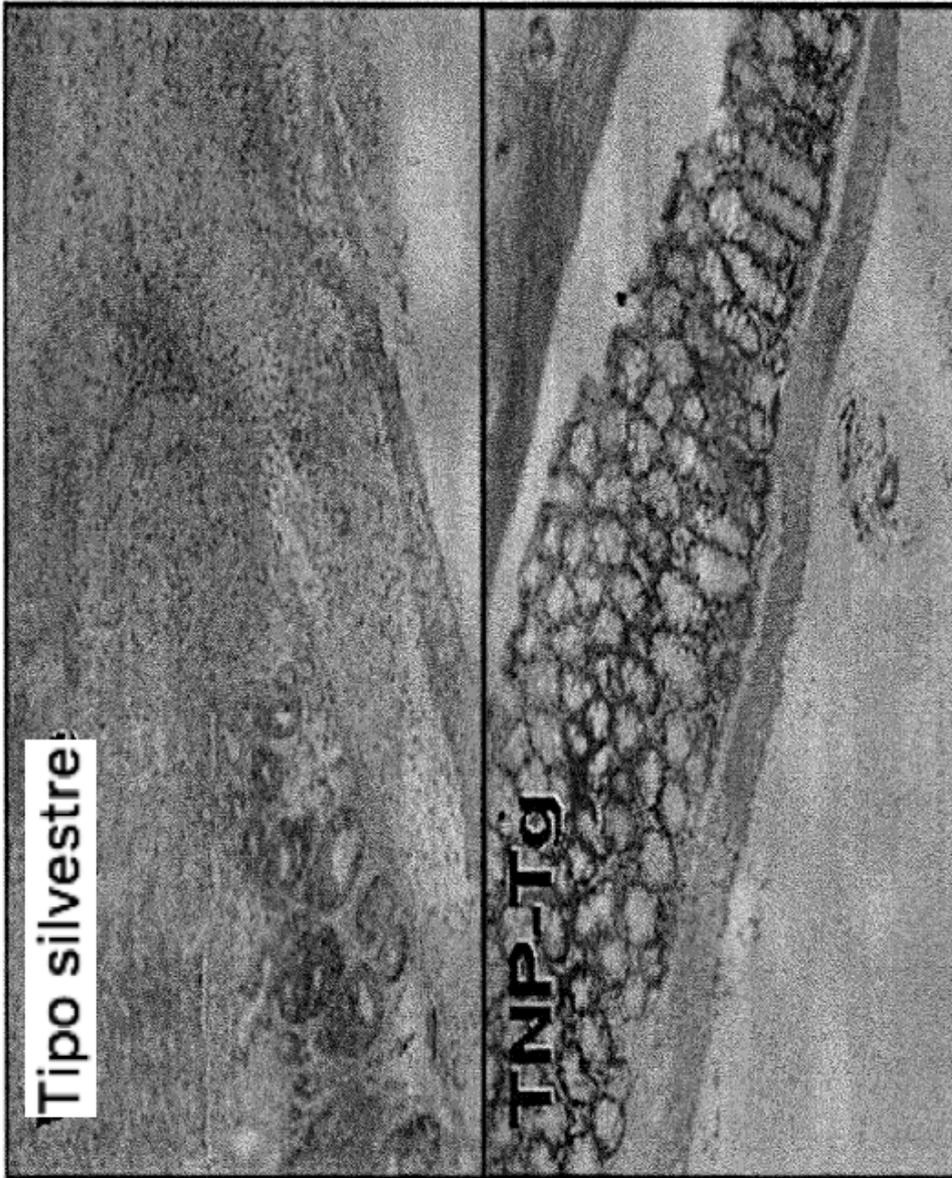


Fig. 16

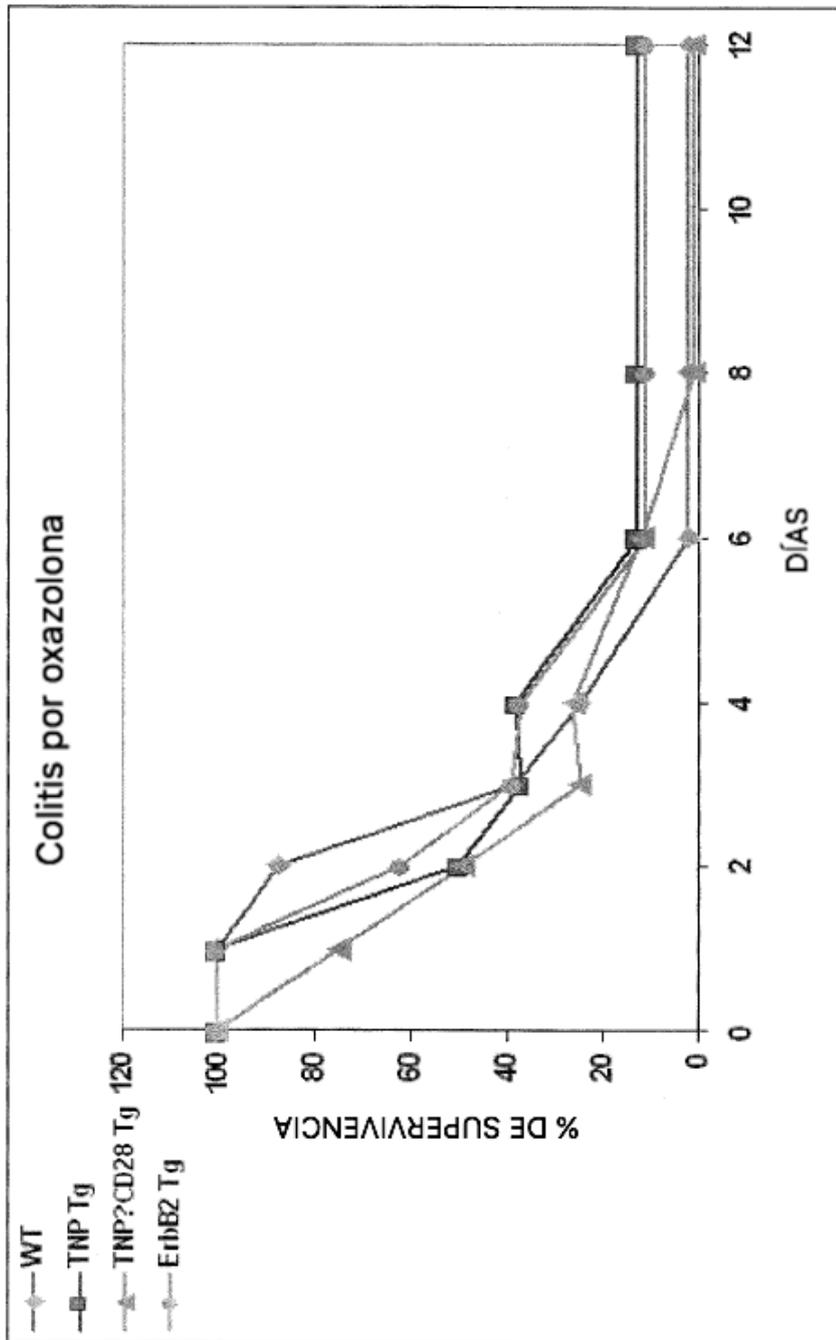


Fig. 17

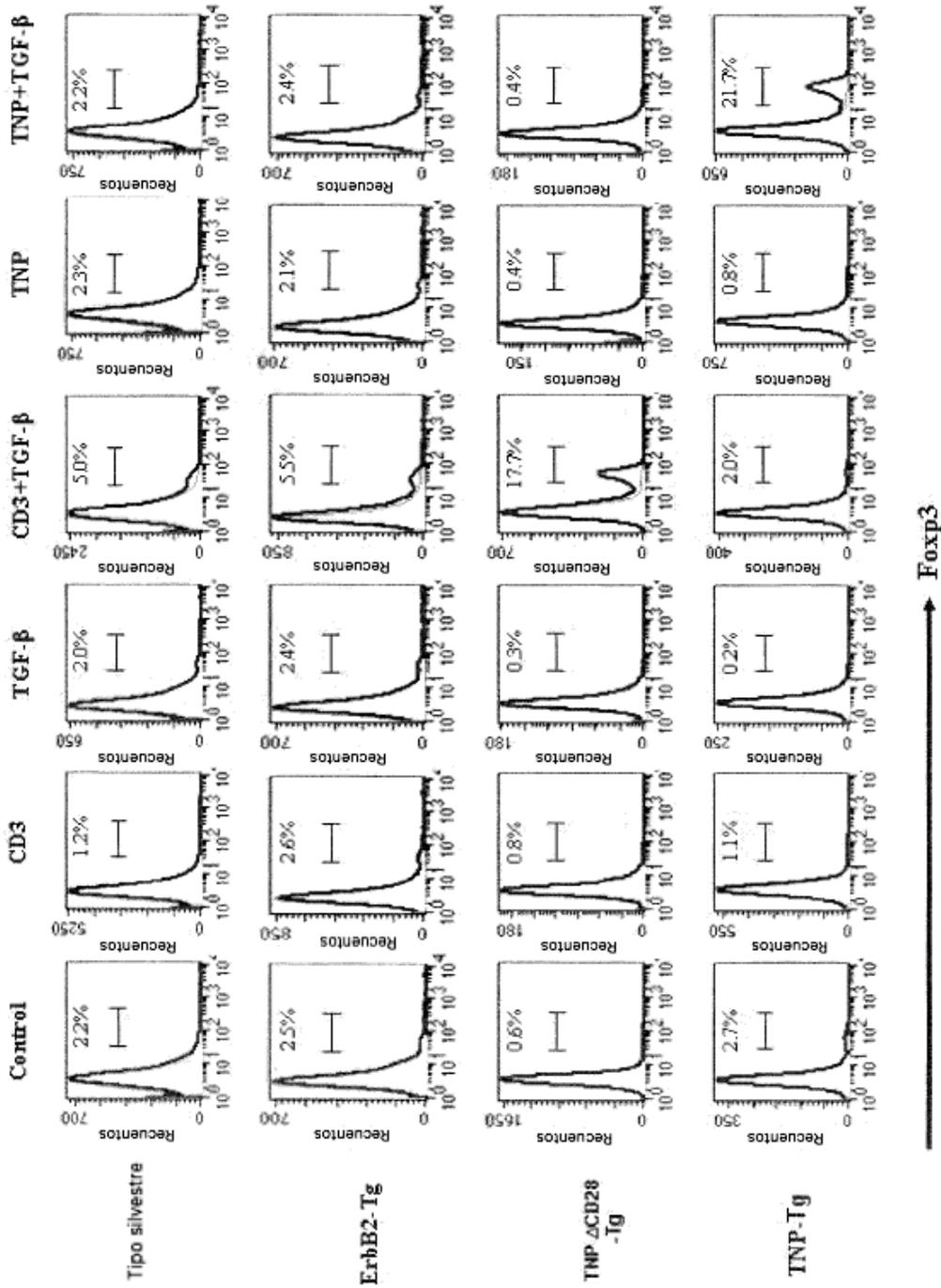
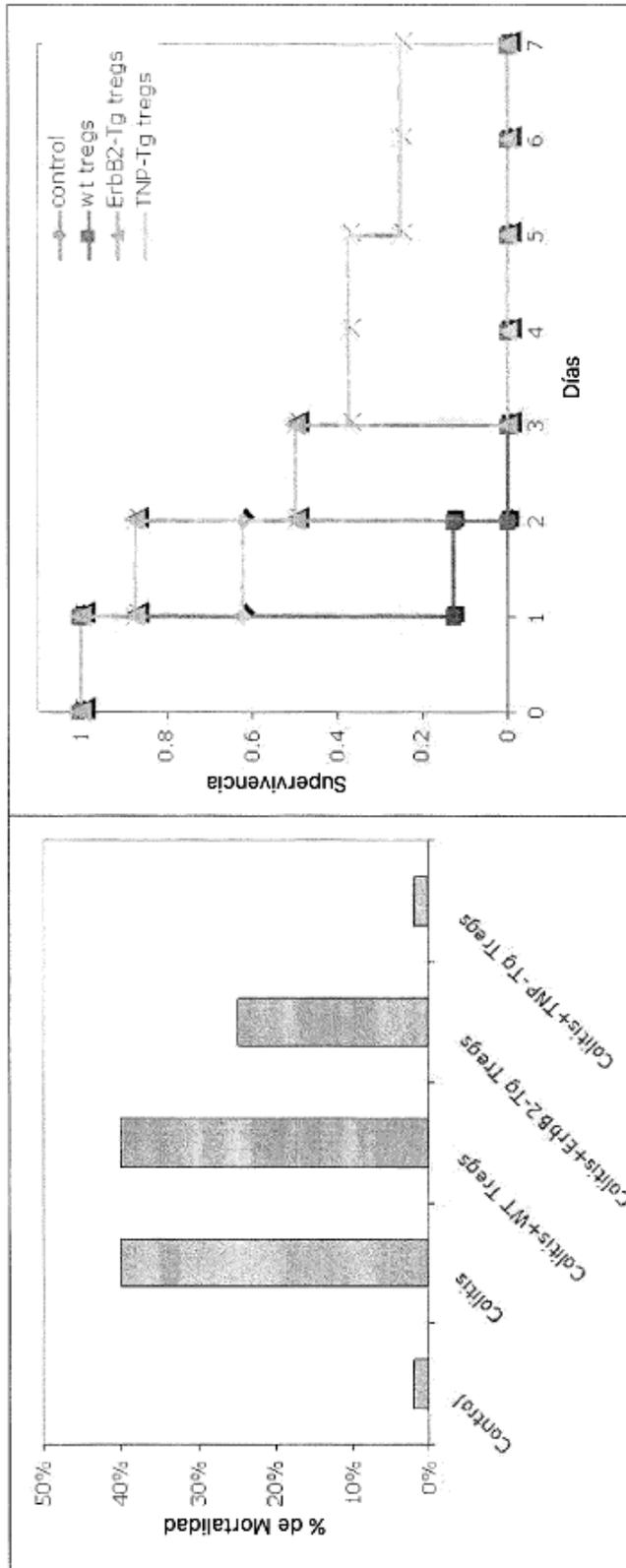


Fig. 18



**Fig. 19**

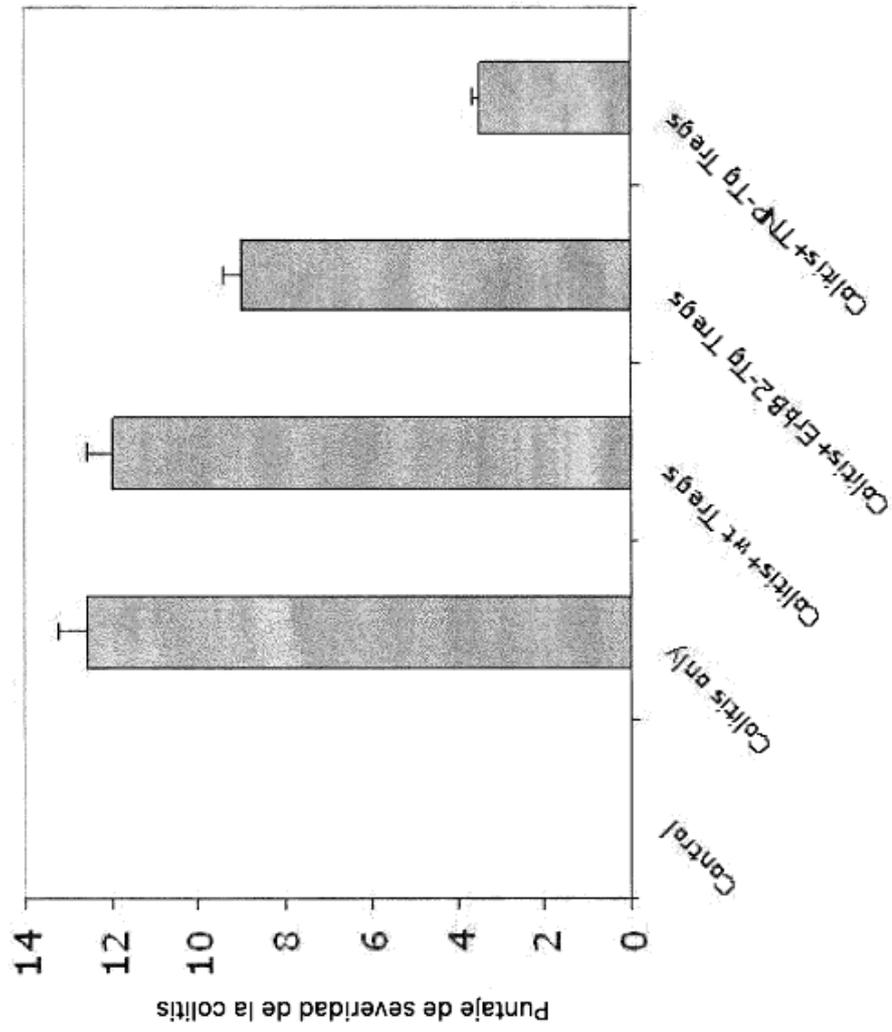
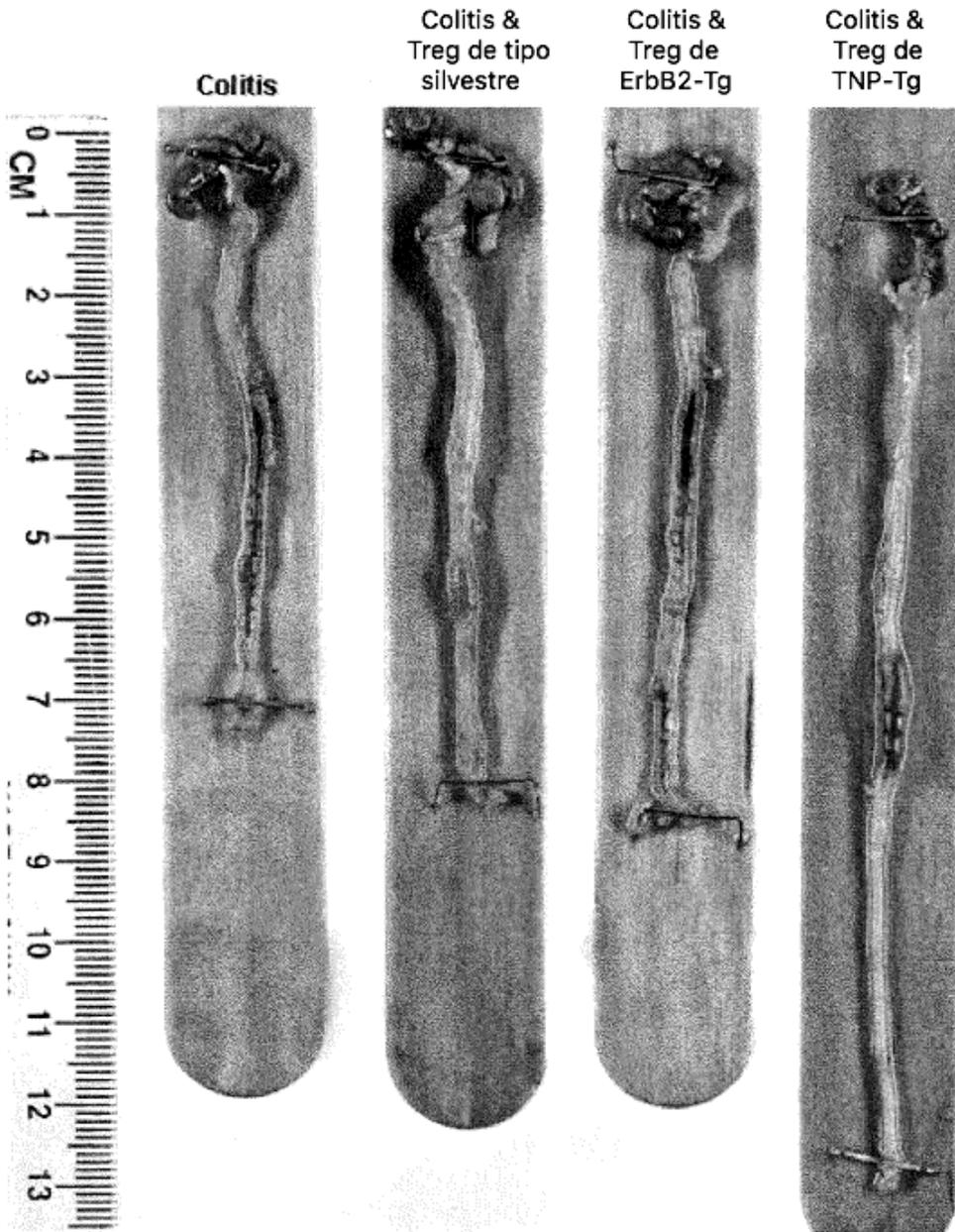
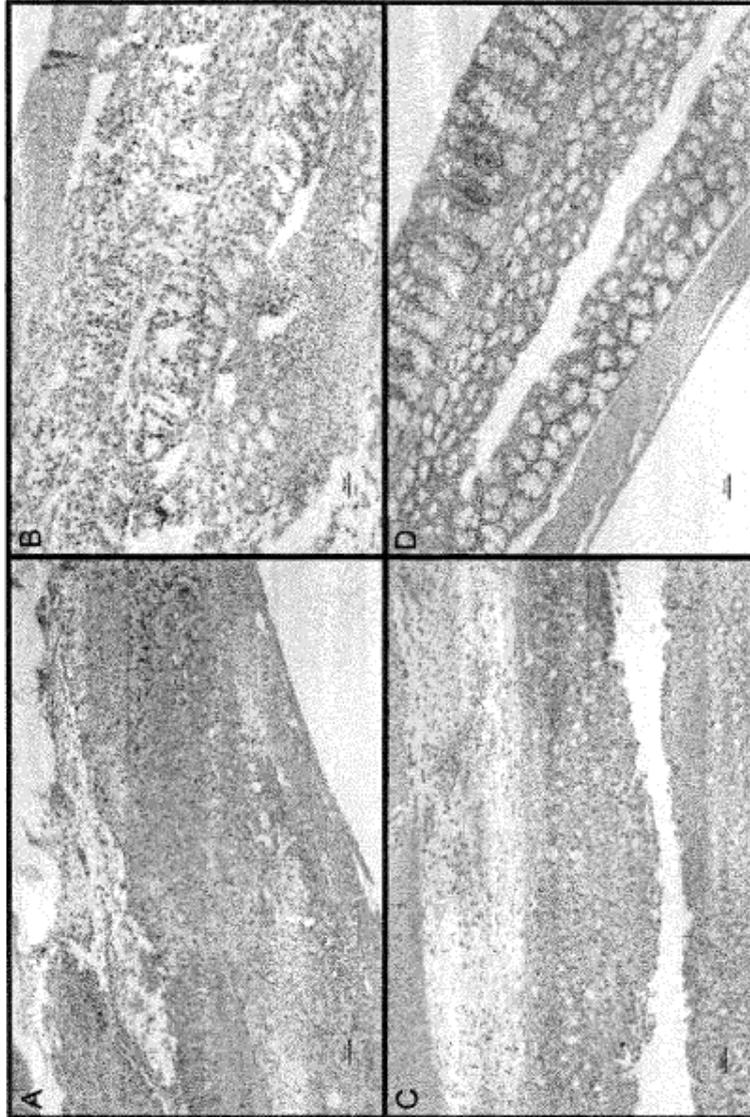


Fig. 20



**Fig. 21**



**Fig. 22**

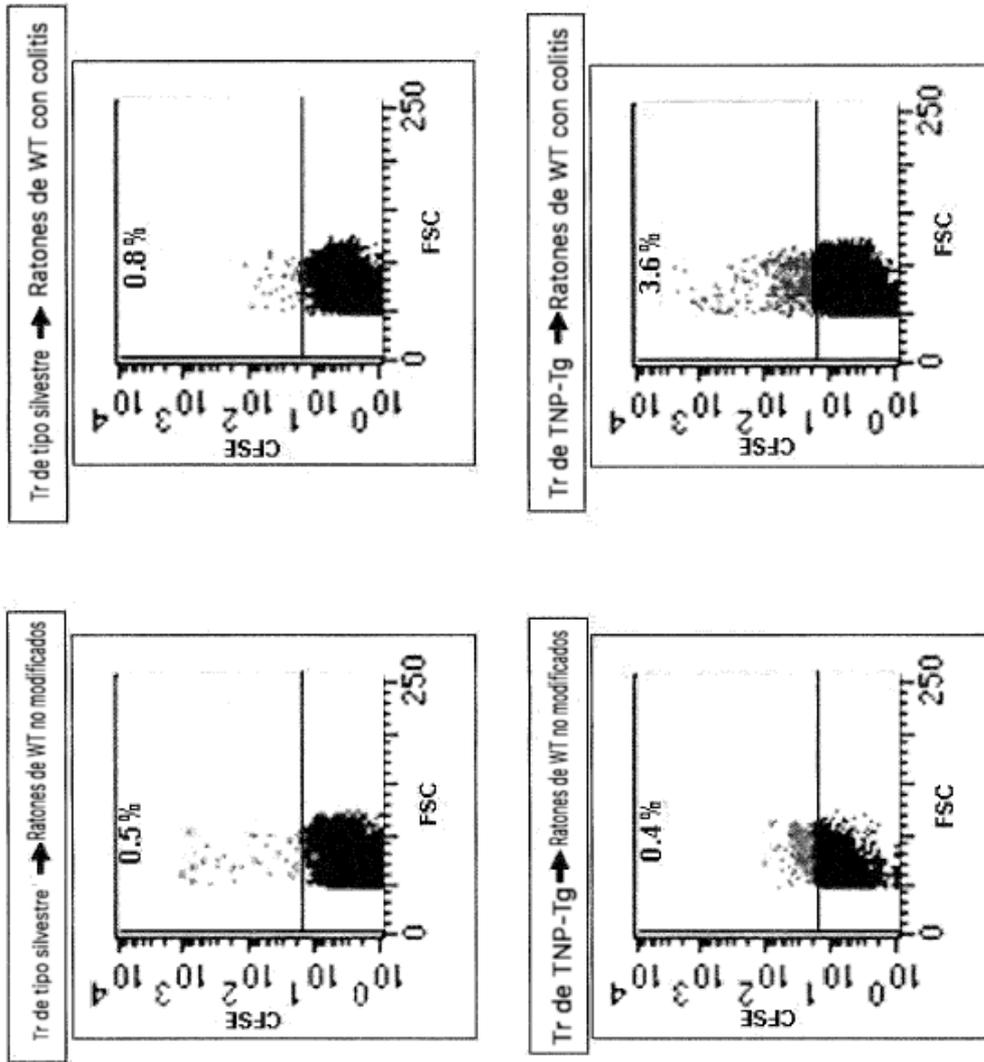


Fig. 23

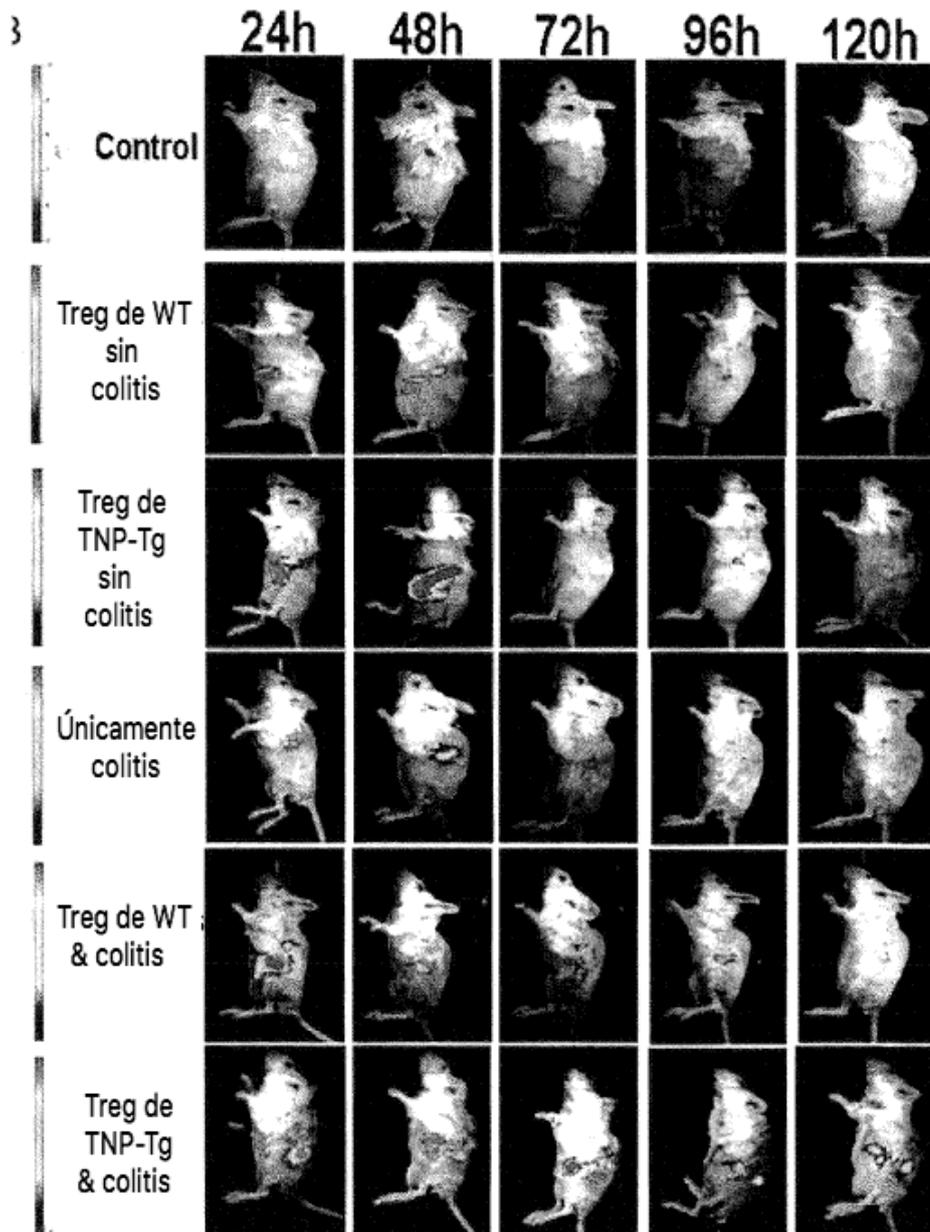
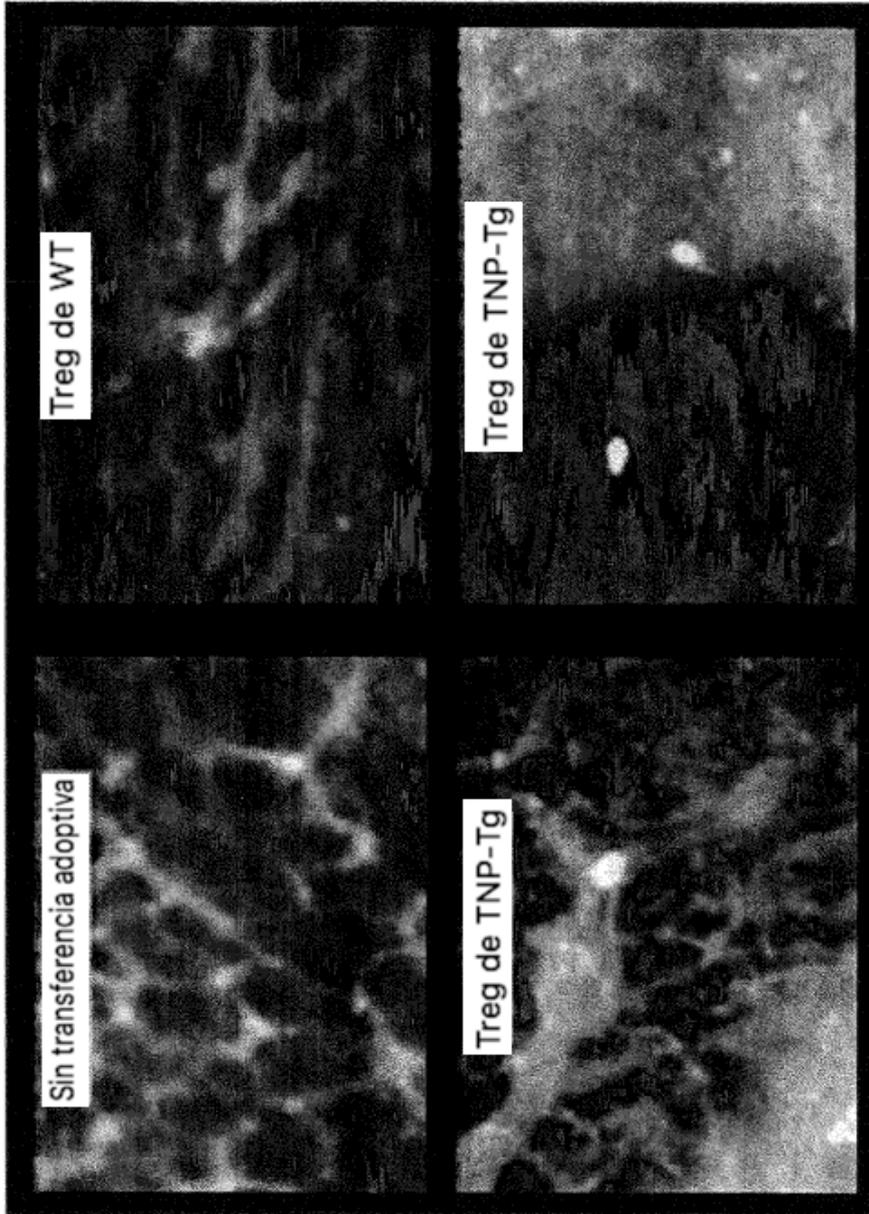


Fig. 24



**Fig. 25**

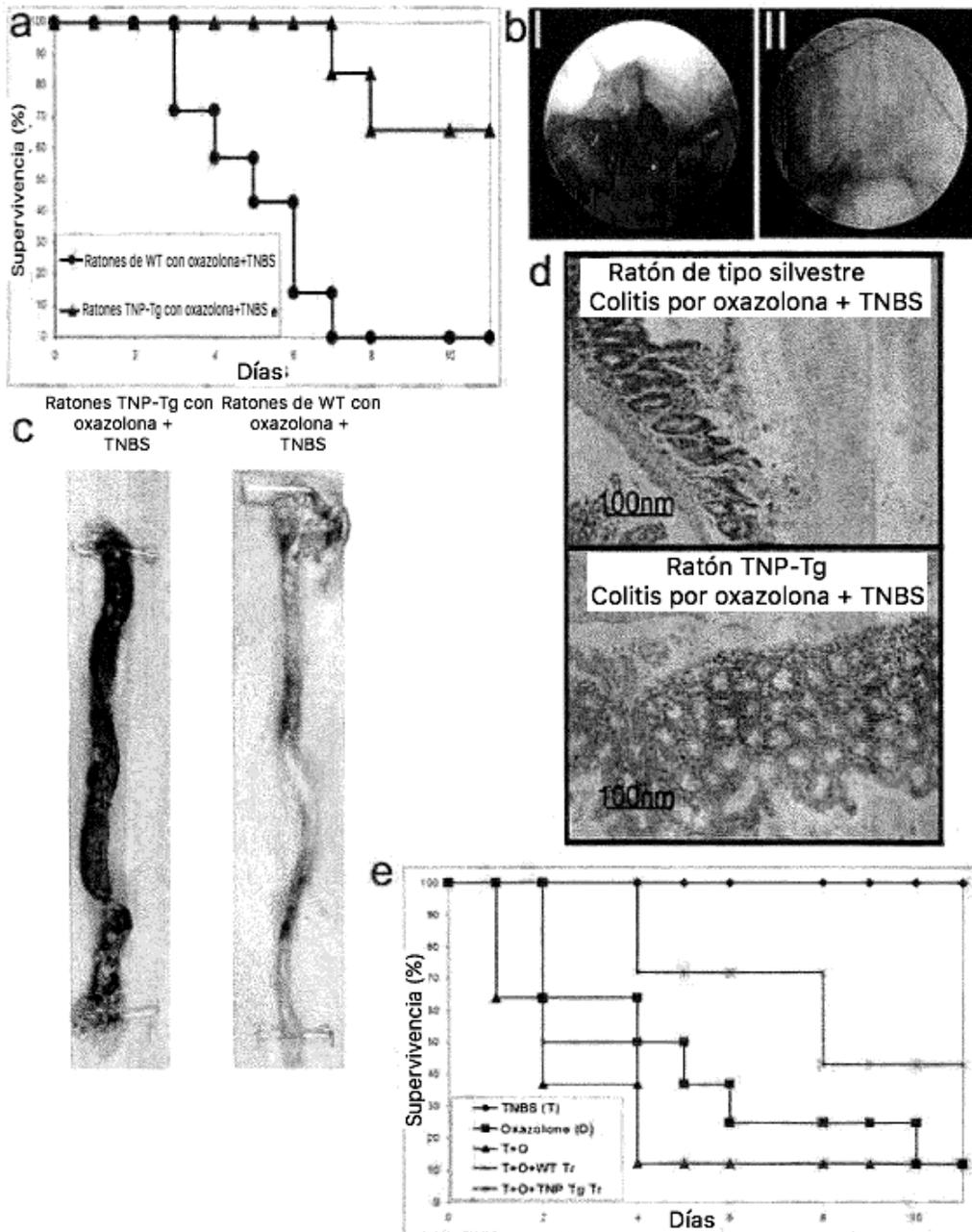


FIG. 26

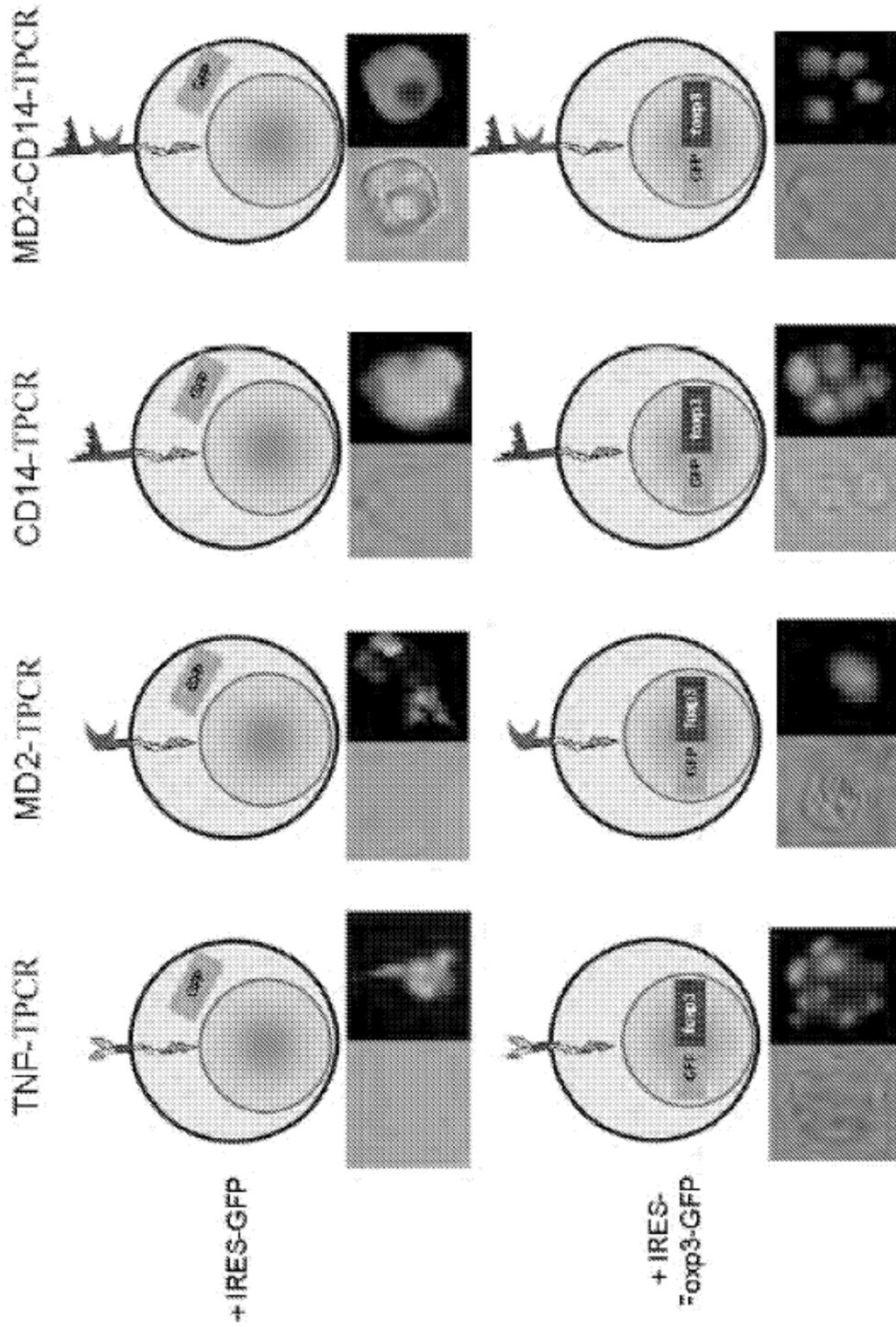
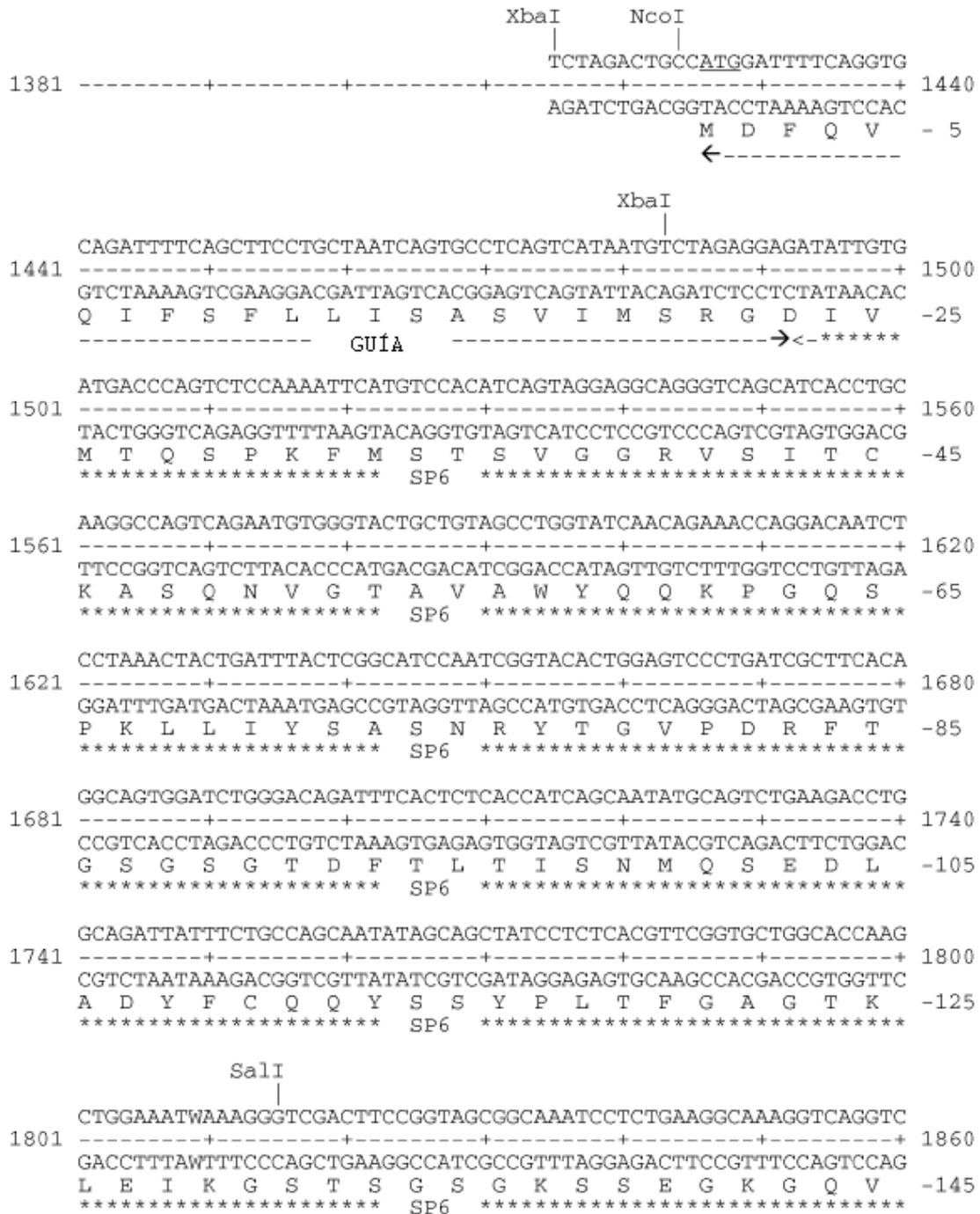


Fig. 27

**FIG. 28**



**Fig. 28 (2)**

```

                                                    EcoRV
                                                    |
1861 CAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGC 1920
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGACGTCGTCAGACCTGGACTCGACCACTTCGGACCCCGAAGTCACTCCTATAGGACG
Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R I S C -165
***** SP6 *****

1921 AAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGCTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGA 1980
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCCGAAGACCGATGTGGAAGTGTTCGATGATATATGTGACCACTTCGTCTCCGGACCT
K A S G Y T F T S Y Y I H W V K Q R P G -185
***** SP6 *****

1981 CAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAAATGTTAATACTAAGTACAATGAG 2040
-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCCTGAACCTCACCTAACCTACCTAAATAGGACCTTTACAATTATGATTCATGTTACTC
Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E -205
***** SP6 *****

2041 AAGTTC AAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAG 2100
-----+-----+-----+-----+-----+
TTCAAGTTC CCGTTCGGTGTGACTGACGTCTGTTTAGGAGGTCGTGTCGGATGACGTC
K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q -225
***** SP6 *****

2101 CTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAACTACGGTAGT 2160
-----+-----+-----+-----+-----+
GAGTCGTCGGACTGGAGACTCCTGAGACGCCAGATAAAGACACGTTCTTTGATGCCATCA
L S S L T S E D S A V Y F C A R N Y G S -245
***** SP6 *****

                                                    BstEII
                                                    |
2161 AGCTACGGGCTTGCTTACTGGGGCCAAGGA ACTACGGTCA CCGTGAAAGGAAACACCTT 2220
-----+-----+-----+-----+-----+
TCGATGCCCGAACGAATGACCCCGTTCCTTGATGCCAGTGGCACTTTCCTTTGTGGAA
S Y G L A Y W G Q G T T V T V K G K H L -265
***** SP6 *****><@@@@@@@ CD28 @@@@@@@@@@

2221 TGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGT 2280
-----+-----+-----+-----+-----+
ACAGGTT CAGGGGATAAAGGGCCTGGAAGATTTCGGGAAAACCCACGACCACCAACCA
C P S P L F P G P S K P F W V L V V V G -285
@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@ CD28 @@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@

2281 GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGG 2340
-----+-----+-----+-----+-----+
CCTCAGGACCGAACGATATCGAACGATCATTTGTCACCGGAAATAATAAAAGACCCACTCC
G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R -305
@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@ CD28 @@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@

```

**Fig. 28 (3)**

```

AGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACTCCCCGCCGCCCGGG
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
TCATTCTCCTCGTCCGAGGACGTGTCACGTGACTGTACTGTACTGAGGGCGGGGGCCC
S K R S R L L H S D Y M N M T P R R P G -325
##### CD28 #####

                                     BglIII
                                     |
CCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATAGATCT
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
GGGTGGGCGTTCGTAATGGTCGGGATACGGGGTGGTGCCTGAAGCGTCGGATATCTAGA
P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S -345
##### CD28 #####><#####

CAAGTGCGAAGGCAGCTATAACCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTTTACACGGGCCTG
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
GTTACAGCTTCCGTCGATATTGGTCGATACTCTTTAGTCTACCACAAATGTGCCCGGAC
Q V R K A A I T S Y E K S D G V Y T G L -365
##### GAMMA #####

AGCACCAGGAACCAGGAGACTTACGAGACTCTGAAGCATGAGAAACCACCACAGTAGCTT
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
TCGTGGTCCCTGGTCTCTGAATGCTCTGAGACTTCGTACTCTTTGGTGGTGCATCGAA
S T R N Q E T Y E T L K H E K P P Q * L -385
###><

XhoI
|
TAGACTCGAG
2581 -----+ 2591
ATCTGAGCTC
* T R G 389
    
```

La secuencia de nucleótidos es la SEQ ID NO: 1

La secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 2

**FIG. 29**

plásmido pBullet con el constructo de CR: scFv de mAb HB9081 fusionado a C28/FcRy (SEQ ID NO:3).

Secuencia del plásmido →

```

gattgactga gtcgcccggg taccggtgta tccaataaac cctcttgagc ttgcatccga
cttggtgctt cgctgttccct tgggaggggc tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg
gggtctttca tttgggggct cgtcccggat cgggagaccc ctgcccaggg accaccgacc
caccaccggg aggtaagctg gccagcaact tatctgtgtc tgtccgattg tctagtgtct
atgactgatt ttatgcgccct gcgtcgggtac tagttagcta actagctctg tatctggcgg
accctgggtg gaactgacga gttcgggaaca cccggccgca accctgggag acgtcccagg
gacttcgggg gccgtttttg tggcccggacc tgagtcctaa aatcccgatc gtttaggact
ctttgggtgca ccccccttag aggagggata tgtggttctg gtaggagacg agaacctaaa
acagttcccc cctccgctctg aatttttctg ttcggtttgg gaccgaagcc gcgccgcgcg
tcttgtctgc tgcagcatcg ttctgtgttg tctctgtctg actgtgtttc tgtatttctg
tgaaatctat ggcccgggct agcctgttac cactccctta agtttgacct taggtcactg
gaaagatgtc gagcggatcg ctcacaacca gtcggtagat gtcaagaaga gacgttgggt
taccttctgc tctgcagaat ggccaacctt taacgtcggg tggccgcgag acggcacctt
taaccgagac ctcatcaccg aggttaagat caaggtcttt tcacctggcc cgcattggaca
cccagaccag gtcccctaca tctgtacctg ggaagccttg gcttttgacc ccctccctg
ggtaagccc tttgtacacc ctaagcctcc gcctcctctt cctccatccg ccccgctctt
cccccttgaa cctcctcgtt cgacccccgc tctgatcctcc ctttatccag ccctcactcc
ttctctagge gcccccatat ggccatataga gatcttataat ggggcacccc cgccccctgt
aaacttccct gaccctgaca tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt
acaggctctc tacttagtcc agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga
acaactggac cgaccgggtg tacctcaccg ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg
ccgacaccag actaagaacc tagaacctcg ctggaaagga ccttacacag tctctgtgac
ccccccacc gccctcaaag tagacggcat cgcagcttgg atacacgccc cccacgtgaa
ggctgccgac cccgggggtg gaccatcctc tagactgcc
    
```

Guía →

**ATG** GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA

Inicio de scFv - (Cadena L)

GTC ATA ATG TCT AGA GGA GAT ATT GTG CTC ACA CAG TCT CCA TCC TCC  
 CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACT ATG AGC TGC AAA TCC AGT  
CAG AGT CTG CTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC TTG GCT TGG TAC  
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC  
ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG  
ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA  
GTT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTG TAC ACG TTC GGA GGG GGG

Final de cadena L

ACC AAG CTG GAA ATA AAA GGG TCG ACT tcc ggt agc ggc aaa tcc tct

Inicio de cadena H

gaa ggc aaa ggt gag gtc CAG CTG CAG CAG TCT GGA GGT GGC CTG GTG  
CAG CCT GGA GGA TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCA GGA TTC GAT  
TTT AGT AGA TAC TGG ATG AGT TGG GTC CGG CAG GCT CCA GGG AAA GGG  
CTA GAA TGG ATT GGA GAA ATT AAT CCA GAT AGC AGT ACG ATA AAC TAT  
ACG CCA TCT CTA AAG GAT AAA TTC ATC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAA  
AAT ACG CTG TAC CTG CAA ATG AGC AAA GTG AGA TCT GAG GAC ACA GCC  
CTT TAT TAC TGT GCA AGA CGT TAT GGT AAC TAC TGG TAC TTC GAT GTC

Final de la cadena H sitio de Bst Ell Inicio de CD28/FcRy →

TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTG AAA GGG AAA CAC CTT TGT CCA  
 AGT CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG  
 GTT GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT  
 ATT ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC  
 TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAC CAT TAC  
 CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG  
 CGA AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG  
 GGC CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG

**Fig. 29 (2)**

final de FcRy/ IRES + Secuencia del plásmido  
 AAA CCA CCA CAG TAG ctttagactc gagcgggatc aattccgccc cccccctaa

gttactggcc	gaagccgctt	ggaataaggc	cggtgtgcgt	ttgtctatat	gttattttcc
accatattgc	cgtcttttgg	caatgtgagg	gcccggaaaac	ctggccctgt	cttcttgacg
agcattccta	ggggctcttc	ccctctcgcc	aaaggaatgc	aaggctctgtt	gaatgtcgtg
aaggaagcag	ttcctctgga	agcttcttga	agacaaaaca	cgctctgtagc	gaccctttgc
aggcagcggg	acccccacc	tggcgacagg	tgctctgcg	gccaaaagcc	acgtgtataa
gatacacctg	caaagggcggc	acaaccccag	tgccacgttg	tgagttggat	agttgtggaa
agagtcaaat	ggctctcctc	aagcgtattc	aaaagggggc	tgaaggatgc	ccagaaggta
ccccattgta	tgggatctga	tctggggcct	cggtgcacat	gctttacatg	tgtttagtcg
aggttaaaaa	aacgtctagg	cccccgaaac	cacggggacg	tggttttctc	tgaaaaaca
cgataatagc	atgctgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc	ccattctggg
cgagctggac	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgagggcga
tgccacctac	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	tgcccgtgcc
ctggcccacc	ctcgtgacca	ccttcgccta	cgccctgcag	tgcttcgccc	gctaccccga
ccagaagaac	cagcagact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggcagc
caccatcttc	ttcaaggacg	acggcaacta	caagacccgc	gccgaggtga	agttcgaggg
cgacaccctg	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	tcaaggagg	acggcaacat
cctggggcac	aagctggagt	acaactaca	cagccacaac	gtctatatca	tggccgacaa
gtacaagtga	ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccggcac	aacatcgagg	acggcagcgt
gcagctcgcc	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	tgctgctgcc
cgacaaccac	tacctgagca	cccagtcgc	cctgagcaaa	gacccccaac	agaagcgcga
tcacatggtc	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggatc	actctcggca	tggacgagct
gtacaagtga	gtgtaaactc	gaggatccgc	gcccgtcgcg	actcgagaga	tccggattag
tccaatttgt	taaagacagg	atatcagtgg	tccaggctct	agttttgact	caacaatatc
accagctgaa	gcctatagag	tacgagccat	agataaaaata	aaagatttta	tttagtctcc
agaaaaaggg	gggaatgaaa	gaccccacct	gtaggtttgg	caagctagct	taagtaacgc
cattttgcag	gcatggaaaa	atacataact	gagaatagag	aagttcagat	caaggtagag
aacagatgga	acagctgaat	atgggcaaaa	caggatatct	gtggaagca	gttcttgccc
cggtcagggg	ccaagaacag	atggaacagc	tgaatatggg	ccaaacagga	tatctgtggg
aagcagttcc	tgccccggct	cagggccaag	aacagatggt	ccccagatgc	ggctacgccc
tcagcagttt	ctagagaacc	atcagatggt	tccagggtgc	cccaaggacc	tgaaatgacc
ctgtgcctta	tttgaactaa	ccaatcagtt	cgcttctcgc	ttctgttcgc	gcgcttctgc
tccccgagct	caataaaaaga	gcccacaacc	cctcactcgg	ggcgccagtc	ctccgattga
ctgctcgtcc	cggttaccgc	tgtatccaat	aaacctctt	gcagttgcat	ccgatttggt
gtctcgtctg	tccttgggag	ggtctcctct	gagtgattga	ctacccgtca	gcgggggtct
ttcacatgca	gcatgtatca	aaattaattt	ggtttttttt	cttaagtatt	tacattaaat
ggccatagtc	tgctcgatcg	aggagctttt	tgcaaaaagcc	taggcctcca	aaaaagcctc
ttcactactt	ctggaatagc	tcagaggccg	agggcgccctc	ggcctctgca	taataaaaaa
aaattagtcg	gccatgcatg	gtaatagcga	tgactaatac	gtagatgtac	tgccaagtag
gaaagtccca	taaggctcatg	tactgggcat	aatgccaggc	gggcaattta	ccgtcattga
cgcaaatagc	gggcgtactt	ggcatatgat	acacttgatg	tactgccaag	tgggcagttt
accgtaaaaa	ctccacccat	tgacgtcaat	ggaaagtccc	tattggcggt	actatgggaa
catacgtcat	tattgacgct	aatgggcggg	ggtcggttgg	cggtcagcca	ggcgggccc
ttaccgtaag	ttatgtaacg	gactctagcc	catcgatggg	aattccggtc	tccctatagt
gagtcgtatt	aatttcgata	agccagacca	ttccttgcgg	cggcgggtgct	caacggcctc
aacctactac	tgggctgctt	cctaatgcag	gagtcgcata	agggagagcg	tcgaatggg
cactctcagt	acaactctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	acccgccaac
accgctgac	gcgcccctgac	gggcttgtct	gctcccggca	tccgcttaca	gacaagctgt
gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttcaccg	tcatacccca	aacgcgcgag
acgaaaaggg	ctcgtgatac	gcttattttt	ataggttaat	gtcatgataa	taatggtttc
ttagacgtca	gggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	accctatatt	gtttattttt
ctaaatacat	tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata
atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	gtcgccttta	ttcccttttt
tgccgcatct	tgcttctctg	tttttgcctc	cccagaaaacg	ctggtgaaaag	taaaagatgc
tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtggttga	catcgaactg	gatctcaaca	gcggtaagat
ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	agcactttta	aagttctgct
atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	caactcggtc	gccgcataca
ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtaca	gaaaagcatc	ttacggattg
catgacagta	agagaattat	gcagtgctgc	cataaccatg	agtgataaca	ctgcccga
cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	gcttttttgc	acaacatggg
ggatcatgta	actcgccttg	atcgttggga	accggagctg	aatgaagcca	taccaaagca

**Fig. 29 (3)**

```

cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg
cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca
gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc
atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc
agaccccgga gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgct gcgtaatctg
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga
gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg
cagggctcga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta
tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcgcccttt ttacggttcc tggccttttg
ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat
taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtgac
agtgagcgag gaagcgggaag agcgccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc
gattcattaa tgcagcaatt agtcagcaac catagtcccc cccctaactc cgccatccc
gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat gcatgggtgat gcggttttgg
cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc
attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt
aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtagggcgtg tacgggtgga ggtctatata
agcagagctc gtttagtgaa ccgcgccagt cctcc

```

## FIGURA 30

Fig. 30A. Secuencia de aminoácidos de CD14 humana (SEQ ID NO: 4)

```

          (señal)
1  MERASCLLLL LLPLVHVSAT TPEPCELDDE DFRVCVNFSE PQPDWSEAFQ CVSAVEVEIH
                                     motivo de unión de LPS
61  AGGLNLEPFL KRVDADADPR QYADTVKALR VRRITVGAAQ VPAQLLVGAL RVLAYSRLKE
121 LTLEDLKITG TMPPLPLEAT GLALSSLRLR NVSWATGRSW LAELQQWLKP GLKVLZIAQA
181 HSPAFSCEQV RAFFALTSLD LSDNPGLGER GLMAALCPHK FPAIQNLALR NTGMETPTGV
241 CAALAAAGVQ PHSIDLSHNS LRATVNPSAP RCMWSSALNS LNLSFAGLEQ VPKGLPAKLR
301 VLDLSCNRLN RAPQDELPE VDNLTLDGNP FLVPGTALPH EGSMNSGVVP ACARSTLSVG
361 VSGTLVLLQG ARGFA          375

```

Fig. 30B. Secuencia de aminoácidos de MD-2 humana (SEQ ID NO: 5)

```

          (señal)
1  MLPFLFFSTL FSSIFTEAQK QYWVCNSSDA SISYTYCDKM QYPISINVNP CIELKGSKGL
61  LHIFYIPRRD LKQLYFNLYI TVNTMNLPKR KEVICRGSDD DYSFCRALKG ETVNTTISFS
          <motivo de unión de LPS
121 FKGIKFSK GK YKVVEAISG SPEEMLFCLF FVILHQPNSN          160

```

**FIG. 31**

**A. Receptor Quimérico: motivo de CD14-CD28-FcR $\gamma$  (SEQ ID NO:6)**

Guía →

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 Sitio XbaI Región de codificación de CD14 →  
 GTC ATA ATG TCT AGA CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTA GGC GCC CTG  
 Q V P A Q L L V G A L  
 Sitio Bst EII Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
CGT GTG CTA GCG TAC TCC CGC CTC AAG GTC ACC GTG AAA GGG AAA CAC  
 R V L A Y S R L K V K  
 CTT TGT CCA AGT CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG  
 CTG GTG GTG GTT GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA  
 GTG GCC TTT ATT ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG  
 CAC AGT GAC TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC  
 BglII site →  
 AAG CAT TAC CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA  
TCT CAA GTG CGA AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT  
 GTT TAC ACG GGC CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG  
 final de FcR $\gamma$   
 AAG CAT GAG AAA CCA CCA CAG TAG  
 Q

**B. Receptor Bicistrónico, Quimérico:  
 Motivo CD14 -CD28-FcR $\gamma$ -IRES-GFP-Foxp3 (SEQ ID NO:7)**

Guía →

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 Sitio XbaI Región de codificación de CD14 →  
 GTC ATA ATG TCT AGA CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTA GGC GCC CTG  
 Q V P A O L L V G A L  
 Sitio Bst EII Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
CGT GTG CTA GCG TAC TCC CGC CTC AAG GTC ACC GTG AAA GGG AAA CAC  
 R V L A Y S R L K V K  
 CTT TGT CCA AGT CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG  
 CTG GTG GTG GTT GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA  
 GTG GCC TTT ATT ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG  
 CAC AGT GAC TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC  
 Sitio BglII →  
 AAG CAT TAC CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA  
 TCT CAA GTG CGA AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT  
 GTT TAC ACG GGC CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG  
 final de FcR $\gamma$  / IRES →  
 AAG CAT GAG AAA CCA CCA CAG TAG CTT TAG ACT CGA GCG GGA TCA ATT  
 CCG CCC CCC CCC TAA CGT TAC TGG CCG AAG CCG CTT GGA ATA AGG CCG  
 GTG TGC GTT TGT CTA TAT GTT ATT TTC CAC CAT ATT GCC GTC TTT TGG  
 CAA TGT GAG GGC CCG GAA ACC TGG CCC TGT CTT CTT GAC GAG CAT TCC  
 TAG GGG TCT TTC CCC TCT CGC CAA AGG AAT GCA AGG TCT GTT GAA TGT  
 CGT GAA GGA AGC AGT TCC TCT GGA AGC TTC TTG AAG ACA AAC AAC GTC  
 TGT AGC GAC CCT TTG CAG GCA GCG GAA CCC ACC TGG CGA CAG GTG  
 CCT CTG CGG CCA AAA GCC ACG TGT ATA AGA TAC ACC TGC AAA GGC GGC  
 ACA ACC CCA GTG CCA CGT TGT GAG TTG GAT AGT TGT GGA AAG AGT CAA  
 ATG GCT CTC CTC AAG CGT ATT CAA CAA GGG GCT GAA GGA TGC CCA GAA

Fig. 31 (2)

GGT ACC CCA TTG TAT GGG ATC TGA TCT GGG GCC TCG GTG CAC ATG CTT  
TAC ATG TGT TTA GTC GAG GTT AAA AAA ACG TCT AGG CCC CCC GAA CCA

Sitio Pae I

CGG GGA CGT GGT TTT CCT TTG AAA AAC ACG ATA ATA GCA TGC AGC GCT  
ACC GGT CGC CAC C

Inicio de la región de GFP/Foxp3 →

**ATG** GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG  
GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC  
GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC  
TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC  
CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG  
CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG  
CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG  
GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC  
ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGC CAC AAG CTG GAG TAC  
AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC  
GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC  
GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC  
CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG  
AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC  
GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TCC  
GGC CGG ACT CAG ATC TCG AGC TCA AGC TTC GAA TTC ATG CCC AAC CCC  
AGG CCT GGC AAG CCC TCG GCC CCT TCC TTG GCC CTT GGC CCA TCC CCA  
GGA GCC TCG CCC AGC TGG AGG GCT GCA CCC AAA GCC TCA GAC CTG CTG  
GGG GCC CGG GGC CCA GGG GGA ACC TTC CAG GGC CGA GAT CTT CGA GGC  
GGG GCC CAT GCC TCC TCT TCT TCC TTG AAC CCC ATG CCA CCA TCG CAG  
CTG CAG CTG CCC ACA CTG CCC CTA GTC ATG GTG GCA CCC TCC GGG GCA  
CGG CTG GGC CCC TTG CCC CAC TTA CAG GCA CTC CTC CAG GAC AGG CCA  
CAT TTC ATG CAC CAG CTC TCA ACG GTG GAT GCC CAC GCC CGG ACC CCT  
GTG CTG CAG GTG CAC CCC CTG GAG AGC CCA GCC ATG ATC AGC CTC ACA  
CCA CCC ACC ACC GCC ACT GGG GTC TTC TCC CTC AAG GCC CGG CCT GGC  
CTC CCA CCT GGG ATC AAC GTG GCC AGC CTG GAA TGG GTG TCC AGG GAG  
CCG GCA CTG CTC TGC ACC TTC CCA AAT CCC AGT GCA CCC AGG AAG GAC  
AGC ACC CTT TCG GCT GTG CCC CAG AGC TCC TAC CCA CTG CTG GCA AAT  
GGT GTC TGC AAG TGG CCC GGA TGT GAG AAG GTC TTC GAA GAG CCA GAG  
GAC TTC CTC AAG CAC TGC CAG GCG GAC CAT CTT CTG GAT GAG AAG GGC  
AGG GCA CAA TGT CTC CTC CAG AGA GAG ATG GTA CAG TCT CTG GAG CAG  
CAG CTG GTG CTG GAG AAG GAG AAG CTG AGT GCC ATG CAG GCC CAC CTG  
GCT GGG AAA ATG GCA CTG ACC AAG GCT TCA TCT GTG GCA TCA TCC GAC  
AAG GGC TCC TGC TGC ATC GTA GCT GCT GGC AGC CAA GGC CCT GTC GTC  
CCA GCC TGG TCT GGC CCC CGG GAG GCC CCT GAC AGC CTG TTT GCT GTC  
CGG AGG CAC CTG TGG GGT AGC CAT GGA AAC AGC ACA TTC CCA GAG TTC  
CTC CAC AAC ATG GAC TAC TTC AAG TTC CAC AAC ATG CGA CCC CCT TTC  
ACC TAC GCC ACG CTC ATC CGC TGG GCC ATC CTG GAG GCT CCA GAG AAG  
CAG CGG ACA CTC AAT GAG ATC TAC CAC TGG TTC ACA CGC ATG TTT GCC  
TTC TTC AGA AAC CAT CCT GCC ACC TGG AAG AAC GCC ATC CGC CAC AAC  
CTG AGT CTG CAC AAG TGC TTT GTG CGG GTG GAG AGC GAG AAG GGG GCT  
GTG TGG ACC GTG GAT GAG CTG GAG TTC CGC AAG AAA CGG AGC CAG AGG

← fin de Foxp3 . sitio BamHI

CCC AGC AGG TGT TCC AAC CCT ACA CCT GGC CCC **TGA** GGATCCgcgc

**Fig. 31 (3)**

Secuencia adicional del vector →

```

cgctcgcgct cgagagatcc ggattagtcc aatttgtaa agacaggata tcagtgggcc
aggctctagt ttgactcaa caatatacacc agctgaagcc tatagagtac gagccataga
taaaataaaa gattttatatt agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta
ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgccat ttgacaggca tggaaaaata cataactgag
aatagagaag ttcagatcaa ggtcaggaac agatggaaca gctgaatatg ggccaaacag
gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggcca agaacagatg gaacagctga
atatgggcca aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac
agatgggtccc cagatgcggt ccagccctca gcagtttcta gagaaccatc agatgtttcc
aggggtgcccc aaggacctga aatgaccctg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc
ttctcgcttc tgctcgcgcg cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccctc
cactcggggc gccagtcctc cgattgactg agtcgcccgg gtaccctgtgt atccaataaa
ccctcttgca gttgcatccg acttggtggc tcgctgttcc ttgggagggt ctctctgag
tgattgacta cccgtcagcg ggggtctttc acatgcagca tgtatcaaaa ttaatttggg
tttttttctt aagtatttac attaa

```

**Figura 32**

**A. Receptor Quimérico: Motivo de MD2- CD28-FcR $\gamma$  (SEQ ID NO:8)**

Guía →  
**ATG** GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 GTC ATA ATG TCT AGA Sitio XbaI Región de codificación de MD2 →  
 TTC TCC TTC AAG GGA ATA AAA TTT TCT AAG GGA  
 F S F K G I K F S K G

final de MD2 Sitio Bst EII Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
 AAA TAC AAA GGT CAC CTC GTG AAA GGG AAA CAC CTT TGT CCA AGT CCC  
 K Y K  
 CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG GTT GGT  
 GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT ATT ATT  
 TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC ATG  
 AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG CCC  
Sitio BgIII  
 TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG CGA AAG  
 GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG GGC CTG  
 AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG AAA CCA  
 CCA CAG **TAG**  
 final de FcR $\gamma$

**B. Receptor Bicistrónico, Quimérico: Motivo de MD2-CD28-FcR $\gamma$ -IRES-GFP-FOXP3 (SEQ ID NO:9)**

Guía →  
**ATG** GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 GTC ATA ATG TCT AGA Sitio XbaI Región de codificación de MD2 →  
 TTC TCC TTC AAG GGA ATA AAA TTT TCT AAG GGA  
 F S F K G I K F S K G

final de MD2 Sitio Bst EII Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
 AAA TAC AAA GGT CAC CTC GTG AAA GGG AAA CAC CTT TGT CCA AGT CCC  
 K Y K  
 CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG GTT GGT  
 GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT ATT ATT  
 TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC ATG  
 AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG CCC  
Sitio BgIII  
 TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG CGA AAG  
 GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG GGC CTG  
 AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG AAA CCA  
 final de FcR $\gamma$  / **IRES →**  
 CCA CAG **TAG** CTT TAG ACT CGA GCG GGA TCA ATT CCG CCC CCC CCC TAA  
 CGT TAC TGG CCG AAG CCG CTT GGA ATA AGG CCG GTG TGC GTT TGT CTA  
 TAT GTT ATT TTC CAC CAT ATT GCC GTC TTT TGG CAA TGT GAG GGC CCG  
 GAA ACC TGG CCC TGT CTT CTT GAC GAG CAT TCC TAG GGG TCT TTC CCC  
 TCT CGC CAA AGG AAT GCA AGG TCT GTT GAA TGT CGT GAA GGA AGC AGT  
 TCC TCT GGA AGC TTC TTG AAG ACA AAC AAC GTC TGT AGC GAC CCT TTG  
 CAG GCA GCG GAA CCC CCC ACC TGG CGA CAG GTG CCT CTG CGG CCA AAA  
 GCC ACG TGT ATA AGA TAC ACC TGC AAA GGC GGC ACA ACC CCA GTG CCA  
 CGT TGT GAG TTG GAT AGT TGT GGA AAG AGT CAA ATG GCT CTC CTC AAG  
 CGT ATT CAA CAA GGG GCT GAA GGA TGC CCA GAA GGT ACC CCA TTG TAT  
 GGG ATC TGA TCT GGG GCC TCG GTG CAC ATG CTT TAC ATG TGT TTA GTC  
 GAG GTT AAA AAA ACG TCT AGG CCC CCC GAA CCA CGG GGA CGT GGT TTT

Fig. 32(2)

																Sitio Pae I	
CCT	TTG	AAA	AAC	ACG	ATA	ATA	<u>GCA</u>	<u>TGC</u>	AGC	GCT	ACC	GGT	CGC	CAC	C		
Inicio de la región de GFP/Foxp3																	
<u>ATG</u>	GTG	AGC	AAG	GGC	GAG	GAG	CTG	TTC	ACC	GGG	GTG	GTG	CCC	ATC	CTG		
GTC	GAG	CTG	GAC	GGC	GAC	GTA	AAC	GGC	CAC	AAG	TTC	AGC	GTG	TCC	GGC		
GAG	GGC	GAG	GGC	GAT	GCC	ACC	TAC	GGC	AAG	CTG	ACC	CTG	AAG	TTC	ATC		
TGC	ACC	ACC	GGC	AAG	CTG	CCC	GTG	CCC	TGG	CCC	ACC	CTC	GTG	ACC	ACC		
CTG	ACC	TAC	GGC	GTG	CAG	TGC	TTC	AGC	CGC	TAC	CCC	GAC	CAC	ATG	AAG		
CAG	CAC	GAC	TTC	TTC	AAG	TCC	GCC	ATG	CCC	GAA	GGC	TAC	GTG	CAG	GAG		
CGC	ACC	ATC	TTC	TTC	AAG	GAC	GAC	GGC	AAC	TAC	AAG	ACC	CGC	GCC	GAG		
GTG	AAG	TTC	GAG	GGC	GAC	ACC	CTG	GTG	AAC	CGC	ATC	GAG	CTG	AAG	GGC		
ATC	GAC	TTC	AAG	GAG	GAC	GGC	AAC	ATC	CTG	GGG	CAC	AAG	CTG	GAG	TAC		
AAC	TAC	AAC	AGC	CAC	AAC	GTC	TAT	ATC	ATG	GCC	GAC	AAG	CAG	AAG	AAC		
GGC	ATC	AAG	GTG	AAC	TTC	AAG	ATC	CGC	CAC	AAC	ATC	GAG	GAC	GGC	AGC		
GTG	CAG	CTC	GCC	GAC	CAC	TAC	CAG	CAG	AAC	ACC	CCC	ATC	GGC	GAC	GGC		
CCC	GTG	CTG	CTG	CCC	GAC	AAC	CAC	TAC	CTG	AGC	ACC	CAG	TCC	GCC	CTG		
AGC	AAA	GAC	CCC	AAC	GAG	AAG	CGC	GAT	CAC	ATG	GTC	CTG	CTG	GAG	TTC		
GTG	ACC	GCC	GCC	GGG	ATC	ACT	CTC	GGC	ATG	GAC	GAG	CTG	TAC	AAG	TCC		
GGC	CGG	ACT	CAG	ATC	TCG	AGC	TCA	AGC	TTC	GAA	TTC	ATG	CCC	AAC	CCC		
AGG	CCT	GGC	AAG	CCC	TCG	GCC	CCT	TCC	TTG	GCC	CTT	GGC	CCA	TCC	CCA		
GGA	GCC	TCG	CCC	AGC	TGG	AGG	GCT	GCA	CCC	AAA	GCC	TCA	GAC	CTG	CTG		
GGG	GCC	CGG	GGC	CCA	GGG	GGA	ACC	TTC	CAG	GGC	CGA	GAT	CTT	CGA	GGC		
GGG	GCC	CAT	GCC	TCC	TCT	TCT	TCC	TTG	AAC	CCC	ATG	CCA	CCA	TCG	CAG		
CTG	CAG	CTG	CCC	ACA	CTG	CCC	CTA	GTC	ATG	GTG	GCA	CCC	TCC	GGG	GCA		
CGG	CTG	GGC	CCC	TTG	CCC	CAC	TTA	CAG	GCA	CTC	CTC	CAG	GAC	AGG	CCA		
CAT	TTC	ATG	CAC	CAG	CTC	TCA	ACG	GTG	GAT	GCC	CAC	GCC	CGG	ACC	CCT		
GTG	CTG	CAG	GTG	CAC	CCC	CTG	GAG	AGC	CCA	GCC	ATG	ATC	AGC	CTC	ACA		
CCA	CCC	ACC	ACC	GCC	ACT	GGG	GTC	TTC	TCC	CTC	AAG	GCC	CGG	CCT	GGC		
CTC	CCA	CCT	GGG	ATC	AAC	GTG	GCC	AGC	CTG	GAA	TGG	GTG	TCC	AGG	GAG		
CCG	GCA	CTG	CTC	TGC	ACC	TTC	CCA	AAT	CCC	AGT	GCA	CCC	AGG	AAG	GAC		
AGC	ACC	CTT	TCG	GCT	GTG	CCC	CAG	AGC	TCC	TAC	CCA	CTG	CTG	GCA	AAT		
GGT	GTC	TGC	AAG	TGG	CCC	GGA	TGT	GAG	AAG	GTC	TTC	GAA	GAG	CCA	GAG		
GAC	TTC	CTC	AAG	CAC	TGC	CAG	GCG	GAC	CAT	CTT	CTG	GAT	GAG	AAG	GGC		
AGG	GCA	CAA	TGT	CTC	CTC	CAG	AGA	GAG	ATG	GTA	CAG	TCT	CTG	GAG	CAG		
CAG	CTG	GTG	CTG	GAG	AAG	GAG	AAG	CTG	AGT	GCC	ATG	CAG	GCC	CAC	CTG		
GCT	GGG	AAA	ATG	GCA	CTG	ACC	AAG	GCT	TCA	TCT	GTG	GCA	TCA	TCC	GAC		
AAG	GGC	TCC	TGC	TGC	ATC	GTA	GCT	GCT	GGC	AGC	CAA	GGC	CCT	GTC	GTC		
CCA	GCC	TGG	TCT	GGC	CCC	CGG	GAG	GCC	CCT	GAC	AGC	CTG	TTT	GCT	GTC		
CGG	AGG	CAC	CTG	TGG	GGT	AGC	CAT	GGA	AAC	AGC	ACA	TTC	CCA	GAG	TTC		
CTC	CAC	AAC	ATG	GAC	TAC	TTC	AAG	TTC	CAC	AAC	ATG	CGA	CCC	CCT	TTC		
ACC	TAC	GCC	ACG	CTC	ATC	CGC	TGG	GCC	ATC	CTG	GAG	GCT	CCA	GAG	AAG		
CAG	CGG	ACA	CTC	AAT	GAG	ATC	TAC	CAC	TGG	TTC	ACA	CGC	ATG	TTT	GCC		
TTC	TTC	AGA	AAC	CAT	CCT	GCC	ACC	TGG	AAG	AAC	GCC	ATC	CGC	CAC	AAC		
CTG	AGT	CTG	CAC	AAG	TGC	TTT	GTG	CGG	GTG	GAG	AGC	GAG	AAG	GGG	GCT		
GTG	TGG	ACC	GTG	GAT	GAG	CTG	GAG	TTC	CGC	AAG	AAA	CGG	AGC	CAG	AGG		
← final de Foxp3    Sitio BamHI																	
CCC	AGC	AGG	TGT	TCC	AAC	CCT	ACA	CCT	GGC	CCC	<u>TGA</u>	<u>GGATCC</u>					

**FIG. 33**

**A. Receptor Quimérico: Motivo de MD2-Motivo de CD14-CD28-FcR $\gamma$  (SEQ ID NO:10)**

Guía →  
 ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 GTC ATA ATG TCT AGA TTC TCC TTC AAG GGA ATA AAA TTT TCT AAG GGA  
 F S F K G I K F S K G  
 final de MD2 ???-->  
 AAA TAC AAA GGG TCG ACT TCC GGT AGC GGC AAA TCC TCT GAA GGC AAA  
 K Y K G S T S G S G K S S E G K  
 Región de codificación de CD14 →  
 GGT CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTA GGC GCC CTG CGT GTG CTA GCG  
 G Q V P A Q L L V G A L R V L A  
 final de CD14 Sitio Bst EII Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
 TAC TCC CGC CTC AAG GTC ACC GTG AAA GGG AAA CAC CTT TGT CCA AGT  
 Y S R L K  
 CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG GTT  
 GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT ATT  
 ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC  
 ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG  
 Sitio BgIII  
 CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG CGA  
 AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG GGC  
 CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG AAA  
 final de FcR $\gamma$   
 CCA CCA CAG TAG

**B. Receptor Bicistrónico, Quimérico: Motivo de MD2-Motivo de CD14 -CD28-FcR $\gamma$ -IRES-GFP-Foxp3 (SEQ ID NO:11)**

Guía →  
 ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 GTC ATA ATG TCT AGA TTC TCC TTC AAG GGA ATA AAA TTT TCT AAG GGA  
 F S F K G I K F S K G  
 final de MD2 Enlazador Flexible->  
 AAA TAC AAA GGG TCG ACT TCC GGT AGC GGC AAA TCC TCT GAA GGC AAA  
 K Y K G S T S G S G K S S E G K  
 Región de codificación de CD14 →  
 GGT CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTA GGC GCC CTG CGT GTG CTA GCG  
 G Q V P A Q L L V G A L R V L A  
 final de CD14 Sitio Bst EII Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
 TAC TCC CGC CTC AAG GTC ACC GTG AAA GGG AAA CAC CTT TGT CCA AGT  
 Y S R L K  
 CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG GTT  
 GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT ATT  
 ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC  
 ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG  
 Sitio BgIII  
 CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG CGA  
 AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG GGC  
 CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG AAA

Fig. 33(2)

final de FcRγ / IRES →  
 CCA CCA CAG TAG CTT TAG ACT CGA GCG GGA TCA ATT CCG CCC CCC CCC  
 TAA CGT TAC TGG CCG AAG CCG CTT GGA ATA AGG CCG GTG TGC GTT TGT  
 CTA TAT GTT ATT TTC CAC CAT ATT GCC GTC TTT TGG CAA TGT GAG GGC  
 CCG GAA ACC TGG CCC TGT CTT CTT GAC GAG CAT TCC TAG GGG TCT TTC  
 CCC TCT CGC CAA AGG AAT GCA AGG TCT GTT GAA TGT CGT GAA GGA AGC  
 AGT TCC TCT GGA AGC TTC TTG AAG ACA AAC AAC GTC TGT AGC GAC CCT  
 TTG CAG GCA GCG GAA CCC CCC ACC TGG CGA CAG GTG CCT CTG CGG CCA  
 AAA GCC ACG TGT ATA AGA TAC ACC TGC AAA GGC GGC ACA ACC CCA GTG  
 CCA CGT TGT GAG TTG GAT AGT TGT GGA AAG AGT CAA ATG GCT CTC CTC  
 AAG CGT ATT CAA CAA GGG GCT GAA GGA TGC CCA GAA GGT ACC CCA TTG  
 TAT GGG ATC TGA TCT GGG GCC TCG GTG CAC ATG CTT TAC ATG TGT TTA  
 GTC GAG GTT AAA AAA ACG TCT AGG CCC CCC GAA CCA CGG GGA CGT GGT  
 TTT CCT TTG AAA AAC ACG ATA ATA GCA TGC AGC GCT ACC GGT CGC CAC C  
 Inicio de la región de GFP/Foxp3  
 ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG  
 GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC  
 GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC  
 TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC  
 CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG  
 CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG  
 CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG  
 GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC  
 ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC  
 AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC  
 GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC  
 GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC  
 CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG  
 AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC  
 GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TCC  
 GGC CGG ACT CAG ATC TCG AGC TCA AGC TTC GAA TTC ATG CCC AAC CCC  
 AGG CCT GGC AAG CCC TCG GCC CCT TCC TTG GCC CTT GGC CCA TCC CCA  
 GGA GCC TCG CCC AGC TGG AGG GCT GCA CCC AAA GCC TCA GAC CTG CTG  
 GGG GCC CGG GGC CCA GGG GGA ACC TTC CAG GGC CGA GAT CTT CGA GGC  
 GGG GCC CAT GCC TCC TCT TCT TCC TTG AAC CCC ATG CCA CCA TCG CAG  
 CTG CAG CTG CCC ACA CTG CCC CTA GTC ATG GTG GCA CCC TCC GGG GCA  
 CGG CTG GGC CCC TTG CCC CAC TTA CAG GCA CTC CTC CAG GAC AGG CCA  
 CAT TTC ATG CAC CAG CTC TCA ACG GTG GAT GCC CAC GCC CGG ACC CCT  
 GTG CTG CAG GTG CAC CCC CTG GAG AGC CCA GCC ATG ATC AGC CTC ACA  
 CCA CCC ACC ACC GCC ACT GGG GTC TTC TCC CTC AAG GCC CGG CCT GGC  
 CTC CCA CCT GGG ATC AAC GTG GCC AGC CTG GAA TGG GTG TCC AGG GAG  
 CCG GCA CTG CTC TGC ACC TTC CCA AAT CCC AGT GCA CCC AGG AAG GAC  
 AGC ACC CTT TCG GCT GTG CCC CAG AGC TCC TAC CCA CTG CTG GCA AAT  
 GGT GTC TGC AAG TGG CCC GGA TGT GAG AAG GTC TTC GAA GAG CCA GAG  
 GAC TTC CTC AAG CAC TGC CAG GCG GAC CAT CTT CTG GAT GAG AAG GGC  
 AGG GCA CAA TGT CTC CTC CAG AGA GAG ATG GTA CAG TCT CTG GAG CAG  
 CAG CTG GTG CTG GAG AAG GAG AAG CTG AGT GCC ATG CAG GCC CAC CTG  
 GCT GGG AAA ATG GCA CTG ACC AAG GCT TCA TCT GTG GCA TCA TCC GAC  
 AAG GGC TCC TGC TGC ATC GTA GCT GCT GGC AGC CAA GGC CCT GTC GTC  
 CCA GCC TGG TCT GGC CCC CGG GAG GCC CCT GAC AGC CTG TTT GCT GTC  
 CGG AGG CAC CTG TGG GGT AGC CAT GGA AAC AGC ACA TTC CCA GAG TTC  
 CTC CAC AAC ATG GAC TAC TTC AAG TTC CAC AAC ATG CGA CCC CCT TTC  
 ACC TAC GCC ACG CTC ATC CGC TGG GCC ATC CTG GAG GCT CCA GAG AAG  
 CAG CGG ACA CTC AAT GAG ATC TAC CAC TGG TTC ACA CGC ATG TTT GCC  
 TTC TTC AGA AAC CAT CCT GCC ACC TGG AAG AAC GCC ATC CGC CAC AAC  
 CTG AGT CTG CAC AAG TGC TTT GTG CGG GTG GAG AGC GAG AAG GGG GCT  
 GTG TGG ACC GTG GAT GAG CTG GAG TTC CGC AAG AAA CGG AGC CAG AGG  
 ← final de Foxp3 Sitio BamHI  
 CCC AGC AGG TGT TCC AAC CCT ACA CCT GGC CCC TGA GGATCC

**FIG. 34**

Receptor Quimérico: **MD2-CD28-FcRy** (SEQ ID NO:13)

Guía →

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA

GTC ATA ATG TCT AGA ATG TTA CCA TTT CTG TTT TTT TCC ACC CTG TTT  
*M L P F L F F S T L F*

TCT TCC ATA TTT ACT GAA GCT CAG AAG CAG TAT TGG GTC TGC AAC TCA  
*S S I F T E A Q K Q Y W V C N S*

TCC GAT GCA AGT ATT TCA TAC ACC TAC TGT GAT AAA ATG CAA TAC CCA  
*S D A S I S Y T Y C D K M Q Y P*

ATT TCA ATT AAT GTT AAC CCC TGT ATA GAA TTG AAA GGA TCC AAA GGA  
*I S I N V N P C I E L K G S K G*

TTA TTG CAC ATT TTC TAC ATT CCA AGG AGA GAT TTA AAG CAA TTA TAT  
*L L H I F Y I P R R D L K Q L Y*

TTC AAT CTC TAT ATA ACT GTC AAC ACC ATG AAT CTT CCA AAG CGC AAA  
*F N L Y I T V N T M N L P K R K*

GAA GTT ATT TGC CGA GGA TCT GAT GAC GAT TAC TCT TTT TGC AGA GCT  
*E V I C R G S D D D Y S F C R A*

CTG AAG GGA GAG ACT GTG AAT ACA ACA ATA TCA TTC TCC TTC AAG GGA  
*L K G E T V N T T I S F S F K G*

ATA AAA TTT TCT AAG GGA AAA TAC AAA TGT GTT GTT GAA GCT ATT TCT  
I K F S K G K Y K V V E A I S G

GGG AGC CCA GAA GAA ATG CTC TTT TGC TTG GAG TTT GTC ATC CTA CAC  
*S P E E M L F C L E F V I L H Q*

CAA CCT AAT TCA AAT GGT CAC CTC GTG AAA GGG AAA CAC CTT TGT CCA  
*P N S N*

AGT CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG  
 GTT GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT  
 ATT ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC  
 TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC

CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG  
 CGA AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG  
 GGC CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG

← final de FcRy

AAA CCA CCA CAG TAG

**FIG. 35**

Receptor Bicistrónico Quimérico: **MD2 -CD28-FcR $\gamma$ -IRES-GFP-Foxp3** (SEQ ID NO:14)

Guía →

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA  
 GTC ATA ATG TCT AGA Región de codificación de MD2 →  
 TCT TCC ATA TTT ACT GAA GCT CAG AAG CAG TAT TGG GTC TGC AAC TCA  
 S S I F T E A Q K Q Y W V C N S  
 TCC GAT GCA AGT ATT TCA TAC ACC TAC TGT GAT AAA ATG CAA TAC CCA  
 S D A S I S Y T Y C D K M Q Y P  
 ATT TCA ATT AAT GTT AAC CCC TGT ATA GAA TTG AAA GGA TCC AAA GGA  
 I S I N V N P C I E L K G S K G  
 TTA TTG CAC ATT TTC TAC ATT CCA AGG AGA GAT TTA AAG CAA TTA TAT  
 L L H I F Y I P R R D L K Q L Y  
 TTC AAT CTC TAT ATA ACT GTC AAC ACC ATG AAT CTT CCA AAG CGC AAA  
 F N L Y I T V N T M N L P K R K  
 GAA GTT ATT TGC CGA GGA TCT GAT GAC GAT TAC TCT TTT TGC AGA GCT  
 E V I C R G S D D D Y S F C R A  
 CTG AAG GGA GAG ACT GTG AAT ACA ACA ATA TCA TTC TCC TTC AAG GGA  
 L K G E T V N T T I S F S F K G  
 ATA AAA TTT TCT AAG GGA AAA TAC AAA TGT GTT GTT GAA GCT ATT TCT  
 I K F S K G K Y K V V E A I S G  
 GGG AGC CCA GAA GAA ATG CTC TTT TGC TTG GAG TTT GTC ATC CTA CAC  
 S P E E M L F C L E F V I L H Q  
 CAA CCT AAT TCA AAT GGT CAC CTC Región de codificación de CD28/FcR $\gamma$  →  
 P N S N  
 AGT CCC CTA TTT CCC GGA CCT TCT AAG CCC TTT TGG GTG CTG GTG GTG  
 GTT GGT GGA GTC CTG GCT TGC TAT AGC TTG CTA GTA ACA GTG GCC TTT  
 ATT ATT TTC TGG GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC  
 TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC  
 CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC GAC TTC GCA GCC TAT AGA TCT CAA GTG  
 CGA AAG GCA GCT ATA ACC AGC TAT GAG AAA TCA GAT GGT GTT TAC ACG  
 GGC CTG AGC ACC AGG AAC CAG GAG ACT TAC GAG ACT CTG AAG CAT GAG  
 ← final de FcR $\gamma$  / **IRES** →  
 AAA CCA CCA CAG TAG CTT TAG ACT CGA GCG GGA TCA ATT CCG CCC CCC  
 CCC TAA CGT TAC TGG CCG AAG CCG CTT GGA ATA AGG CCG GTG TGC GTT  
 TGT CTA TAT GTT ATT TTC CAC CAT ATT GCC GTC TTT TGG CAA TGT GAG  
 GGC CCG GAA ACC TGG CCC TGT CTT CTT GAC GAG CAT TCC TAG GGG TCT  
 TTC CCC TCT CGC CAA AGG AAT GCA AGG TCT GTT GAA TGT CGT GAA GGA  
 AGC AGT TCC TCT GGA AGC TTC TTG AAG ACA AAC AAC GTC TGT AGC GAC  
 CCT TTG CAG GCA GCG GAA CCC CCC ACC TGG CGA CAG GTG CCT CTG CGG  
 CCA AAA GCC ACG TGT ATA AGA TAC ACC TGC AAA GGC GGC ACA ACC CCA  
 GTG CCA CGT TGT GAG TTG GAT AGT TGT GGA AAG AGT CAA ATG GCT CTC  
 CTC AAG CGT ATT CAA CAA GGG GCT GAA GGA TGC CCA GAA GGT ACC CCA  
 TTG TAT GGG ATC TGA TCT GGG GCC TCG GTG CAC ATG CTT TAC ATG TGT  
 TTA GTC GAG GTT AAA AAA ACG TCT AGG CCC CCC GAA CCA CGG GGA CGT  
 GGT TTT CCT TTG AAA AAC ACG ATA ATA GCA TGC AGC GCT ACC GGT CGC  
 Inicio de la región de GFP/Foxp3  
 CAC C ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC  
 ATC CTG ATG GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG  
 TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG  
 TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG

Fig. 35 (2)

ACC ACC CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC  
 ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC  
 CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC  
 GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG  
 AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG  
 GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG  
 AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC  
 GGC AGC GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC  
 GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC  
 GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG  
 GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC  
 AAG TCC GGC CGG ACT CAG ATC TCG AGC TCA AGC TTC GAA TTC ATG CCC  
 AAC CCC AGG CCT GGC AAG CCC TCG GCC CCT TCC TTG GCC CTT GGC CCA  
 TCC CCA GGA GCC TCG CCC AGC TGG AGG GCT GCA CCC AAA GCC TCA GAC  
 CTG CTG GGG GCC CGG GGC CCA GGG GGA ACC TTC CAG GGC CGA GAT CTT  
 CGA GGC GGG GCC CAT GCC TCC TCT TCT TCC TTG AAC CCC ATG CCA CCA  
 TCG CAG CTG CAG CTG CCC ACA CTG CCC CTA GTC ATG GTG GCA CCC TCC  
 GGG GCA CGG CTG GGC CCC TTG CCC CAC TTA CAG GCA CTC CTC CAG GAC  
 AGG CCA CAT TTC ATG CAC CAG CTC TCA ACG GTG GAT GCC CAC GCC CGG  
 ACC CCT GTG CTG CAG GTG CAC CCC CTG GAG AGC CCA GCC ATG ATC AGC  
 CTC ACA CCA CCC ACC ACC GCC ACT GGG GTC TTC TCC CTC AAG GCC CGG  
 CCT GGC CTC CCA CCT GGG ATC AAC GTG GCC AGC CTG GAA TGG GTG TCC  
 AGG GAG CCG GCA CTG CTC TGC ACC TTC CCA AAT CCC AGT GCA CCC AGG  
 AAG GAC AGC ACC CTT TCG GCT GTG CCC CAG AGC TCC TAC CCA CTG CTG  
 GCA AAT GGT GTC TGC AAG TGG CCC GGA TGT GAG AAG GTC TTC GAA GAG  
 CCA GAG GAC TTC CTC AAG CAC TGC CAG GCG GAC CAT CTT CTG GAT GAG  
 AAG GGC AGG GCA CAA TGT CTC CTC CAG AGA GAG ATG GTA CAG TCT CTG  
 GAG CAG CAG CTG GTG CTG GAG AAG GAG AAG CTG AGT GCC ATG CAG GCC  
 CAC CTG GCT GGG AAA ATG GCA CTG ACC AAG GCT TCA TCT GTG GCA TCA  
 TCC GAC AAG GGC TCC TGC ATC GTA GCT GCT GGC AGC CAA GGC CCT  
 GTC GTC CCA GCC TGG TCT GGC CCC CGG GAG GCC CCT GAC AGC CTG TTT  
 GCT GTC CGG AGG CAC CTG TGG GGT AGC CAT GGA AAC AGC ACA TTC CCA  
 GAG TTC CTC CAC AAC ATG GAC TAC TTC AAG TTC CAC AAC ATG CGA CCC  
 CCT TTC ACC TAC GCC ACG CTC ATC CGC TGG GCC ATC CTG GAG GCT CCA  
 GAG AAG CAG CGG ACA CTC AAT GAG ATC TAC CAC TGG TTC ACA CGC ATG  
 TTT GCC TTC TTC AGA AAC CAT CCT GCC ACC TGG AAG AAC GCC ATC CGC  
 CAC AAC CTG AGT CTG CAC AAG TGC TTT GTG CGG GTG GAG AGC GAG AAG  
 GGG GCT GTG TGG ACC GTG GAT GAG CTG GAG TTC CGC AAG AAA CGG AGC  
 ← final de Foxp3 Sitio BamHI  
 CAG AGG CCC AGC AGG TGT TCC AAC CCT ACA CCT GGC CCC TGA GGATCCgcgc

Secuencia del vector →

cgctcgcgac tcgagagatc cggattagtc caatttggtta aagacaggat atcagtggtc  
 caggctctag ttttgactca acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag  
 ataaaataaa agattttatt tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt  
 aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaggc atggaaaaat acataactga  
 gaatagagaa gttcagatca aggtcaggaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca  
 ggatatctgt ggtaagcagt tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg  
 aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggtca gggccaagaa  
 cagatggtcc ccagatgagg tccagccctc agcagtttct agagaaccat cagatgttct  
 caggggtgccc caaggacctg aaatgacctt gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg  
 ctctcgcctt ctgttcgctc gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc  
 tcactcgggg cgccagtcct ccgattgact gagtcgccc ggtaccctg tatccaataa  
 accctcttgc agttgcatcc gacttggtt ctcgctgttc cttgggaggg tctcctctga  
 gtgattgact acccgtcagc ggggtcttt cacatgcagc atgtatcaaa attaatttga  
 ttttttttct taagtattta cattaa