



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 282 750**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04007345 .4**
⑧6 Fecha de presentación : **26.03.2004**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1593386**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

⑤4 Título: **Uso de galectina-2.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

⑦3 Titular/es: **Charité - Universitätsmedizin Berlin**
Schumannstrasse 20/21
10117 Berlin, DE

⑦2 Inventor/es: **Dignass, Axel;**
Rosewicz, Stefan y
Sturm, Andreas

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Uso de galectina-2.

La presente invención se refiere a los usos de galectina-2.

La función principal del sistema inmunitario de los animales superiores es la distinción entre entidades extrañas, tales como agentes infecciosos, bacterias, virus, etc., de los propios componentes del cuerpo. El sistema inmunitario es un sistema dinámico que muestra un comportamiento plástico, lo que significa que el sistema inmunitario en un sistema que aprende a lo largo de toda la duración de la vida de un individuo. Durante el desarrollo del cuerpo, normalmente el sistema inmunitario adquiere la capacidad de tolerar los componentes propios mientras que desarrolla y mantiene la capacidad de reconocer los componentes extraños. La adquisición de la autotolerancia se produce por delección clonal de las células T autorreactivas mediante apoptosis en la glándula del timo durante el periodo perinatal, y mediante la inhibición funcional de las células T y B autorreactivas en los estadios más tardíos del desarrollo. En la actualidad no está completamente claro cómo se mantiene el sistema de autotolerancia o cómo, bajo circunstancias específicas, deja de funcionar. A veces, el organismo pierde su capacidad de autotolerancia y el sistema inmunitario del organismo deja de discriminar entre antígenos propios y ajenos, como resultado de lo cual se inicia una respuesta autoinmunitaria que se manifiesta en la activación y expansión clonal de linfocitos autorreactivos y la producción de autoanticuerpos frente a antígenos autólogos de los tejidos normales del cuerpo. Existen distintos modelos animales para diversas enfermedades autoinmunitarias, pero a partir de ellos no está claro qué produce la aparición de una respuesta autoinmunitaria ni, en muchos casos, cuál será el curso posterior de los acontecimientos tras una respuesta autoinmunitaria inicial. Muchas de las enfermedades autoinmunitarias son raras. De origen multifactorial, las enfermedades autoinmunitarias se producen con mayor frecuencia en individuos con una predisposición genética. Esto puede estar provocado por debilidad específica de los controles reguladores inmunitarios, algunos factores ambientales, etc., cuya combinación puede conducir por último a que el sistema inmunitario inicie un ataque frente a componentes propios.

Las enfermedades autoinmunitarias pueden clasificarse en preferiblemente enfermedades sistémicas y preferiblemente enfermedades específicas de órgano. En las enfermedades autoinmunitarias sistémicas se produce lesión tisular e inflamación en múltiples sitios en órganos sin relación con su composición antigénica. En muchos casos, tales enfermedades autoinmunitarias sistémicas se inician mediante la deposición de los complejos inmunitarios autólogos circulantes que se forman mediante respuestas de autoanticuerpos a antígenos celulares solubles ubicuos.

Ejemplos típicos de estas enfermedades autoinmunitarias sistémicas son lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, polimiositis, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante. Las enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano, por otro lado, pueden clasificarse además según el órgano al que afectan. Las enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso incluyen esclerosis múltiple, miastenia grave, neuropatías autoinmunitarias, tales como Guillain-Barré. Las enfermedades autoinmunitarias que afectan al sistema gastrointestinal son enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, enfermedad celíaca, enteropatía autoinmunitaria, y hepatitis autoinmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias que afectan a las glándulas endocrinas son diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto y ovaritis autoinmunitaria.

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad autoinmunitaria que puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano. Sin embargo, normalmente se produce en la parte inferior del intestino delgado. Se manifiesta como una inflamación grave que se extiende profundamente en el revestimiento del intestino. Los síntomas de la enfermedad de Crohn son dolor abdominal, diarrea, hemorragia rectal, pérdida de peso y fiebre. La etiología de la enfermedad de Crohn aún no está clara. El diagnóstico se realiza normalmente mediante la presentación de los síntomas clínicos típicos, y una combinación de pruebas sanguíneas, colonoscopia incluyendo biopsia, exploración con rayos X con agentes de contraste, formación de imágenes por resonancia magnética o TAC. El tratamiento de la enfermedad de Crohn incluye agentes antiinflamatorios tales como mesalazina, sulfasalazina, corticosteroides e inmunosupresores. Estos últimos incluyen 6-mercaptopurina y azatioprina. Recientemente se ha autorizado un anticuerpo monoclonal (Acm), el infliximab, para el tratamiento de la enfermedad de Crohn moderada a grave o fistulizante que no responde a los tratamientos convencionales, tales como mesalazina, corticosteroides y/o agentes inmunosupresores y antibióticos en la EC fistulizante. El infliximab, que es el primer agente aprobado específicamente para la AR y la enfermedad de Crohn es un anticuerpo quimérico frente al factor de necrosis tumoral α (anti-TNF α). El TNF α es una citoquina producida por el sistema inmunitario y desempeña un papel clave en la patogenia de la enfermedad de Crohn. El tratamiento de pacientes con EC induce apoptosis de las células T de la lámina propia y de los macrófagos ubicados en la mucosa intestinal o en las articulaciones. Sin embargo, durante el tratamiento con infliximab, se generan con frecuencia otros anticuerpos que atenúan la acción del anticuerpo anti-TNF α (New England Journal of Medicine 2003; 348:601-608) y provoca intolerancia (hipersensibilidad de tipo I). Además, el infliximab parece inhibir el sistema inmunitario en general, exponiendo así al organismo a superinfecciones secundarias y provocando, por tanto, septicemia, tuberculosis y muerte.

También se cree que la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria. La artritis reumatoide provoca inflamación y deformidad de las articulaciones. También pueden desarrollarse otros problemas en todo el cuerpo, incluyendo inflamación de los vasos sanguíneos, desarrollo de nódulos artríticos reumatoides y osteoporosis. La artritis reumatoide se considera una enfermedad autoinmunitaria adquirida y en la que los factores genéticos parecen desempeñar un papel. La presencia del anticuerpo HLA-DR4 en el 70 por ciento de los pacientes con AR apoya la predisposición genética a la enfermedad. Los pacientes que tienen artritis reumatoide, en muchos casos, también

muestran factores reumatoides (FR), que son anticuerpos frente a IgG y que están presentes en el 60-80 por ciento de los adultos con la enfermedad. Los títulos altos de factores reumatoides normalmente se asocian con una enfermedad articular más grave y activa, una implicación sistémica mayor y un pronóstico de remisión peor. La artritis reumatoide, así como otras enfermedades autoinmunitarias, incluye alteraciones inflamatorias e inmunológicas extendidas de tejido conjuntivo. Ya que las enfermedades autoinmunitarias comparten muchos hallazgos clínicos, hacer un diagnóstico diferencial es difícil frecuentemente. La prevalencia de la enfermedad es del 1-2 por ciento de la población general y se encuentra en todo el mundo. Parece haber cierta predisposición en las mujeres que muestran una razón 3:1 frente a los hombres con respecto a la producción y la aparición de la enfermedad. La enfermedad normalmente se manifiesta en adultos de edades comprendidas entre 40 y 60 años. La etiología de la artritis reumatoide sigue sin conocerse. Se han estudiado ampliamente factores metabólicos y nutricionales, el sistema endocrino, datos geográficos, psicológicos y ocupacionales sin hallazgos concluyentes. Hay varias teorías etiológicas sobre la artritis reumatoide, algunas de las cuales postulan un antígeno desconocido que inicia la respuesta autoinmunitaria. Otras sospechan un origen infeccioso del proceso de la enfermedad, que ha incluido diversas bacterias y virus pero sin pruebas de los acontecimientos desencadenantes. De nuevo, la artritis reumatoide se diagnostica usando criterios convencionales (ARA) (Asociación Americana de Reumatismo - véase también como ejemplo <http://www.shim.org/rheumatology/1987ra.html>) incluyendo varias pruebas, que incluyen análisis de sangre, en particular pruebas de velocidad de sedimentación de eritrocitos, pruebas de anemia y pruebas de factor reumatoide. Además, ya que la artritis reumatoide afecta en particular a las articulaciones sinoviales, se examina el líquido sinovial. Cuando hay artritis reumatoide, el líquido tiene un contenido en proteínas aumentado y un contenido en glucosa disminuido o normal. Además, contiene un número de glóbulos blancos superior al normal. Normalmente el diagnóstico de la artritis reumatoide es una combinación de resultados positivos de diversas de las pruebas mencionadas anteriormente. La artritis reumatoide puede tratarse de varias maneras, aunque no hay cura hasta la fecha. La artritis reumatoide puede tratarse con agentes antiinflamatorios no esteroideos, con fármacos antirreumáticos, incluyendo penicilamina e inhibidores de la ciclooxygenasa-2. Además, como la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide también se está tratando con anticuerpos dirigidos frente al TNF α , tales como infliximab, etanercept y adalimumab. Adicionalmente, muy recientemente, también se ha autorizado la comercialización de un antagonista del receptor de IL-1, el anakinra, para el tratamiento de la AR. Según los estudios preliminares, se sugiere que el anakinra se administre en combinación con metotrexato que, de nuevo, puede tener efectos secundarios graves. Sin embargo, todos los agentes mencionados anteriormente muestran efectos secundarios más o menos graves.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de tratamientos alternativos y eficaces para las enfermedades autoinmunitarias. En particular, existe una necesidad continua en la técnica de un tratamiento eficaz para las enfermedades inflamatorias del intestino y la artritis reumatoide.

Las galectinas son miembros de una familia altamente conservada de lectinas que se unen al β -galactósido que aparecen cada vez más como reguladores significativos de la homeostasia de las células inmunitarias (1, 2). Las propiedades biológicas de las galectinas de mamíferos incluyen la regulación de la proliferación celular, la inflamación, la adhesión celular y la muerte celular (3-5). De manera interesante, a pesar de la amplia homología de secuencia y una especificidad de hidratos de carbono similar, diversos miembros de esta familia de proteínas se comportan como amplificadores de la cascada inflamatoria, mientras que otros activan las señales homeostáticas para prevenir las respuestas inmunitarias (6). Así, lo que se aplica a uno de los miembros de la familia de galectina, no se aplica también necesariamente a otros miembros.

La galectina-2 se descubrió durante la clonación de la galectina-1 y tiene una identidad de secuencia del 43% a la galectina-1 humana, lo que revela la mayor homología con la galectina-1 entre todas las demás galectinas examinadas (7). La galectina-2 es un dímero no covalente con subunidades de aproximadamente 14 kDa (7). La expresión de la galectina-2 parece estar limitada al tracto gastrointestinal (GI) (8, 9). También se sabe que las células epiteliales intestinales que expresan galectina-2 normalmente no expresan la galectina-1 y que la galectina-2 no se expresa en niveles elevados en ratones mutantes sin galectina-1 (10). Mientras que se han estudiado más ampliamente las propiedades de la galectina-1, la función de la galectina-2 no se ha estudiado tanto y por tanto, sigue sin aclararse hasta ahora.

La capacidad de las células para adherirse a los constituyentes de la matriz extracelular (MEC) es un proceso fundamental implicado no sólo en el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis, la invasión tumoral y la inflamación (14, 15). La adhesión de las células T a la MEC está mediada por integrinas, una gran familia de receptores heterodiméricos que está constituida por ocho subunidades β distintas y 17 cadenas α que controlan la especificidad de ligando de la matriz (16, 17). Las galectinas modulan la adhesión celular mediante distintos mecanismos incluyendo la unión de hidratos de carbono ligandos en las células cercanas, el entrecruzamiento de galectinas que se asocian a la superficie celular, la unión directa a compuestos de la MEC, las interacciones proteína-hidrato de carbono o la interacción con las integrinas (14, 18). Las múltiples opciones de las galectinas para influir en la adhesión célula-célula y célula-MEC puede explicar por qué las galectinas tienen efectos pro y antiadhesivos en distintos tipos celulares y con distintos constituyentes de la MEC (6). Las células T sanguíneas circulantes sólo expresan cantidades moderadas de integrinas $\beta 1$ en su superficie celular, mientras que estas células en reposo se adhieren escasamente a la MEC (17). La activación de las células T sanguíneas estimula un aumento rápido de la adhesión mediada por $\beta 1$ asociada a la afinidad y avidez potenciadas por integrinas (17), necesarias para la migración de las células inmunitarias y su ubicación en los sitios efectores en el sistema inmunitario humano integrado en la mucosa (19). La galectina-1 se une a la integrina $\beta 1$ y aumenta de manera transitoria su disponibilidad en la superficie celular mientras que la galectina-3 media la endocitosis de, y por tanto, regula por disminución las integrinas $\beta 1$ en células de carcinoma de mama (18, 20).

ES 2 282 750 T3

La solicitud de patente de los EE. UU. n° 2004/0023855 A1 describe partículas para uso en sistemas biológicos para administrar agentes biológicamente activos a células o tejidos. La solicitud describe las galectinas, entre otros como componentes bioactivos. En general se describe que las galectinas desempeñan un papel en procesos inflamatorios, inmunomoduladores y tumorigénicos y además describe diversas galectinas que tienen un intervalo muy variado de actividades biológicas. No se describe ninguna actividad de la galectina-2.

El documento JP20010129200 describe la utilidad de la galectina-1, 3 y 9 como componentes eficaces en la prevención y el tratamiento de la nefritis. No se comenta la galectina 2 ni se describe actividad alguna de la misma.

Las células inmunitarias deben responder a los antígenos de manera selectiva y equilibrada que les permita efectuar una respuesta eficaz mediante el progreso en el ciclo celular, la expansión y finalmente, experimentar apoptosis una vez que se ha eliminado el antígeno (11, 12). Mientras que esta característica está normalmente fuertemente equilibrada mediante promotores e inhibidores del ciclo celular y la apoptosis (13), muchas enfermedades se basan en o bien un ciclo celular descontrolado o bien una apoptosis alterada, lo que conduce a una proliferación celular no restringida y por tanto al cáncer o a trastornos autoinmunitarios tales como artritis reumatoide o enfermedades inflamatorias del intestino.

Estas enfermedades son incurables hasta la fecha, y los tratamientos existentes o bien no son muy eficaces o bien muestran efectos secundarios graves.

Por consiguiente, era un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento eficaz de las enfermedades con un sistema inmunitario que funciona mal. Además, era un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento que muestre menores efectos secundarios que los procedimientos disponibles en la actualidad. También era un objeto proporcionar un tratamiento eficaz de las enfermedades con una apoptosis alterada de células T.

Todos estos objetos se resuelven mediante el uso de la galectina-2 o de un ácido nucleico que codifica para galectina-2 o de su hebra complementaria, o un ácido nucleico que hibrida con tal ácido nucleico codificante o su hebra complementaria, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad con apoptosis alterada de células T.

En una realización, dicha apoptosis alterada, en particular dicha apoptosis alterada de células T está implicada en o asociada con la patogenia de dicha enfermedad.

Dicha enfermedad con apoptosis alterada de células T se selecciona del grupo que comprende enfermedades autoinmunitarias y enfermedades de células T tumorales. Preferiblemente dichas enfermedades autoinmunitarias se seleccionan del grupo que comprende artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso, esclerodermia, hepatitis autoinmunitaria y nefritis autoinmunitaria, en las que, más preferiblemente, dichas enfermedades inflamatorias del intestino son enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa o colitis indeterminada.

Preferiblemente, dicha enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn.

En otra realización, dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

En una realización, dichas enfermedades de células T tumorales se seleccionan del grupo que comprende linfomas T no-Hodgkin periféricos y linfoblásticos/nodales y extranodales.

Preferiblemente dicha galectina-2 es galectina-2 humana o de rata.

En una realización, dicha galectina-2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En una realización, dicha galectina-2 se administra en combinación con un agente que inhibe la proliferación de las células T y/o un agente que induce la apoptosis de las células T.

Preferiblemente, dicho agente que inhibe la proliferación de las células T se selecciona del grupo que comprende esteroides, macrólidos, tales como ciclosporina y rapamicina, tacrolimus, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato y ciclofosfamida.

Preferiblemente, dicho agente que induce la apoptosis de las células T se selecciona del grupo que comprende anticuerpo anti-TNF α (infiximab, adalimumab y CDP 870), etanercept, leflunamida, natalizumab (Acm anti-Integrina $\alpha 4\beta 7$), visilizumab (Acm anti-CD3).

En una realización, dicha galectina-2 se administra en combinación con un fármaco que induce la apoptosis de las células T mediante una ruta dependiente de caspasa-8, en la que tal fármaco puede ser uno de los mencionados anteriormente.

ES 2 282 750 T3

En una realización, dicha galectina-2 se administra en un paciente que no muestra o que no ha mostrado una respuesta medible a un fármaco que se sabe que induce normalmente apoptosis de las células T mediante una ruta dependiente de caspasa-8, en la que tal fármaco puede ser uno de los mencionados anteriormente.

5 En una realización, dicha galectina-2 se administra en combinación con fármacos antiinflamatorios tales como 5-aminosalicilatos (5-ASA), mesalazina, olsalazina, balsalazina, sulfapiridina y agente antiinflamatorio no esteroideo y/o un agente antirreumático, en la que, preferiblemente, dicho agente antirreumático es un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD) en la que, más preferiblemente, dicho fármaco antirreumático modificador de la enfermedad se selecciona del grupo que comprende aspirina, naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno, naprosina, indometacina, piroxicam y fármacos biológicos seleccionados del grupo que comprende anakinra y etodolac.

En una realización, dicho agente antirreumático se selecciona del grupo que comprende compuestos de oro, D-penicilamina, fármacos antimalaria tales como cloroquina, y sulfasalazina.

15 Preferiblemente, dicha galectina-2 se administra en combinación con inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (inhibidores de la COX-2), en la que, preferiblemente, dichos inhibidores de la ciclooxigenasa-2 se seleccionan del grupo que comprende celecoxib, rofecoxib, y valdecoxib.

En una realización, dicha galectina-2 se administra en combinación con un agente activador de las células T.

20 En una realización, dicha galectina-2 se administra en combinación con un β -galactósido, en la que, preferiblemente, dicho β -galactósido es lactosa.

25 En una realización, dicha galectina-2 se administra mediante administración sistémica y/o administración tópica, en la que, preferiblemente, dicha administración se produce mediante ingestión, preferiblemente por vía oral o anal, y/o mediante inyección, preferiblemente mediante inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y/o mediante aplicación nasal.

30 En una realización, dicha galectina-2 se administra como enema y/o como supositorio y/o como una forma farmacéutica de liberación sostenida, por ejemplo, encapsulada en una matriz de liberación dependiente del pH.

En una realización, dicha galectina-2 se administra en forma pegilada o no pegilada o como una mezcla de las formas.

35 En una realización, dicho paciente es uno que tiene un estado patológico en el que, antes de la administración de galectina-2, un subconjunto de las células T del paciente y/o un subconjunto de los macrófagos del paciente y/o un subconjunto de las células presentadoras de antígeno del paciente no experimenta apoptosis, preferiblemente apoptosis adecuada o en la que un subconjunto de las células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos del paciente muestran una apoptosis alterada o defectuosa.

40 En una realización, dicho subconjunto de células T son células T que se han activado previamente, preferiblemente mediante la ruta de CD3 o la ruta de CD2 o mediante mitógenos, moléculas coestimuladoras tales como CD28 o CD40, u otras rutas tales como los receptores de tipo Toll o integrinas.

45 En una realización, dicho subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos no están en reposo.

En una realización, dicho subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos no son células que han salido del ciclo celular o no son células que están detenidas en cualquier fase del ciclo celular.

50 Preferiblemente, dicho subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos se ubica principalmente en las articulaciones de dicho paciente, preferiblemente en las articulaciones sinoviales, y/o en el tracto gastrointestinal de dicho paciente, preferiblemente en el revestimiento de dicho tracto gastrointestinal, y/o en piel, y/o pulmón y/o hígado y/o riñón y/o son de una población de células sanguíneas periféricas de dicho paciente que son reclutadas en una mucosa durante la inflamación.

60 Preferiblemente, dicho paciente es uno que tiene un estado patológico en el que, antes de la administración de galectina-2, la razón entre la proteína Bcl-2 y la proteína Bax en las células T está desequilibrada a favor de la Bcl-2 antiapoptótica.

65 Los objetos de la presente invención se resuelven adicionalmente mediante el uso de galectina-2 o de un ácido nucleico que codifica para galectina-2 o de su hebra complementaria, o de un ácido nucleico que hibrida con tal ácido nucleico codificante o con su hebra complementaria, como un agente inmunomodulador, en el que, preferiblemente, la galectina-2 actúa sobre las células T, en las que, más preferiblemente, dichas células T son humanas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “galectina-2” se pretende que designe una proteína tal como se codifica mediante la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y las proteínas que tienen más de un 90% de identidad de secuencia con la misma (es decir, más del 90% de la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2). También

se pretende que signifique cualquier variante funcional de la misma que muestre una inducción selectiva de apoptosis de las células T en células T activadas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “una enfermedad con apoptosis alterada de células T” se pretende que signifique cualquier enfermedad que está acompañada por y/o está provocada por apoptosis alterada de las células T.

El término “implicado en o asociado a la patogenia de dicha enfermedad”, tal como se usa en el presente documento, se pretende que signifique que la apoptosis alterada puede, pero no tiene que ser necesariamente la causa de dicha enfermedad. En una realización preferida, dicha apoptosis alterada es una de las causas de dichas enfermedades, si bien es cierto que no necesariamente la única.

El término “apoptosis alterada de células T” se pretende que designe la noción de que las células T que han cumplido su función de eliminar un antígeno, en el transcurso normal de los acontecimientos (es decir, el transcurso de los acontecimientos no patológico) deben experimentar apoptosis, es decir, una autodestrucción programada, mientras que en un estado patológico, tal como una enfermedad, y en la que muestran “apoptosis alterada” no experimentan apoptosis en absoluto o a una velocidad más lenta de lo normal.

El término “proliferación de las células T” se pretende que signifique el proceso en el que las células T experimentan un ciclo celular de fases G1, S, G2 y M, como resultado del cual la célula se divide en dos células al final del ciclo.

El término “galectina-2 se administra ...”, tal como se usa en el presente documento, se pretende que signifique que puede administrarse como proteína o como el ácido nucleico que codifica para la proteína galectina-2 y/o como la hebra de ácido nucleico complementaria al ácido nucleico codificante. En una realización preferida, se pretende que signifique que la galectina-2 se administra como proteína.

El término “... se administra en combinación con ...”, tal como se usa en el presente documento se pretende que signifique que la galectina-2 puede administrarse junto con otros agentes. La administración puede ser simultánea o de uno detrás de otro, puede ser mediante la misma vía o mediante distintas vías, puede ser en la misma forma farmacéutica o mediante formas farmacéuticas separadas.

Un “agente que inhibe la proliferación de las células T” es un agente que bloquea (o decelera) una célula T en cualquier punto del ciclo celular.

Un “agente que induce la apoptosis de las células T” se pretende que designe a cualquier agente que provoque que la célula experimente muerte celular programada, que también se denomina comúnmente apoptosis.

El término “agente activador de células T”, tal como se usa en el presente documento, se pretende que indique cualquier agente capaz de inducir que una célula T entre desde un estado de reposo en un estado en el que la célula T experimenta el ciclo celular, o al menos, partes del mismo.

La administración de galectina-2 puede ser en cualquier forma adecuada para el receptor, siempre que se garantice una captación de galectina-2 en el cuerpo del receptor. Adicionalmente, la administración puede ser en combinación con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Puede ser sistémica y/o tópica, puede inyectarse, preferiblemente por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal y/o por vía subcutánea, o puede aplicarse mediante otras vías, por ejemplo, como enema o supositorio o mediante aplicación nasal.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la galectina-2 muestra características inmunomoduladoras únicas caracterizadas por la unión específica de la galectina-2 a la subunidad $\beta 1$ de las integrinas, una fuerte inducción de la apoptosis de las células T mediante el desencadenamiento de la ruta de muerte mitocondrial y la alteración de la expresión de integrinas y la adhesión celular, lo que convierte a la galectina-2 en particularmente adecuada para el tratamiento de enfermedades en las que las células T muestran una alteración de su comportamiento apoptótico. Estas enfermedades son enfermedades autoinmunitarias o enfermedades tumorales, en particular enfermedades de células T tumorales. Todos los linfomas T no Hodgkin periféricos y linfoblásticos/nodales y extranodales muestran una expresión significativa de las cadenas de integrina $\beta 1$. Por tanto, puede asumirse que este aumento de la expresión en la superficie de la integrina $\beta 1$ influye en el comportamiento de la célula tumoral. La Gal-2 regula por disminución la expresión de $\beta 1$ en células T y así, puede prevenir la unión de las células tumorales a la matriz extracelular. Por tanto, la Gal-2 posiblemente pueda tener efectos positivos en el tratamiento de enfermedades de células T tumorales.

La galectina-2, en particular la galectina-2 humana, no es inmunogénica y por tanto, se ajusta particularmente bien a su aplicación como medicamento.

La función de las células T se determina mediante su activación y proliferación posterior, la secreción de citoquinas, pero también la terminación de su acción mediante apoptosis. Las alteraciones de esta interacción fuertemente equilibrada se observan en muchas enfermedades, incluyendo la enfermedad inflamatoria del intestino (42). Se ha demostrado recientemente que la galectina-1 mejora la colitis y la hepatitis inducidas experimentalmente en ratones mediante inducción de la apoptosis de las células T (27, 43), mientras que la galectina-3 reveló propiedades antiapop-

tóticas en distintas poblaciones celulares (44). Así, las conclusiones con respecto a un miembro de la familia de las galectinas no pueden transferirse a otro miembro de la familia de las galectinas.

La expresión, unión y función biológica de la galectina-2 no estaba clara hasta ahora, y los experimentos descritos a continuación muestran por primera vez que la galectina-2 tiene efectos inmunomoduladores potentes en células T humanas, claramente distintos de los de otros miembros de la familia de las galectinas.

A continuación, se resumen, se perfilan y se discuten brevemente los resultados de los experimentos que conducen a la presente invención:

Al contrario que la galectina-1 y 3 (6), los presentes inventores encontraron que la galectina-2 no se expresa en células T en reposo o activadas, independientemente del origen como célula T virgen de sangre periférica o célula T memoria unida a tejido. Este hallazgo está de acuerdo con la expresión restringida del ARNm de galectina-2 encontrada sólo en las células epiteliales gastrointestinales (9). Mediante inmunohistoquímica, los presentes inventores observaron expresión de Gal-2 en células epiteliales del colon en muestras de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

Las galectinas son proteínas que se unen a hidratos de carbono que se entrecruzan con glucoconjugados de superficie de células que contienen β -galactósido, dando como resultado la modulación de la función celular (45). Los datos muestran que la galectina-2 se une a las células T en el plazo de horas y se mantiene unida durante más de 72 horas. Esta unión se inhibió mediante lactosa, lo que indica que las interacciones galectina-hidrato de carbono son responsables de la unión de la galectina-2 a las células T. De manera comparable a la galectina-1 (25), la unión de la galectina-2 a las células T fue comparable en las células T en reposo estimuladas con anti-CD3 o estimuladas con PMA/PHA (acetato miristato de forbol (PMA)); fitohemaglutinina (PHA), lo que demuestra que la unión de la galectina-2 a las células T es independiente de su estado de activación.

La capacidad de la galectina-2 para unirse a las células T se redujo significativamente mediante Acm bloqueantes frente a integrina- β 1, identificando a β 1 como un receptor de glucoproteína candidato que media la unión de la galectina-2 en la superficie de la célula T. La galectina-1 también interacciona con la subunidad β 1 de las integrinas (18), recalcando el importante papel de la integrina- β 1 en la unión de la galectina. Sin embargo, al contrario que para la galectina-1, la unión de la galectina-2 a PBT no podía evitarse mediante Acm frente a CD3 o CD7, lo que indica que ambas galectinas tienen sitios de unión distintos sobre las células T (24). La inmunoprecipitación usando perlas magnéticas recubiertas con galectina-1 y galectina-2 confirmó la interacción de la galectina-1 con las moléculas CD3, CD7 y β 1 (18, 24). Al contrario que con la galectina-1, pero de acuerdo con los experimentos de bloqueo, en los que ni CD3 ni CD7 se unieron a la galectina-2, la subunidad β 1 de las integrinas coimmunoprecipitó con galectina-2, lo que indican que la capacidad de β 1 para inhibir la unión de la galectina-2 a las células T se basa en una interacción física.

La apoptosis es una característica inmunomoduladora principal de las células T para terminar la función celular una vez se ha eliminado el antígeno, previniendo así la autoinmunidad y la malignidad. Además, los fármacos que inducen la apoptosis de las células T o macrófagos como el anti-factor de necrosis tumoral- α , son muy eficaces en el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria del intestino (46, 47). Las galectinas estudiadas hasta ahora tienen una capacidad notable de alterar la apoptosis celular en diversos tipos celulares, por ejemplo la galectina-1 induce y la galectina-3 previene la muerte celular (6). Sin embargo, no se sabía nada a este respecto sobre la galectina-2. Los datos muestran que la galectina-2 induce fuertemente la apoptosis de las células T hasta un grado incluso mayor que la inducible por galectina-1. La galectina-2 necesitó estimulación de las células para inducir apoptosis, lo que demuestra que se evita que las células T en reposo entren en muerte celular inducida por galectina-2. La galectina-2 también indujo una pequeña cantidad de necrosis, lo que demuestra que la galectina-2 no sólo induce la muerte celular programada, sino que también mata células mediante necrosis, una característica que no se había descrito anteriormente en absoluto para las galectinas.

La capacidad de la lactosa para inhibir la apoptosis inducida por galectina-2 indica que la actividad de unión del β -galactósido es esencialmente necesaria para la muerte celular inducida por galectina-2. De forma interesante, ya que la unión de la galectina-2 a las células T es independiente del estado de activación de las células, tal como se ha mostrado anteriormente, y ya que la inducción de la apoptosis por galectina-2 necesita la activación adicional de la célula, la unión del β -galactósido solo no parece capaz de iniciar el programa de muerte celular. La galectina-2 se une a la integrina β 1 en la superficie celular y el Acm frente a integrina β 1 inhibe la unión de la galectina-2 a las células T. Sin embargo, el Acm bloqueante frente a integrina β 1 no inhibió la apoptosis inducida por galectina-2, lo que sugiere que este receptor no es necesario para la muerte celular. La cicloheximida no pudo prevenir la muerte de las células T inducida por galectina-2, lo que indica que al contrario que con la galectina-9 (28), la síntesis de *nov*o de proteínas parece no ser necesaria, lo que se confirmó adicionalmente mediante la rápida inducción de la apoptosis en células T que siguió a la galectina-2 en el plazo de 6-12 h. También se ha notificado que la galectina-1 induce apoptosis de forma distinta en timocitos CD4⁺ y CD8⁺ positivos (38, 48, 49) y que las líneas de células T CD4⁺ humanas son más sensibles para la muerte celular inducida con galectina-9 (28). Sin embargo, cuando se examinaron células T esplénicas de ratas nefríticas, la galectina-9 indujo apoptosis selectiva de células T CD8⁺ activadas, pero no de CD4⁺ (50). Cuando se examinaron por separado las subpoblaciones de células T CD4 y CD8 positivas, la tasa de muerte celular inducida por galectina-2 fue similar en cada población celular, lo que demuestra que en PBT, la galectina-2 induce apoptosis independientemente de su estado como célula T CD4⁺ o CD8⁺.

La apoptosis se efectúa mediante distintas rutas, iniciadas mediante distintas caspasas. Los resultados de los presentes inventores demuestran claras diferencias en la actividad caspasa utilizada por distintas galectinas. Cuando se activaron las PBT en presencia de galectina-2, se indujo actividad caspasa-3 y 9, pero no 8. Además, la apoptosis mediada por galectina-2 se previno mediante el inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD, así como por inhibidores de la caspasa-3 y 9, apoyando además la importancia funcional de la activación de la caspasa-3 y 9 en la muerte celular inducida por galectina-2. A pesar del hecho de que las caspasas son los mediadores principales de la apoptosis (29), el papel de las caspasas en la apoptosis inducida por galectina se ha examinado muy poco. Se ha demostrado que la galectina-1 induce la actividad caspasa-8 y 9 en un modelo experimental de ratón (27), pero reduce la actividad caspasa-3 en ratones con hepatitis inducida por concanavalina A (43). Ya que la caspasa-3 se activa por caspasas anteriores, tales como la caspasa-8 ó 9, estos hallazgos parecen no estar de acuerdo y pueden explicarse mediante los distintos modelos de inflamación o tipos celulares usados. La capacidad de las galectinas para inducir la apoptosis no se limita a las galectinas prototipo, ya que la galectina-9 de repetición en tándem también induce apoptosis mediante una ruta dependiente de caspasa-1 calcio-calpaína (28). Al contrario de la galectina-2, la galectina-7 también indujo apoptosis de las células T comparable a la galectina-2, sin embargo, parece estar implicado un patrón completamente distinto de caspasas. Mientras que el inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD y el inhibidor de caspasa-3 zDEVD previnieron la apoptosis inducida por galectina 7, el bloqueo de las caspasas-1 y 8 anteriores, pero no la 9, limitaron la muerte de las células T. Estos hallazgos demuestran que la galectina-2 activa una cascada de caspasas distinta para ejecutar la muerte celular en comparación con otras galectinas.

La caspasa-9 participa en la ruta mitocondrial de apoptosis y se activa cuando se construye un complejo con citocromo c y APAF-1 (29). El citocromo c se libera desde la mitocondria tras la alteración del gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial interna, un proceso íntimamente regulado por los miembros de la familia bcl-2 (29, 51, 52). Los datos de los presentes inventores muestran que la galectina-2 deteriora el potencial de membrana mitocondrial e inicia la liberación de citocromo c, lo que demuestra que la galectina-2 usa la ruta mitocondrial para inducir la muerte de la célula T. Los miembros de la familia Bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria, y la sensibilidad de una célula frente a un estímulo apoptótico es dependiente del equilibrio relativo entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia (52). La galectina-2 disminuyó la bcl-2 antiapoptótica, mientras que aumentó los niveles de bax proapoptótica, dando como resultado una razón de bcl-2/bax más baja. En las enfermedades autoinmunitarias tales como la enfermedad de Crohn, la razón de bcl-2/bax es superior a los controles (53), y la capacidad de la galectina-2 para disminuir esta razón y así inducir la muerte celular en células que proliferan descontroladamente, puede ser un enfoque atractivo para el uso terapéutico de la galectina-2 en tales enfermedades.

La apoptosis y el ciclo celular están ligados en última instancia, y las células T en G0 están protegidas de la muerte celular inducida por antígeno (29, 54). La necesidad del ciclo también es verdadera para la muerte celular inducida por galectina-2, sin embargo, al contrario que la galectina-1, que inhibe profundamente la proliferación de las células T (38), la galectina-2 no moduló el ciclo celular PBT. Los datos disponibles hasta ahora disponibles que estudian el impacto de las galectinas sobre el ciclo celular utilizaban en su mayoría la incorporación de timidina para medir la proliferación celular. (38, 55). Aunque simple y reproducible, este procedimiento sólo mide la síntesis de ADN durante la fase S, no proporciona información sobre la fracción de células que están pasando a otras fases y no evalúa las células apoptóticas, incapaces de entrar en el ciclo. Sin embargo, tal como se determinó mediante expresión de ciclina B1, una herramienta altamente sensible para cuantificar la progresión a través del ciclo celular hasta la fase G2/M (56), la galectina-1 y 7, pero no la galectina-2, inhiben fuertemente la progresión del ciclo celular en PBT. Además, demostrando que la incapacidad de la galectina-2 para influir en el ciclo de las células T no se debe a un cambio en los promotores e inhibidores del ciclo celular, se proporciona una prueba de que la maquinaria del ciclo celular de las células T no está afectada por la galectina-2, una característica claramente distinta de la galectina-1 y 3. Los presentes inventores y otros han demostrado que la galectina-1 se une al receptor de las células T (TCR) (24, 38) y Vespa y colaboradores han demostrado que la galectina-1 junto con Acm anti-TCR induce apoptosis, pero antagoniza la producción de IL-2 inducida por anti-TCR (38). La observación de que la galectina-2 no se une al TCR puede explicar por qué galectina-2 no inhibe el ciclo de las células T, lo que demuestra de nuevo que el comportamiento de la galectina-2 es distinto al de la galectina-1.

Las células T circulan continuamente en busca de antígenos extraños y el reclutamiento y retención de los linfocitos T dentro de los tejidos inflamados son dependientes de la adhesión a una red acelular de proteínas, glucoproteínas y proteoglicanos conocidos como la matriz extracelular (MEC) (57, 58). La adhesión es un componente crítico de la respuesta inmunitaria mediada por células T y por lo tanto, está fuertemente regulada (59-61). Las galectinas modulan la adhesión celular ejerciendo efectos directos tales como prevenir estéricamente la adhesión a las integrinas de la superficie celular, pero también mediante la unión a los dominios extracelulares de una o ambas subunidades de una integrina o la internación de las integrinas (20, 39, 45). La adhesión de las células T a los compuestos de la MEC está regulada de manera divergente por galectinas y depende del tipo celular y la proteína de la MEC examinada (6, 14, 62). La adhesión celular a los compuestos de la MEC está mediada por la familia de integrinas $\beta 1$, y los presentes inventores han demostrado que la galectina-2 inhibe el cambio conformacional de la subunidad de la integrina necesaria para lograr alta afinidad. Este efecto no puede explicarse simplemente mediante la unión inespecífica de la galectina-2 a la superficie celular y evitando así la activación de la integrina, ya que i) la galectina-2 no afectó a la expresión de otras integrinas y ii) en las células T intestinales, no se observó este efecto. Además, la regulación por incremento de $\alpha 5$ por la galectina-1 y galectina-2 puede sugerir, que la internación propuesta de las integrinas mediante galectinas (18, 20) puede no ser cierta para todas las integrinas. Mientras que la galectina-1 inhibió la adhesión de las células T a ambos, colágeno y fibronectina, la galectina-2 inhibió la adhesión de las células T al colágeno tipo I, pero al contrario que la galectina-1, aumentó profundamente la unión celular a la fibronectina. Al contrario que ambas, galectina-1

y galectina-2, la galectina-7, no influyó en la adhesión de las células T al colágeno tipo I o la fibronectina, lo que indica que la galectina-2 ejerce características únicas no sólo respecto a la apoptosis, sino también a la adhesión celular. La unión de las células T a sus respectivos compuestos de la MEC estuvo mediada mediante receptores específicos de colágeno y fibronectina, tal como se demostró mediante experimentos de bloqueo. No está claro por qué la galectina-2 promueve la adhesión celular a la fibronectina a pesar del hecho de que galectina-2 reduce la expresión de integrina $\beta 1$. Sin embargo, la regulación de la adhesión celular por galectinas parece ser compleja, ya que la galectina-1 tiene propiedades pro-adhesivas en melanocitos, células de teratocarcinoma o fibroblastos, pero inhibe la adhesión de las células T a laminina y fibronectina (revisado en (6)). Puede decirse lo mismo de la galectina-3 que aumenta enormemente la adhesión de los neutrófilos a diversos sustratos (63), pero bloquea la adhesión de líneas celulares tumorales a laminina, fibronectina o colágeno (64). Además, la reducción de la proliferación celular, como es el caso de la galectina-1 (38) puede explicar la regulación por disminución de la expresión de la integrina $\beta 1$, pero ya que la galectina-2 regula por disminución la expresión de la integrina $\beta 1$ sin afectar al ciclo celular, la regulación de la expresión de la integrina por galectinas es independiente de su capacidad para regular la proliferación celular. Usando un amplio grupo de anticuerpos bloqueantes de integrinas, los inventores demostraron que la unión de las células T se midió a través de distintos receptores de colágeno y fibronectina, y la incubación previa de células T con Acm $\beta 1$ además inhibió la unión de las células T al colágeno y previno la regulación por incremento de la adhesión celular a la fibronectina mediante galectina-2. Esto sugiere que la modulación de la adhesión celular mediante galectina-2 es dependiente de integrina $\beta 1$. Además, la inhibición de la adhesión celular mediante Acm bloqueantes de $\beta 1$ se evitó mediante la incubación previa con galectina-2, lo que indica que la unión de la galectina-2 a las células T puede inactivar funcionalmente la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en la superficie celular.

En resumen, los estudios de los presentes inventores proporcionan pruebas claras de que la galectina-2 se une de manera dependiente de hidratos de carbono a la subunidad $\beta 1$ de las integrinas, pero no al complejo TCR. La galectina-2 induce apoptosis de las células T mediante la ruta de muerte intrínseca mitocondrial, exclusivamente en células T que proliferan, pero no en células T en reposo. La inducción de la apoptosis de las células T en células activadas, sin regular por disminución el ciclo celular, permite una respuesta suficiente de las células T tras el contacto con el antígeno, y evita la apoptosis no selectiva de las células T en reposo, sin implicarse en el curso de la respuesta inmunitaria específica. Además, mediante la regulación selectiva de la adhesión celular a la MEC, la galectina-2 puede contribuir a la migración de las células T una vez que las células se activan. Así, los datos proporcionan pruebas claras de que la galectina-2 modula el sistema inmunitario humano mediante mecanismos claramente distintos de otras galectinas, proporcionan una nueva percepción de cómo las galectinas pueden interactuar con las células T, y ofrece un nuevo concepto en el tratamiento de enfermedades con apoptosis alterada de las células T como la enfermedad de Crohn o la artritis reumatoide.

La invención se describirá ahora haciendo referencia a la siguiente descripción específica y los ejemplos que se proporcionan para ilustrar, no para limitar, la presente invención.

En las figuras:

La figura 1 muestra la distinta expresión de la galectina-1 y galectina-2 en las células T. Se detecta claramente el a) ARNm y b) la expresión de la proteína galectina-1 en PBT en reposo y activado mientras que no se detectan ni el a) ARNm ni b) la expresión de niveles proteicos de galectina-2 en PBT o LPT. Se cultivaron las células en ausencia y presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD3 o anti-CD2 (T11₂/T11₃) entrecruzado durante 72 horas, y se determinó el ARNm y la expresión de la proteína mediante análisis por PCR e inmunotransferencia de tipo western, respectivamente. La línea celular epitelial intestinal no transformada IEC-6 sirvió como control positivo. Los gráficos representan tres experimentos distintos.

La figura 2 muestra la unión dependiente de β -galactósido de la galectina-2 a las células T. Se cultivaron células en presencia de galectina-2 5 μ g/ml acoplada a biotina y diversas combinaciones de Acm anti-CD3 entrecruzado, PMA/PHA, o lactosa (50 mMol) durante 24 h. Entonces se recogieron las células y se determinó la unión de la galectina-2 a las células T mediante citometría de flujo de dos colores usando APC marcada con estreptavidina para detectar los sitios biotinilados. El gráfico es representativo para de tres a cinco experimentos distintos.

La figura 3 muestra que la galectina-2 se une a la integrina $\beta 1$, pero no a CD3 o CD7. A) Las células se incubaron previamente con Acm frente a CD3, CD7, y $\beta 1$ (dilución 1:100) durante 1 h a t.a. y después se cultivaron durante 24 h adicionales en presencia de 5 μ g/ml de galectina-2 acoplada a biotina. Después se recogieron las células y la unión de la galectina-2 a las células T se determinó mediante citometría de flujo de dos colores usando APC marcada con estreptavidina para detectar los sitios biotinilados. B) La galectina-1 coimmunoprecipita con CD3, CD7 e integrina $\beta 1$, mientras que la galectina-2 coimmunoprecipita sólo con integrina $\beta 1$. Se incubaron las células con perlas activadas con tosilo recubiertas con galectina-1 o 2 y se lisaron a continuación. Los fragmentos celulares unidos a perlas se separaron magnéticamente y se realizó una inmunotransferencia para CD3, CD7 o $\beta 1$. Ambos gráficos son representativos para cuatro experimentos diferentes dando resultados similares.

La figura 4 muestra la inducción de la apoptosis de las células T mediante galectina-2. Análisis de los niveles de anexina-V y PI (yoduro de propidio) (la anexina V se une a fosfatidilserina (PS). La PS se da la vuelta durante la apoptosis temprana desde el interior hacia el exterior de la membrana celular. La anexina-V detecta la PS extracelular y se determina así el número de células apoptóticas) reveló que la galectina-2 induce más apoptosis y necrosis de las células T que la galectina-1 y que se requirió la activación celular para inducir la muerte celular mediada por

galectina-2. Se cultivaron las células con galectina-1 o 2, 0, 10, 25, 50, o 100 $\mu\text{g/ml}$, en presencia o ausencia de Acm anti-CD3 entrecruzado durante 24 h. Se evaluaron la apoptosis y la necrosis mediante la tinción con anexina-V y PI, respectivamente. Los datos representan la media $\pm$ EEM de seis a siete experimentos independientes. * $p < 0,05$ para el aumento frente a galectina 0 $\mu\text{g/ml}$; ** $p < 0,05$ para galectina-2 frente a galectina-1.

La figura 5 muestra que la apoptosis mediada por galectina-2 es dependiente de caspasa 3 y 9. A) La gal-2 induce la actividad de las caspasas-3 y 9, pero no de la caspasa-8 (A). Se incubaron las células en presencia o ausencia de Gal-2 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h y se evaluó la actividad de la caspasa mediante citofluorometría de flujo tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Los diagramas ilustrados son representativos de cuatro experimentos independientes que lograron resultados muy similares. B) El inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD y el inhibidor de la caspasa-3 (zDEVD) alteraron la actividad de las galectinas-2, 7 y 1 para inducir muerte celular. El inhibidor de la caspasa-1 zYVAD sólo bloqueó la muerte celular inducida por gal-7, mientras que el inhibidor de la caspasa-9 zLEHD bloqueó la apoptosis inducida por gal-2 y 1. El inhibidor de la caspasa-8 zIETD bloqueó la muerte celular inducida por Gal-7 y 1 (B). Los datos muestran la media $\pm$ EEM de cuatro series de experimentos independientes. * $p < 0,05$ para el aumento frente a la ausencia de galectina; * $p < 0,05$ para la disminución frente a galectina.

La figura 6 muestra que la galectina 2 altera el potencial de membrana mitocondrial, disminuye los niveles proteicos de bcl-2, pero aumenta los de bax e induce la escisión del factor de fragmentación del ADN. Se cultivaron células durante 48 h en presencia de galectina-2 0, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$. A) La tinción con rodamina 123 demuestra una reducción del potencial de membrana mitocondrial mediante galectina-2. B) La citometría de flujo y C) la inmunotransferencia de tipo western muestran que la galectina-2 reduce profundamente los niveles bcl-2 antiapoptótica, mientras que aumenta los bax proapoptótica e induce la escisión del DFF. Todos los paneles son representativos de tres experimentos distintos.

La figura 7 muestra que la galectina-2 no altera el ciclo de las células T. A) El número de células en ciclo en la fase S o G2/M es comparable en presencia o ausencia de galectina-2. Se cultivaron las células con galectina-2 0, 25 ó 50 $\mu\text{g/ml}$ y se activaron con anticuerpo monoclonal entrecruzado anti-CD3 durante 72 h. Se evaluaron las fases del ciclo celular mediante la medición del contenido en ADN por tinción con PI seguida de citometría de flujo. Cada panel es representativo de cinco experimentos distintos. B) La expresión de reguladores del ciclo celular no cambia mediante galectina-2. Se cultivaron las células con galectina-2 0, 25 ó 50 $\mu\text{g/ml}$ y se activaron con Acm anti-CD3 entrecruzado durante 72 h después de lo cual se evaluó la expresión de la proteína mediante inmunotransferencia de tipo western. Cada panel es representativo de al menos cuatro experimentos distintos.

La figura 8 muestra que la galectina-1 y 7, pero no la 2 inhiben la progresión de la fase G2/M del ciclo celular. En comparación con la galectina-2, el análisis de citometría de flujo reveló que la galectina-1 y 7 disminuyen la expresión de la ciclina B1 en la fase G2/M de PBT activadas. Se cultivaron las células en presencia de Acm frente a CD3 entrecruzado durante 72 h, después de lo cual se examinó la expresión de la ciclina B1 y el contenido en ADN mediante citometría de flujo. La figura es representativa de cuatro experimentos distintos.

La figura 9 muestra que la galectina-2 altera distintivamente la expresión de integrinas. En PBT, la galectina-1 y galectina-2 regulan por disminución la expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ de manera comparable, no cambia la de $\beta 4$, y aumenta ligeramente la de $\alpha 1$. En LPT, la galectina-1 y galectina-2 no modulan la expresión de la integrina $\beta 1$. La línea punteada indica el isotipo. Se incubaron las células en presencia o ausencia de galectina-1 ó 2 50 $\mu\text{g/ml}$ y se evaluó la expresión de integrinas mediante citometría de flujo. Se seleccionaron las células control negativas que contenían menos de un 3% de las células positivas. Se muestran histogramas representativos de tres experimentos.

La figura 10 muestra que la galectina-2 modula distintamente la adhesión de las células T al colágeno I y a la fibronectina. A) La galectina-1 inhibe la adhesión celular al colágeno tipo I y a la fibronectina, mientras que la galectina-2 inhibe la adhesión de PBT y LPT al colágeno y aumenta la unión de las células T a la fibronectina. La galectina-7 no altera significativamente la adhesión de las células T al colágeno o la fibronectina. B) Los Acm frente a integrina bloqueantes específicos inhiben la modulación de la adhesión celular mediada por galectina-2 al colágeno tipo I y a la fibronectina. La incubación previa de las células T con galectina-2 antes de añadir el Acm frente a integrina- $\beta 1$ invirtió el efecto inhibitor del Acm frente a integrina $\beta 1$. Se marcaron PBT y LPT con calceína y se permitió adherirse a 5×10^5 células/pocillo durante 2 h a plástico recubierto con BSA como control, colágeno tipo I o fibronectina. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavado. Se cuantificó la fluorescencia de las células T adherentes usando un espectrofotómetro de fluorescencia. Los datos representan la media $\pm$ EEM de cinco experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a Gal-2 0 $\mu\text{g/ml}$; * $p < 0,05$ frente a Gal-2 25 $\mu\text{g/ml}$.

La figura 11 muestra el efecto de concentraciones variantes de galectina-2 sobre células T de pacientes que tienen AR o enfermedad de Crohn y un grupo control. En detalle, las PBT de pacientes con EC y AR y los controles sanos se estimularon con anticuerpos Acm anti-CD3 entrecruzados durante 48 horas en presencia y ausencia de la concentración indicada de galectina-2 humana. Se determinó la apoptosis mediante tinción con anexina-V.

La figura 12 muestra el efecto del tacrolimus (Prograf®) sobre la apoptosis y la necrosis de PBT estimuladas y sin estimular. El tacrolimus es uno de los inmunosupresores más potentes y actualmente se utiliza para la prevención del rechazo orgánico tras un trasplante de un órgano sólido y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino en pacientes seleccionados. Sin embargo, induce principalmente necrosis y no apoptosis de las PBT no

estimuladas así como de las estimuladas con anti-CD3. Al contrario de esto, y tal como se muestra en la figura 4, la galectina-2 hace esta distinción e induce principalmente apoptosis en PBT, indicando así una mejor idoneidad de la galectina-2 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y Procedimientos

10

Reactivos y anticuerpos

Se usaron Acm anti-CD3 (Acm) (OKT3; Ortho Diagnostic System Inc., Raritan, NJ), Acm anti-CD2 (T11₂/T11₃; facilitado generosamente por el Dr. Ellis Reinherz, Boston, MA), PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y PHA (Gibco, Grand Island, NY) para la activación de las células T. Se adquirió el inhibidor de amplio espectro de caspasas Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona (zVAD-fmk) de Biomol (Plymouth Meeting, PA), y el inhibidor de caspasa-1 Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (Z-YVAD-fmk), el inhibidor de caspasa-2 Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona (zVDVAD-fmk), el inhibidor caspasa-3 Z-Asp-Glu-Val-Asp(OMe)-fluorometilcetona (zDEVd-fmk), el inhibidor caspasa-8 Z-Ile-Glu-Thr-Asp(OMe)-fluorometilcetona (zIETD-fmk) y el inhibidor caspasa-9 Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH₂F (Z-LEHD-fmk) se adquirieron en Calbiochem (San Diego, CA). Se adquirieron el FITC-conjugado anti-ciclina B1 y el anti-caspasa 3 activa marcado con PE en BD Pharmingen (San Diego, CA), las IgG anti-ratón policlonales marcadas con PE y FITC, CD3-PE, CD4-PE, CD8-FITC, CD3-PE, se obtuvieron en DAKO (Dako, Carpinteria, CA). Se adquirió el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con FITC a Biosource (Camarillo, CA) y se obtuvo la estreptavidina marcada con APC de Caltag (Burlingame, CA). Los kits de detección de caspasa con carboxifluoresceína (FAM), para medir la actividad caspasa, se obtuvieron de Biocarta (San Diego, CA). La lactosa, sacarosa, ciclofosfamida, y rodamina 123 se adquirieron a Sigma-Aldrich. El yoduro de propidio (PI) se adquirió a Calbiochem (San Diego, CA). Todos los inhibidores de proteasas y fosfatasas usados para la inmunotransferencia de tipo western se adquirieron a Sigma-Aldrich. Los anticuerpos frente a caspasa 3 humana, DFF, PARP, proteína del retinoblastoma (Rb), ciclina A, p21, p27, y p53 se adquirieron a BD Pharmingen. Los anticuerpos frente a bax, bcl-2, y citocromo c humanos se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). El kit de serie de perlas de citometría se compró a BD Pharmingen, y los kit de ELISA para IFN- γ , IL-10, y IL-2 se obtuvieron de R&D (Minneapolis, MN). La galectina-2 y -7, así como los cebadores de galectina los facilitó amistosamente H.-J. Gabius (Instituto de Química Fisiológica, Facultad de Medicina Veterinaria, Munich, Alemania). Para los experimentos de citometría de flujo y de bloqueo, se usaron Acm anti-integrina α 1 humana (clon FB12), Acm anti-integrina α 2 humana (clon P1E6), Acm anti-integrina α 3 humana (clon P1B5), anti-integrina α 4 humana (clon P1H4), anti-integrina α 5 humana (clon P1D6), anti-integrina β 2 humana (clon P4C10) y β 2 (clon 3E1) (todos de Chemicon, Temecula, CA).

Preparación de linfocitos T

40

Se aislaron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de voluntarios sanos a partir de sangre venosa heparinizada usando gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque. Para el aislamiento de linfocitos T de sangre periférica (PBT), se incubaron las células PBMC durante 30 minutos a 4°C con Ac anti-CD19, CD14, y CD16 marcados magnéticamente dirigidos frente a linfocitos B, monocitos, y neutrófilos, respectivamente (Miltenyi Biotec Inc., Bergisch-Gladbach, Alemania). Entonces, se recogieron las células T usando un sistema de clasificación de células magnético (MACS, Miltenyi Biotec Inc.). Se aislaron las células T de la lámina propia (LPT) de muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes ingresados para la resección intestinal de estados tumorales y no tumorales del intestino grueso, incluyendo cáncer de colon y pólipos benignos tal como se ha descrito previamente (21). Se eliminó brevemente el moco y las células epiteliales de la mucosa intestinal diseccionada en etapas de lavado secuencial con DTT y EDTA, y se digirió toda la noche a 37°C con colagenasa y ADNasa. Se separaron las células mononucleares de la suspensión de células sin tratar mediante superposición en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Para la purificación de LPT, se incubaron las células mononucleares de la lámina propia reducida en macrófagos durante 30 minutos a 4°C con perlas marcadas magnéticamente, tal como se describió anteriormente y se recogieron mediante selección negativa usando el sistema MACS. Tal como se evaluó mediante citometría de flujo, las poblaciones de PBT y LPT purificadas contenían >99% y >92% de células CD3⁺, respectivamente.

PCR

Se aisló el ARN total usando el kit de RT para PCR Advantage (Clontech, Palo Alto, CA) según las instrucciones del fabricante. Se realizó la transcripción inversa de alícuotas de ARN total de 2,5 μ g esencialmente tal como se ha descrito previamente (8) y se amplificó el ARNm de la galectina-2 usando los cebadores siguientes: sentido, 5'-ATGACGGGGGAAGTTGAGGTT-3' y antisentido 5'-TTACGCTCAGGTAGCTCAGGT-3'. El termociclador comenzó con un inicio en caliente de 94°C durante 4 minutos seguido de 36 ciclos constituidos cada uno por 94°C durante 60 segundos, hibridación durante 60 segundos a 60°C, extensión a 72°C durante 120 segundos, y terminó tras un periodo final de 10 minutos a 72°C. Se separaron los productos en un gel de agarosa TAE al 1% y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

Inmunotransferencia de tipo western

Para la inmunotransferencia, se lavaron las células en PBS y se lisaron en tampón de lisis celular (Triton-X al 1%, NP-40 al 0,5%, SDS al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,5%, EDTA 5 mM, cóctel de inhibidor 2 de proteasa y de fosfatasa 50 mM y 50 mM, PMSF 1 mM, inhibidor de tripsina-quimotripsina 100 µg/ml, quimoestatina 100 µg/ml en PBS). Se midió la concentración de proteínas de cada lisado usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se fraccionaron cantidades equivalentes de proteína (10 µg) en un gel Tris-glicina al 10-20% y se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa (Novex, San Diego, CA). Se bloquearon las membranas con leche al 5% en Tween 20-PBS al 0,1% (Fisher Scientific, Hanover Park, IL), seguido de una incubación durante 60 min a temperatura ambiente con el anticuerpo primario indicado. Se lavaron las membranas seis veces con Tween 20-PBS al 0,1% y después se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology), se lavaron y se incubaron con el sustrato quimioluminiscente (Perkin-Elmer, Carlsbad, CA) durante 5 minutos. Entonces se expusieron las membranas a la película (Amersham, Arlington Heights, IL).

Determinación de la unión de galectina-2

Para medir la unión de la galectina-2 a los linfocitos T, se estimularon las células durante 1, 6, 12, 24, 48, y 72 h con o sin Acm anti-CD3 o PMA y PHA y se incubaron en presencia de galectina-2 o galectina-7 5 µg/ml marcadas con biotina. Después se recogieron las células, se lavaron y se tiñeron con Acm anti-CD3-FITC y estreptavidina conjugada con APC (Biosource) seguido por análisis de citometría de flujo. Se realizó cada análisis sobre al menos 20.000 acontecimientos.

Separación magnética de complejos que contienen galectina-2

Para la separación de los complejos asociados a galectina-2, se recubrieron 1×10^8 perlas recubiertas de poliestireno activadas por tosilato, supermagnéticas (Dynalbeads, Dynal Biotech, Oslo, Noruega) con o bien 350 µg de BSA, galectina-1, galectina-2, CD7, integrina-β1 o bien OKT3 durante toda la noche a 37°C usando rotación con oscilación. Tras la incubación, se lavaron las perlas en Tris 0,2 M (pH 8,5 que contiene BSA al 0,1%) y luego se incubaron con 2×10^6 PBT durante 1 h a 37°C. Se eliminaron las células no conjugadas mediante lavado exhaustivo y posteriormente se lisaron las células con tampón de homogenización (Tris HCl 20 mM, pH 7,6; MgCl₂ 10 mM, Triton-X 100 al 0,05%, cóctel de inhibidor de proteasa 50 mM y de fosfatasas 50 mM), se resuspendieron en tampón de carga de proteínas SDS-DTT, se calentaron a 95°C durante 5 min y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE.

Ensayo de adhesión

Se recubrieron previamente placas de 96 pocillos de fondo plano durante toda la noche a 4°C con 12 µg/pocillo de fibronectina (Chemicon) en DPBS, 40 µg/pocillo de colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) en ácido acético 0,1 M, o BSA al 3% (Sigma-Aldrich) en DPBS como control, y después se lavaron tres veces con DPBS. Se marcaron fluorescentemente células T recién aisladas a 5×10^6 células/ml en RPMI con calceína-AM 5 µM (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 min a 37°C en CO₂ al 5%. Después se lavaron las células tres veces con RPMI que contiene SBF al 5%. Se resuspendieron las células T marcadas con calceína en RPMI y se añadieron 5×10^5 células T/pocillo a placas de 96 pocillos que contienen componentes purificados de la MEC o BSA durante los tiempos indicados. Se incubaron previamente concentraciones saturantes de Acm bloqueantes de integrinas (predeterminadas mediante citometría de flujo) con células T durante 30 min a 37°C antes de añadir las células T a los pocillos para el ensayo de adhesión. Se eliminaron las células no adherentes mediante una técnica de lavado normalizada que se desarrolló para minimizar la unión de fondo, que incluye un movimiento tanto orbital como oscilante repetido tres veces con RPMI. Se cuantificó la adhesión con un espectrofotómetro de fluorescencia de múltiples pocillos (Tecan, Groedig, Austria). Se expresaron los resultados para cada grupo experimental como el porcentaje medio ± DE de las células T unidas a partir de pocillos por triplicado.

Determinación de apoptosis y muerte celular

Se determinó la apoptosis mediante control de la fragmentación nuclear y la externalización de la fosfatidilserina (PS). Para detectar la fragmentación nuclear, se cultivaron las células T en presencia y ausencia de las galectinas respectivas, con o sin anticuerpos bloqueantes o activación adicional, durante 48 h. Después se fijaron las células en 0,2 ml de formaldehído al 37% durante 10 min a temperatura ambiente. Entonces, se trataron las células con 1 ml de PBS que contiene Nonidet P-40 al 0,2% (Sigma-Aldrich) durante 2 min a temperatura ambiente y después se enjuagaron una vez en PBS. Se distinguieron las células apoptóticas mediante tinción del ADN nuclear con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Calbiochem). Se añadió el DAPI a una concentración de 0,2 ng/ml de PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se enjuagaron las células dos veces en PBS y se mantuvieron los cubreobjetos con el lado de las células hacia abajo sobre un portaobjetos de un microscopio y se analizaron usando un microscopio Zeiss Axiovert 135M (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para analizar las fases tempranas de la apoptosis, se midió la externalización de PS. Se cultivaron las células tal como se describió, se recogieron a los puntos de tiempo respectivos, se tiñeron con anexina-V marcada con FITC y PI y se analizó mediante citometría de flujo usando el programa de software CellQuest (BD Pharmingen). Se analizó un mínimo de 15.000 células en cada caso.

Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

La rodamina 123 es un colorante catiónico fluorescente que se acumula en la matriz mitocondrial debido a su carga y solubilidad tanto en la membrana mitocondrial interna como en el espacio de la matriz (22). Basándose en la observación de que la acumulación de este colorante lipófilo está en proporción a $\Delta\Psi$, y que la desexcitación de la mitocondria disminuye la fluorescencia de la rodamina 123 (23), los inventores midieron el potencial de membrana mitocondrial de PBT. Se estimularon las células en presencia o ausencia de galectina-2 con CD3 durante 24 h, se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de rodamina 123 (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C en oscuridad. Se lavaron las muestras dos veces en PBS frío y se realizó inmediatamente el análisis de fluorescencia mediante citometría de flujo usando un láser de ión de argón con un filtro de emisión a 530 nm sin fijación (BD FACS-Calibur). Se usaron PBT sin estimulación y muestras sin teñir como controles.

Análisis de citometría de flujo

Para la tinción de la superficie, se lavaron las células dos veces en PBS helado y se resuspendieron 1×10^6 células en tampón de flujo (HBSS que contiene BSA al 1% y azida sódica al 0,1%). Se incubaron las células con el Acm respectivo a concentraciones saturantes predeterminadas o con un Acm de ratón no específico del mismo isotipo (DAKO) durante 30 min a 4°C, se lavaron dos veces con tampón de flujo, y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugado con FITC durante 30 min a 4°C. Se lavaron de nuevo las células dos veces con tampón de flujo, se fijaron en paraformaldehído al 1% y se analizaron mediante un citómetro de flujo de láser único (FACS-Calibur, Beckman Coulter), usando el software Cell Quest (BD Pharmingen). Se seleccionaron las células teñidas con un Ac control negativo que contenían < 2% de las células positivas. Para realizar el análisis de las proteínas intracelulares, se lavaron las células dos veces con PBS, se ajustaron a 1×10^6 células por muestra y se fijaron en metanol al 90% a -20°C. Tras la fijación, se lavaron las células dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo de ratón monoclonal anti-bax, Bcl-2, Rb, ciclina A, p21, p27, o p53 durante 45 minutos a 4°C, seguido por una incubación con un Acm de cabra anti-ratón conjugado con FITC (Biosource) durante 45 minutos a 4°C. Después de eso, se lavaron las células y se analizaron mediante citometría de flujo tal como se describió anteriormente. Se determinó el nivel de fondo de inmunofluorescencia mediante incubación de las células con IgG de ratón conjugada con FITC.

Determinación de la actividad caspasa

Para medir la actividad caspasa, se incubaron 5×10^5 PBT en presencia o ausencia de galectina-2 50 $\mu\text{g/ml}$ junto con derivados del Ac anti-caspasa-3 purificado por afinidad marcado con PE (BD Pharmingen), el inhibidor de caspasa-8 marcado con carboxifluoresceína FAM-LETD-fmk o el inhibidor de caspasa-9 FAM-LEHD-fmk (ambos de Biocharta, Hamburgo, Alemania), uniéndose todos de manera irreversible a la caspasa-3, 8 ó 9 activadas, respectivamente. Después se analizaron las células por citometría de flujo (FACS-Calibur, BD) y se determinó el aumento de la actividad caspasa tras la selección adecuada en correlación con las células sin tratar.

Análisis del ciclo de las células T

Se realizó citometría de flujo tras tinción para determinar el contenido de ADN, y ciclina B1, esencialmente tal como se describió previamente (21). Se lavaron brevemente las células dos veces con PBS, se ajustaron a 1×10^6 células/muestra y se fijaron en metanol al 90% a -20°C. Tras la fijación, se lavaron las células dos veces con PBS, se incubaron durante 45 min a 4°C con un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC-ciclina B1. Tras el lavado final, se resuspendieron las células en PBS y 5 μl de ARNasa (0,6 $\mu\text{g/ml}$, 30-60 Unidades Kunitz, Sigma), se incubaron a 37°C durante 15 min y después se enfriaron en hielo. Se añadieron ciento veinticinco microlitros de PI (200 $\mu\text{g/ml}$) antes del análisis mediante citometría de flujo. Cada análisis se realizó sobre al menos 25.000 acontecimientos.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico usando la prueba de la t de Student para datos emparejados. Los resultados se expresan como la media $\pm$ EEM y se dedujo la significación con valores de $p < 0,05$.

*Ejemplo 2**Resultados**Expresión de galectina-2 en células T*

Mientras que la galectina-1 y la galectina-3 se distribuyen ampliamente entre diversos tejidos de mamíferos y tipos celulares, otras galectinas tales como la galectina-4 y la galectina-6 se expresan de forma más restringida en los tejidos (6-8). La expresión de galectina-2 es distinta de la de otras galectinas y parece restringirse al tracto GI (8, 9). Dentro del tracto GI, se detectó la expresión del ARNm de la galectina-2 en el duodeno, yeyuno y, en un menor grado, en el ciego, el colon y el recto (9), sin embargo no se ha examinado aún la expresión de la proteína en tejidos humanos. Ya que las galectinas ejercen efectos inmunorreguladores potentes, los inventores quisieron en primer lugar saber, si la galectina-2 se expresa en células T intestinales y periféricas en reposo y activadas. Los análisis de PCR demostraron que, al contrario que la galectina-1, el ARNm de la galectina-2 no se expresa en PBT en reposo o activadas (figura 1a). Por consiguiente, los análisis de inmunotransferencia de tipo western no lograron detectar la expresión de la

proteína galectina-2 en PBT o LPT en reposo o estimuladas (figura 1b). Se usó la línea celular epitelial intestinal no transformada de rata IEC-6 como control positivo, que demuestra la expresión de galectina-2 en estas líneas celulares (figura 1b).

Unión dependiente de β -galactósido de la galectina-2 a las células T

Para examinar si la galectina-2 ejerce su función inmunorreguladora mediante la unión a células T, se marcó la galectina-2 con biotina y se añadieron a PBT no activadas, activadas con anti-CD3, o activadas con PMA y PHA durante periodos de tiempo crecientes. Los análisis de citometría de flujo mostraron que la unión semimáxima de la galectina-2 se producía en los tres grupos en un plazo de 60 min de incubación, alcanzó un máximo a las 6 h y se mantuvo unida durante los tres días siguientes (figura 2). Se inhibió la unión de la galectina-2 a las PBT mediante el β -galactósido lactosa, pero no sacarosa (figura 2).

La galectina-2 se une a la integrina $\beta 1$

Con el fin de estudiar en más profundidad la interacción entre la galectina-2 y las células T, los presentes inventores seleccionaron varios Acm que habían mostrado que bloqueaban la unión de la galectina-1 a líneas de células T humanas transformadas (24). Los inventores, por tanto, incubaron previamente las PBT recién aisladas con Ac que reconocían CD3, CD7 e integrina $\beta 1$ durante 1 h y añadieron después galectina-2 biotinilada durante 24 h adicionales. Cuando se determinó la unión de la galectina-2 a las células T mediante citometría de flujo, la incubación previa con el Acm bloqueante de la integrina $\beta 1$ redujo la unión de la galectina-2 a las células T en un $48,2 \pm 9,4\%$, mientras que al contrario que la galectina-1 (24), CD3 y CD7 no lograron inhibir la unión de la galectina-2 a las células T. (figura 3a).

Para aislar directamente los complejos que contienen galectina-2, los inventores realizaron inmunoprecipitación usando perlas magnéticas activadas con tosilo. Se recubrieron las perlas con galectina-1, galectina-2, o BSA durante 24 h y después se incubaron con células T purificadas. Tras la inmunoprecipitación, se inmunotransfirieron los lisados celulares frente a CD3, CD7 e integrina $\beta 1$. Tal como se muestra en la figura 3b, la galectina-1 se une a CD3, CD7, y $\beta 1$, mientras que la galectina-2 sólo se une a $\beta 1$, pero no a CD3 o CD7.

Inducción de la apoptosis de las células T mediante galectina-2

Las galectinas tienen una variedad de efectos moduladores en las células T y pueden inducir, pero también inhibir la apoptosis de las células T (25, 26). Ya que no se sabe si la galectina-2 modula la apoptosis de las células T, lo inventores evaluaron en primer lugar si la galectina-2 induce la exposición superficial de fosfatidilserina, tal como se midió mediante tinción con anexina-V, en PBT activadas y sin activar. Cuando se cultivaron las PBT en presencia de 0, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de galectina-2, pero sin estimulación celular, la galectina-2 no logró inducir la apoptosis de las células T (figura 4). Al contrario, cuando se activaron las PBT mediante Acm anti-CD3, la galectina-2 indujo una apoptosis dependiente de la dosis, pero también, si bien es cierto que en un menor grado, la necrosis de las células T (figura 4). A diferencia de esto, el inmunosupresor tacrolimus (FK506), que se usa normalmente para prevenir el rechazo de órganos tras el trasplante allogénico de riñones e hígados y para tratar las enfermedades inflamatorias del intestino resistentes en pacientes seleccionados, no hace distinción entre células T estimuladas y no estimuladas e induce principalmente necrosis (figura 12) provocando así posibles efectos septicémicos. El porcentaje de apoptosis de las células T inducido por galectina-2 fue mayor que el inducido por galectina-1 (figura 4), y fue comparable en poblaciones de células T CD4 y CD8 positivas (datos no mostrados). Para examinar la necesidad de la síntesis de proteínas de *novo* para la muerte celular inducida por galectina-2, se expusieron las células a 0, 10, y 1000 nM de ciclofosfamida, un inhibidor de la síntesis de proteínas (véase Kashio, Y., K. Nakamura, M. J. Abedin, M. Seki, N. Nishi, N. Yoshida, T. Nakamura, y M. Hirashima. 2003. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. J. Immunol. 170:3631), en presencia y ausencia de galectina-2. Además, los inventores examinaron el efecto de la lactosa sobre la capacidad de la galectina-2 para inducir apoptosis. Mientras que la ciclofosfamida no logró modular la muerte de células T inducida por galectina-2 (datos no mostrados), se inhibió ampliamente la apoptosis mediante lactosa 50 mM, pero no mediante sacarosa.

La apoptosis mediada por galectina-2 es dependiente de caspasa-3 y caspasa-9

Habiendo establecido que la galectina-2 induce la apoptosis de las células T, los inventores se interesaron en evaluar las rutas apoptóticas usadas por la galectina-2. Por tanto, midieron las actividades caspasa en PBT tratadas con galectina-2, activadas con anti-CD3 usando ensayos de sustratos fluorogénicos. Cuando se activaron las PBT mediante la ruta de CD3, la galectina-2 indujo un aumento significativo en la actividad de la caspasa-3 y la caspasa-9, pero no de la caspasa-8 (figura 5a). Para evaluar la importancia funcional de este hallazgo, los inventores evaluaron el efecto de la inhibición de la caspasa sobre la apoptosis de las células T inducida por galectina-2. Se evaluaron los inhibidores de caspasa tanto específicos como de amplio espectro, y todos contenían fluorometilcetona (fmk), que hace que el efecto inhibidor sea irreversible (todos usados a 50 μM). La inhibición de la caspasa-1 (zYVAD) y la caspasa-8 (zIETD) no tuvo efecto sobre la apoptosis de las células T inducida por galectina-2. Por el contrario, los inhibidores de caspasa-3 (zDEVD), caspasa-9 (zLEHD) y de amplio espectro (zVAD) inhibieron significativamente la muerte celular inducida por galectina-2 (figura 5b). Puesto que se ha demostrado que la galectina-1 monomérica aumenta tanto la actividad de la caspasa-8 como de la caspasa-9 (27), y que la galectina 9 de tipo de repetición en tándem induce apoptosis mediante caspasa-1, pero no caspasa-8 o caspasa-9 (28), los inventores también evaluaron el efecto de la galectina-7, una galectina prototipo monomérica como la galectina-2 (2), sobre la apoptosis de las células T. Aunque la galectina-7

indujo una apoptosis de las PBT comparable a la galectina-2, la incubación previa con zVAD, zDEVD, y zIETD, pero no con zLEHD inhibió la muerte celular mediada por galectina-7, lo que indica que la galectina-7 media la apoptosis de las células T mediante caspasa-3 y caspasa-8, pero no caspasa-9 (figura 5b). Habiendo documentado el patrón de activación de caspasas mediante gal-2, los inventores procedieron a incluir gal-1 en alícuotas de las preparaciones celulares de manera comparativa. La capacidad de zVAD para reducir la muerte celular inducida por gal-1 proporcionó pruebas de que las caspasas están implicadas en la apoptosis mediada por gal-1 (figura 5B). Una diferencia llamativa fue el marcado efecto del inhibidor de caspasa-8 (figura 5B). La apoptosis inducida por gal-1, por tanto, tiene su propio perfil con implicación de las caspasas-3, 8 y 9. Los ensayos con gal-7, otra galectina prototipo homodimérica, revelaron de forma similar la actividad proapoptótica de las células T estimuladas. La inhibición de las caspasas-1, 3 y 8, pero no de la caspasa-9, redujo su grado (véase anteriormente). Evidentemente, la implicación de las caspasas es distinta entre los subgrupos de prototipos de galectinas, asegurando un estudio adicional. Aquí, los presentes inventores se centran en la ruta de la inducción de la apoptosis de gal-2. Con la caspasa-9 como mediador implicado de la respuesta determinada por la exposición a gal-2, parece probable que la gal-2 hace uso de la ruta intrínseca, una sugerencia que puede someterse a prueba mediante la comprobación del potencial de membrana mitocondrial. Así, los inventores procedieron seguidamente a analizar este parámetro aprovechando la redistribución de la rodamina 123.

La apoptosis mediada por galectina-2 es dependiente de caspasa-3 y caspasa-9

La galectina-2 induce la actividad de la caspasa-3 y la caspasa-9, pero no caspasa-8 (A). Se incubaron las células en presencia o ausencia de 50 µg/ml de galectina-2 durante 24 h y se evaluó la actividad de las caspasas mediante citometría de flujo tal como se describió en Materiales y Procedimientos. Los diagramas ilustrados son representativos de cuatro experimentos independientes que dieron resultados similares. El inhibidor de caspasas de amplio espectro zVAD y el inhibidor de caspasa-3 (zDEVD) alteran la actividad de las galectinas-2, 7 y 1 para inducir muerte celular. El inhibidor de caspasa-1 zYVAD sólo bloqueó la muerte celular inducida por gal-7, mientras que el inhibidor de caspasa-9 zLEHD bloqueó la apoptosis inducida por gal-2 y gal-1. El inhibidor de caspasa-8 zIETD bloqueó la muerte celular inducida por galectina-7 y galectina-1 (B). Los datos representan la media ± EEM de cuatro series independientes de experimentos. *p<0,05 para el aumento frente a ausencia de galectina; *p<0,05 para la disminución frente a la galectina.

La galectina-2 modifica la razón bax/bcl y altera el potencial de membrana mitocondrial

Los acontecimientos críticos para la apoptosis incluyen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que da como resultado la liberación del citocromo c y la escisión de la caspasa-9 (29). Habiendo establecido que la galectina-2 induce la apoptosis de las células T mediante la caspasa-9, los inventores quisieron examinar después si la galectina-2 altera el potencial de la membrana mitocondrial, libera el citocromo c y por tanto, usa la ruta apoptótica "intrínseca". Para investigar esta posibilidad, los inventores usaron la redistribución del colorante rodamina 123, un catión lipófilo que se acumula en la membrana mitocondrial. Cuando se activaron las PBT mediante la ruta de CD3 en presencia de 50 µg/ml de galectina-2, se encontró un claro descenso en el potencial de polarización mitocondrial en comparación con células cultivadas en ausencia de galectina-2 (figura 6a). Además, la galectina-2 aumentó la liberación de citocromo c de manera dependiente de la dosis en células T activadas, pero no en células T en reposo (datos no mostrados). La apoptosis y la supervivencia también están reguladas por el equilibrio relativo de los miembros de la familia de Bcl-2 proapoptóticos y antiapoptóticos. Además, puesto que la proteína bax forma canales conductores de iones en las bicapas lipídicas de la mitocondria, y por tanto desempeña un papel principal en la ruta mitocondrial de la apoptosis (30), los inventores investigaron si la galectina-2 modula la expresión proteica de las proteínas anti-apoptóticas bcl-2 y la pro-apoptótica bax en las células T. La inmunotransferencia y la citometría de flujo revelaron que la galectina-2 reduce significativamente bcl-2, pero aumenta la expresión proteica de bax, dando como resultado una razón bcl-2/bax inferior (figura 6b y c). Se ha publicado recientemente que la galectina-1 induce la exposición superficial de fosfatidilserina sin inducir apoptosis (31), sin embargo otros grupos no pudieron confirmar este hallazgo en otros tipos celulares (32, 33). Para aclarar esta discrepancia con respecto a la galectina-2 y las PBT, los inventores analizaron las rutas posteriores a la escisión de la caspasa-3 en las células T. La inmunotransferencia reveló que la galectina-2 reguló por incremento el factor de fragmentación del ADN (DFF) de manera dependiente de la dosis (figura 6c), que se escinde proteolíticamente mediante la caspasa-3 e induce la fragmentación del ADN de manera irreversible y por tanto, la muerte celular (34). Estos datos se confirmaron mediante tinción con DAPI, lo que demuestra que 25 y 50 µg de galectina-2 inducen fragmentación nuclear (datos no mostrados) y se confirmó la ejecución de la apoptosis por galectina-2.

La galectina-2 no modula el ciclo de las células PBT

Las células T en reposo están protegidas de la muerte celular inducida por antígeno y por tanto, la apoptosis y el ciclo celular están íntimamente relacionados entre sí (35-37). Se sabe que la galectina-1 inhibe la proliferación de timocitos y de hibridoma de células T murinas (38). Para evaluar la cuestión, si la galectina-2 modula el ciclo de las células T, los inventores realizaron un análisis de los perfiles del ciclo de las PBT en respuesta a la galectina-2, usando tinción del ADN. Cuando se selecciona la fracción de células vivas, la distribución de la fase del ciclo celular fue comparable en las PBT activadas con anti-CD3 cultivadas en ausencia o presencia de galectina-2 25, 50, y 100 µg/ml (figura 7a). Los presentes inventores investigaron después si la galectina-2 modula los niveles de las moléculas reguladoras clave responsables del inicio y avance de cada fase del ciclo celular. Tal como se determinó mediante análisis de inmunotransferencia de tipo western, la galectina-2 no alteró los niveles proteicos de los promotores de ciclo celular ciclina D2, proteína de retinoblastoma (Rb), o ciclina A, ni de los inhibidores de ciclo celular 21, p27, y

p53 (figura 7b). Para determinar si este efecto es distinto para la galectina-2, los inventores también examinaron los efectos de las galectinas-1, 2, y 7 sobre la expresión de la ciclina B1 mediante citometría de flujo junto con tinción con PI para cuantificar de manera exacta la progresión del ciclo celular hacia la fase G2/M. Cuando se activaron las PBT con Acm anti-CD3 y se incubaron en presencia de galectina-1 o galectina-7, la expresión de la ciclina B1 cayó significativamente de manera dependiente de la dosis desde el 8% hasta el 1% y desde el 7% hasta el 1%, respectivamente (figura 8). Al contrario, la galectina-2 no inhibió la progresión del ciclo celular de las PBT, tal como se demostró mediante los niveles de ciclina B1 inalterados (figura 8).

La galectina-2 modula la expresión de integrinas y la adhesión celular

Las galectinas actúan como moduladores de la adhesión celular mediante la interacción con las proteínas glucosiladas apropiadas en la superficie celular o dentro de la matriz extracelular (MEC) (39). Esta interacción está mediada por integrinas y ya que los inventores demostraron anteriormente, que la galectina-2 se une a la integrina $\beta 1$, los inventores quisieron determinar si la galectina-2 altera la expresión de integrinas en las células T. Cuando se activan las PBT mediante la ruta de CD3, las galectinas-1 y 2 regularon por disminución la expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ (figura 9). En contraposición, ni la galectina-1 ni la galectina-2 cambiaron la expresión de la integrina $\beta 4$, responsable de la migración de las células T hacia la lámina propia intestinal, y regularon por incremento levemente la expresión de la integrina $\alpha 5$, lo que indica que las galectinas regulan la expresión de integrinas de manera distinta. Resulta interesante que cuando se examinaron las células T intestinales como fuente de células T memoria, la galectina-2 no logró modular la expresión de la integrina $\beta 1$, lo que indica que la capacidad de la galectina-2 para afectar a la expresión de integrinas no sólo es distinta para las integrinas individuales, sino también para la diferenciación celular (figura 9).

Las galectinas modulan de manera distinta la adhesión de las células T a la matriz extracelular y la presencia de galectina-1 inhibe la adhesión de las células T a las glucoproteínas de la MEC (40, 41). Habiendo demostrado que la galectina-2 altera la expresión de integrinas de las células T, los inventores supusieron que la galectina-2 también modificaría la adherencia de las células T a los compuestos de la MEC. Cuando se activaron las PBT mediante la ruta de CD3, el $22,1 \pm 3,5\%$ y el $26,3 \pm 5,6\%$ de las células se adhirieron al colágeno tipo I o a la fibronectina, respectivamente (figura 10a). Confirmando el conocido efecto de la galectina-1 sobre la adhesión de las células T (40), la galectina-1 disminuyó sustancialmente la unión de las células T al colágeno tipo I ($9,2 \pm 3,5\%$) y a la fibronectina ($14,0 \pm 4,6\%$) (figura 10a). En contraposición, aunque la adhesión al colágeno tipo I también se redujo significativamente mediante la galectina-2 ($15,1 \pm 5,6\%$; $p < 0,05$), la adhesión a la fibronectina se potenció significativamente mediante la galectina-2 ($39,8 \pm 4,9\%$; $p < 0,05$) (figura 10a). De nuevo, los inventores analizaron la galectina-7 para verificar si esta característica es específica de la galectina-2. Tal como se representa en la figura 10a, la galectina-7 no logró alterar significativamente la adhesión de las PBT al colágeno o a la fibronectina. Tal como se mostró anteriormente, la regulación por incremento de la integrina $\beta 1$ por CD3 se inhibe mediante la galectina-2 en PBT, pero no en LPT. Sin embargo, cuando se analizó el efecto de la galectina-2 sobre la adhesión de las células T en LPT, de forma comparable a las PBT, la galectina-2 inhibió la adhesión celular al colágeno, mientras que aumentó la unión a la fibronectina ($p < 0,05$; figura 10a). Para confirmar que estos efectos estaban mediados por receptores de colágeno y fibronectina, se incubaron previamente las células durante 1 h con un subconjunto Acm específicos bloqueantes de integrinas. Tras la incubación previa, se añadieron $25 \mu\text{g/ml}$ de galectina-2 y las células se dispusieron en capas sobre pocillos recubiertos con BSA, colágeno o fibronectina. La adhesión celular al colágeno se inhibió significativamente mediante Acm frente a $\beta 1$, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mientras que la adhesión a la fibronectina se bloqueó mediante Acm frente a $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, y $\alpha 5$ (figura 10b), lo que indica que la adhesión de las células a sus respectivas matrices extracelulares estaba mediada por receptores de colágeno y fibronectina, respectivamente. Tal como se mostró anteriormente, la galectina-2 se une a $\beta 1$ (figura 3a, b). Para determinar si esta unión puede implicar a la integrina $\beta 1$ sobre la superficie celular y, por tanto, puede alterar la adhesión de las PBT a la MEC, los inventores incubaron previamente las células durante 1 h con galectina-2 y añadieron Acm frente a integrina- $\beta 1$. Después se permitió a las células adherirse sobre los compuestos de la MEC. Curiosamente, la incubación previa con galectina-2 antes de añadir el Acm frente a integrina- $\beta 1$ revirtió el efecto inhibitorio del Acm frente a la integrina $\beta 1$, cuando se añadieron en primer lugar, lo que indica que, al menos en parte, los sitios de expresión de la integrina se neutralizaron mediante galectina-2 (figura 10b).

Modelo animal de colitis

Se indujo la colitis en ratones Balb/c, de 8 a 10 semanas de edad, hembras (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) añadiendo DSS al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (sulfato de dextrano sódico (DSS) a su agua de bebida y permitiéndoles beber *ad libitum*. Se trataron grupos de ratones con 1 mg/kg PC (peso corporal) de galectina-2 por vía intraperitoneal o PBS 2 h antes de la administración de DSS. Se pesaron los ratones y se buscó hemorragia rectal y diarrea. Siete días después de la inducción de la colitis mediante DSS, se sacrificaron los ratones, se extirpó el colon completo y se midió su longitud y se pesó. Se determinó el índice de actividad de la enfermedad (DAI; es decir, la puntuación combinada de la hemorragia y la pérdida de peso) según un sistema de puntuación convencional.

El índice de actividad de la enfermedad

Pérdida de peso corporal: 0 = sin pérdida; 1 = de un 5% a un 10%; 2 = de un 10% a un 15%; 3 = de un 15% a un 20%; 4 =>20%.

Hemocultivo: 0 = sin sangre; 2 = positivo; 4 = mucha sangre.

En este experimento el DAI oscila desde 0 hasta 8. Cuanto más alta sea la puntuación del DAI, se habrá afectado el animal más gravemente con colitis.

Resultados

DAI: grupo control $6,3 \pm 2,30$ (media $\pm$ DE), n=24
 Grupo tratado con galectina $4,5 \pm 2,1$, n=10; p = 0,04

Los resultados muestran que aquellos animales tratados con galectina-2 mostraron una reducción significativa de gravedad de la colitis probando que la galectina-2 es particularmente adecuada para la prevención o el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del intestino.

Bibliografía

1. **Gabius, H.-J., S. André, H. Kaltner, and H. C. Siebert.** 2002. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta* 1572:165.
2. **Rabinovich, G. A., L. G. Baum, N. Tinari, R. Paganelli, C. Natoli, F. T. Liu, and S. Iacobelli.** 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 23:313.
3. **Cooper, D.N. and S. H. Barondes.** 1999. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 9:979.
4. **Liu, F. T.** 2000. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin. Immunol.* 97:79.
5. **Rabinovich, G. A.** 1999. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death. Differ.* 6:711.
6. **Rabinovich, G. A., N. Rubinstein, and M. A. Toscano.** 2002. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1572:274.
7. **Gitt, M. A., E. K. Jordan, and H. Leffler.** 1997. Galectin-2, Galectins-5 and -9, and Galectins-4 and -6. Trends Glycosci. *Glycotechnol.* 9:87.
8. **Lahm, H., S. André, A. Hoefflich, J. R. Fischer, B. Sordat, H. Kaltner, E. Wolf, and H.-J. Gabius.** 2001. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127:375.
9. **Oka, T., S. Murakami, Y. Arata, J. Hirabayashi, K. Kasai, Y. Wada, and M. Futai.** 1999. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch. Biochem. Biophys.* 361:195.
10. **Marschal, P., V. Cannon, S. H. Barondes, and D. N. Cooper.** 1994. *Xenopus laevis* L-14 lectin is expressed in a typical pattern in the adult, but is absent from embryonic tissues. *Glycobiology* 4:297.
11. **Balomenos, D. and A. Martinez.** 2000. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol. Today* 21:551.
12. **Lenardo, M., K. M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, and L. Zheng.** 1999. Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 17:221-53.:221.
13. **Sherr, C. J. and J. M. Roberts.** 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501.
14. **Kaltner, H. and B. Stierstorfer.** 1998. Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat (Basel)* 161:162.
15. **Boudreau, N. J. and P. L. Jones.** 1999. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.* 339:481.
16. **Hemler, M. E.** 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8:365-400.:365.
17. **Shimizu, Y., G. A. van Seventer, K. J. Horgan, and S. Shaw.** 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345:250.

18. **Moiseeva, E. P., B. Williams, A. H. Goodall, and N. J. Samani.** 2003. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:1010.
19. **Brandtzaeg, P., I. N. Farstad, and G. Haraldsen.** 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* 20:267.
20. **Furtak, V., F. Hatcher, and J. Ochieng.** 2001. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:845.
21. **Sturm, A., J. Itoh, J. W. Jacobberger, and C. Fiocchi.** 2002. p53 negatively regulates intestinal immunity by delaying mucosal T cell cycling. *J. Clin. Invest* 109:1481.
22. **Toescu, E. C. and A. Verkhratsky.** 2000. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. *Pflugers Arch.* 440:941.
23. **Scaduto, R. C., Jr. and L. W. Grotyohann.** 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.* 76:469.
24. **Pace, K. E., C. Lee, P. L. Stewart, and L. G. Baum.** 1999. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol* 163:3801.
25. **Perillo, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer, and L. G. Baum.** 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736.
26. **Yang, R. Y., D. K. Hsu, and F. T. Liu.** 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:6737.
27. **Santucci, L., S. Fiorucci, N. Rubinstein, A. Mencarelli, B. Palazzetti, B. Federici, G. A. Rabinovich, and A. Morelli.** 2003. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124:1381.
28. **Kashio, Y., K. Nakamura, M. J. Abedin, M. Seki, N. Nishi, N. Yoshida, T. Nakamura, and M. Hirashima.** 2003. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J. Immunol.* 170:3631.
29. **Hengartner, M. O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770.
30. **Kroemer, G.** 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:433.
31. **Dias-Baruffi, M., H. Zhu, M. Cho, S. Karmakar, R. P. McEver, and R. D. Cummings.** 2003. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278:41282.
32. **Rabinovich, G. A., G. Daly, H. Dreja, H. Tailor, C. M. Riera, J. Hirabayashi, and Y. Chernajovsky.** 1999. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 190:385.
33. **Rabinovich, G. A., M. M. Iglesias, N. M. Modesti, L. F. Castagna, C. Wolfenstein-Todel, C. M. Riera, and C. E. Sotomayor.** 1998. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J. Immunol.* 160:4831.
34. **Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang.** 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175.
35. **Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer.** 1999. Cell death in development. *Cell* 96:245.
36. **King, K. L. and J. A. Cidlowski.** 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell Biochem.* 58:175.
37. **Boehme, S. A. and M. J. Lenardo.** 1993. Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* 23:1552.
38. **Vespa, G. N., L. A. Lewis, K. R. Kozak, M. Moran, J. T. Nguyen, L. G. Baum, and M. C. Miceli.** 1999. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 162:799.
39. **Hughes, R. C.** 2001. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83:667.

40. **Rabinovich, G. A., A. Ariel, R. Hershkovich, J. Hirabayashi, K. I. Kasai, and O. Lider.** 1999. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin- 1. *Immunology* 97:100.
- 5 41. **Cooper, D. N.** 1997. Galectin-1: secretion and modulation of cell interactions with laminin. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9:57.
42. **Fiocchi, C.** 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182.
- 10 43. **Santucci, L., S. Fiorucci, F. Cammilleri, G. Servillo, B. Federici, and A. Morelli.** 2000. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31:399.
44. **Yang, R. Y. and F. T. Liu.** 2003. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* 60:267.
- 15 45. **André, S., S. Kojima, N. Yamazaki, C. Fink, H. Kaltner, K. Kayser, and H.-J. Gabius.** 1999. Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125:461.
- 20 46. **Targan, S. R., S. B. Hanauer, S. J. van Deventer, L. Mayer, D. H. Present, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible, and P. J. Rutgeerts.** 1997. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 337:1029.
- 25 47. **Elliott, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, J. R. Kalden, C. Antoni, J. S. Smolen, B. Leeb, F. C. Breedveld, J. D. Macfarlane, H. Bijl, and.** 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344:1105.
- 30 48. **Perillo, N. L., C. H. Uittenbogaart, J. T. Nguyen, and L. G. Baum.** 1997. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* 185:1851.
49. **Rappl, G., H. Abken, J. M. Muche, W. Sterry, W. Tilgen, S. André, H. Kaltner, S. Ugurel, H.-J. Gabius, and U. Reinhold.** 2002. CD4+CD7- leukemic T cells from patients with Sezary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia* 16:840.
- 35 50. **Tschiyama, Y., J. Wada, H. Zhang, Y. Morita, K. Hiragushi, K. Hida, K. Shikata, M. Yamamura, Y. S. Kanwar, and H. Makino.** 2000. Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats. *Kidney Int.* 58:1941.
- 40 51. **Lenardo, M. J.** 1997. The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. *Semin. Immunol.* 9:1.
52. **Adams, J. M. and S. Cory.** 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322.
53. **Ina, K., J. Itoh, K. Fukushima, K. Kusugami, T. Yamaguchi, K. Kyokane, A. Imada, D. G. Binion, A. Musso, G. A. West, G. M. Dobrea, T. S. McCormick, E. G. Lapetina, A. D. Levine, C. A. Ottaway, and C. Fiocchi.** 1999. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J. Immunol.* 163:1081.
- 45 54. **Wesselborg, S., O. Janssens, and D. Kabelitz.** 1993. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 150:4338.
- 50 55. **Inohara, H., S. Akahani, and A. Raz.** 1998. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp. Cell Res.* 245:294.
56. **Sramkoski, R. M., S. W. Wormsley, W. E. Bolton, D. C. Crumpler, and J. W. Jacobberger.** 1999. Simultaneous detection of cyclin B1, p105, and DNA content provides complete cell cycle phase fraction analysis of cells that endoreduplicate. *Cytometry* 35:274.
- 55 57. **Springer, T. A.** 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425.
58. **Springer, T. A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301.
- 60 59. **Schwartz, M. A., M. D. Schaller, and M. H. Ginsberg.** 1995. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:549-99.:549.
- 60 60. **Dailey, M. O.** 1998. Expression of T lymphocyte adhesion molecules: regulation during antigen-induced T cell activation and differentiation. *Crit Rev. Immunol.* 18:153.

ES 2 282 750 T3

61. **Zell, T.W. J. Kivens, S. A. Kellermann, and Y. Shimizu. 1999.** Regulation of integrin function by T cell activation: points of convergence and divergence. *Immunol. Res.* 20:127.

62. **Brewer, C. F. 2002.** Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572:255.

63. **Kuwabara, I. and F. T. Liu. 1996.** Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J. Immunol.* 156:3939.

64. **Ochieng, J., M. L. Leite-Browning, and P. Warfield. 1998.** Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:788.

REIVINDICACIONES

1. El uso de galectina-2 o de un ácido nucleico que codifica para galectina-2 o de su hebra complementaria, o de un ácido nucleico que hibrida con tal ácido nucleico codificante o su hebra complementaria, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad con apoptosis alterada de células T, en la que dicha enfermedad con apoptosis alterada de células T se selecciona del grupo que comprende enfermedades autoinmunitarias y enfermedades de células T tumorales.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha apoptosis alterada, en particular dicha apoptosis alterada de células T está implicada en o asociada con la patogenia de dicha enfermedad.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas enfermedades autoinmunitarias se seleccionan del grupo que comprende artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso, esclerodermia, hepatitis autoinmunitaria y nefritis autoinmunitaria.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas enfermedades de células T tumorales se seleccionan del grupo que comprende linfomas T no-Hodgkin periféricos y linfoblásticos/nodales y extranodales.

5. Uso según la reivindicación 3, en el que dichas enfermedades inflamatorias del intestino son la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa o colitis indeterminada.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn.

7. Uso según la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 es galectina-2 humana o de rata.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en combinación con un agente que inhibe la proliferación de las células T y/o un agente que induce la apoptosis de células T.

11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho agente que inhibe la proliferación de las células T se selecciona del grupo que comprende esteroides, macrólidos, tales como ciclosporina y rapamicina, tacrolimus, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato y ciclofosfamida.

12. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho agente que induce la apoptosis de las células T se selecciona del grupo que comprende anticuerpo anti-TNF α (infiximab, adalimumab y CDP 870), etanercept, leflunamida, natalizumab (Acm anti-Integrina $\alpha4\beta7$), visilizumab (Acm anti-CD3).

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en combinación con un fármaco que induce la apoptosis de las células T mediante una ruta dependiente de caspasa-8, o en el que dicha galectina-2 ha de administrarse a un paciente que no muestra o no ha mostrado una respuesta perceptible a un fármaco que se sabe que normalmente induce apoptosis de las células T mediante una ruta dependiente de caspasa-8.

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en combinación con fármacos antiinflamatorios tales como 5-aminosalicilatos (5-ASA), mesalazina, olsalazina, balsalazina, sulfapiridina y agente antiinflamatorio no esteroideo y/o un agente antirreumático.

15. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho agente antirreumático es un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD).

16. Uso según la reivindicación 15, en el que dicho fármaco antirreumático modificador de la enfermedad se selecciona del grupo que comprende aspirina, naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno, naprosina, indometacina, piroxicam y fármacos biológicos seleccionados del grupo que comprende anakinra y etodolac.

17. Uso según la reivindicación 15, en el que dicho agente antirreumático se selecciona del grupo que comprende compuestos de oro, D-penicilamina, fármacos antimalaria tales como cloroquina, y sulfasalazina.

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en combinación con inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (inhibidores de la COX-2).

ES 2 282 750 T3

19. Uso según la reivindicación 18, en el que dichos inhibidores de la ciclooxigenasa-2 se seleccionan del grupo que comprende celecoxib, rofecoxib y valdecoxib.

5 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en combinación con un agente activador de células T.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en combinación con un β -galactósido.

10 22. Uso según la reivindicación 21, en el que dicho β -galactósido es lactosa.

23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse mediante administración sistémica y/o administración tópica.

15 24. Uso según la reivindicación 23, en el que dicha administración se produce mediante ingestión, preferiblemente por vía oral o anal, y/o mediante inyección, preferiblemente mediante inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y/o mediante aplicación nasal.

20 25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse como enema y/o como supositorio y/o como forma farmacéutica de liberación sostenida, por ejemplo, encapsulada en una matriz de liberación dependiente de pH.

25 26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23-25, en el que dicha galectina-2 ha de administrarse en una forma pegilada o no pegilada o como mezcla de ambas formas.

30 27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho paciente es uno que tiene un estado patológico en el que, antes de la administración de galectina-2, un subconjunto de las células T del paciente y/o un subconjunto de macrófagos del paciente y/o un subconjunto de células presentadoras de antígenos del paciente no experimentan apoptosis, preferiblemente apoptosis adecuada o en el que un subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos del paciente muestran una apoptosis alterada o defectuosa.

35 28. Uso según la reivindicación 27, en el que dicho subconjunto de células T son células T que se han activado previamente, preferiblemente mediante la ruta de CD3 o la ruta de CD2 o mediante mitógenos, moléculas coestimuladoras tales como CD28 o CD40, u otras rutas tales como receptores de tipo Toll o integrinas.

29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 27-28, en el que dicho subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos no están en reposo.

40 30. Uso según la reivindicación 29, en el que dicho subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígenos no son células que han salido del ciclo celular o no son células que están detenidas en cualquier fase del ciclo celular.

45 31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 27-30, en el que dicho subconjunto de células T y/o macrófagos y/o células presentadoras de antígeno se ubican principalmente en dichas articulaciones del paciente, preferiblemente en articulaciones sinoviales, y/o en el tracto gastrointestinal de dicho paciente, preferiblemente en el revestimiento de dicho tracto gastrointestinal, y/o piel, y/o pulmón y/o hígado y/o riñón de dicho paciente y/o son una población de células sanguíneas periféricas que se reclutan en una mucosa durante la inflamación.

50 32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho paciente es uno que tiene un estado patológico en el que, antes de la administración de galectina-2, la razón entre la proteína Bcl-2 y la proteína Bax en células T está desequilibrada a favor de la Bcl-2 antiapoptótica.

55

60

65

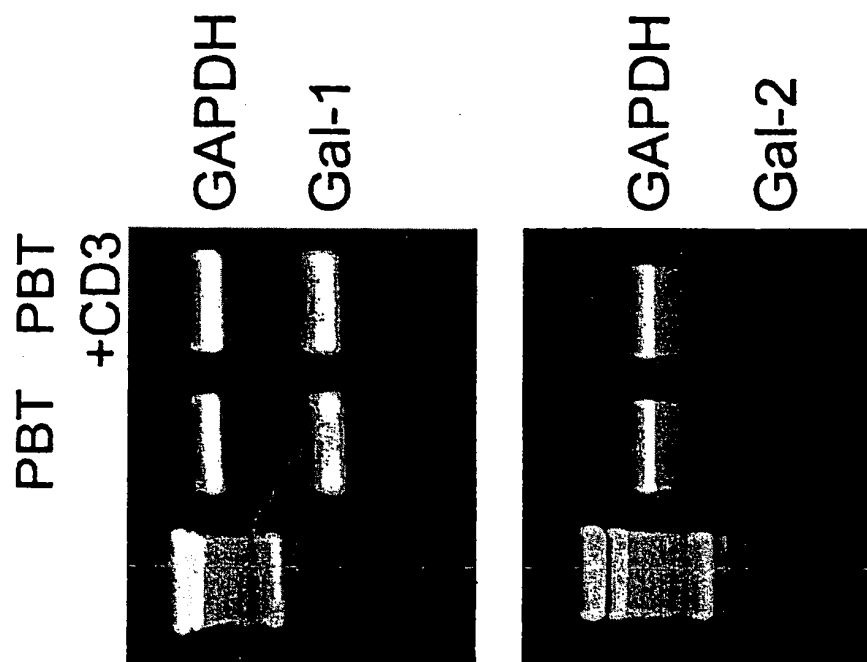
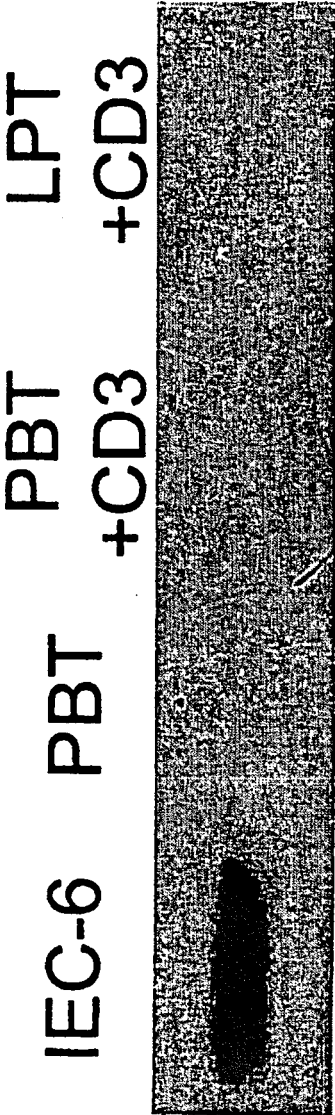
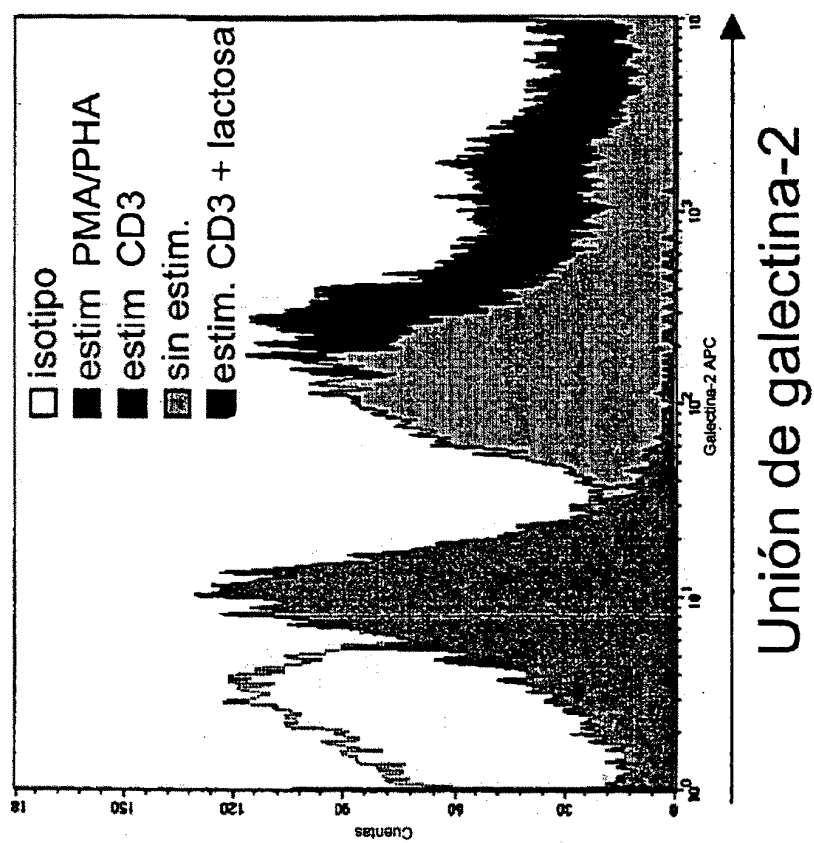


Figura 1A



Anti-Galectina-2

Figura 1B



Unión de galectina-2

Figura 2

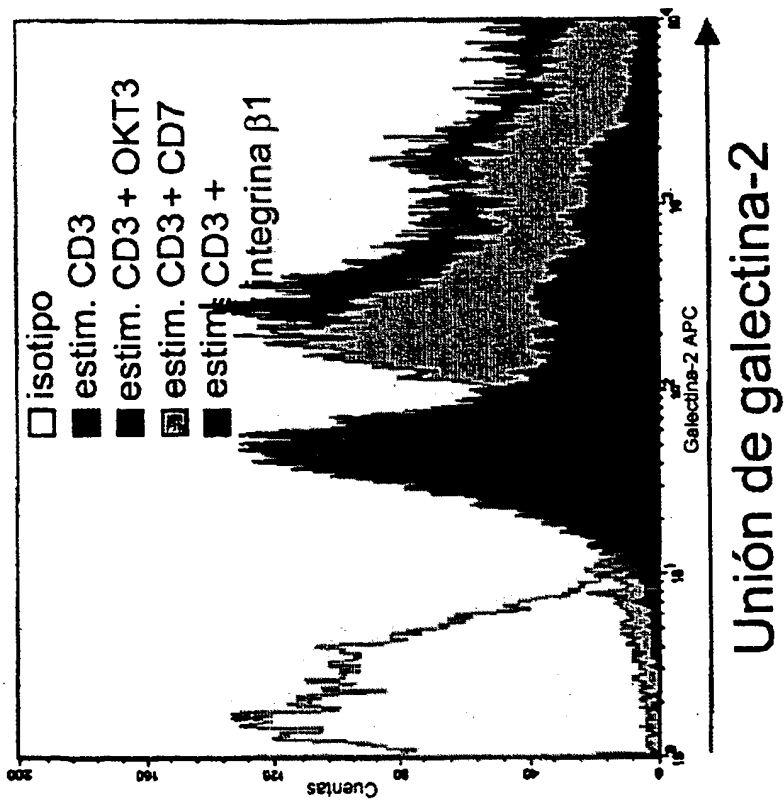


Figura 3A

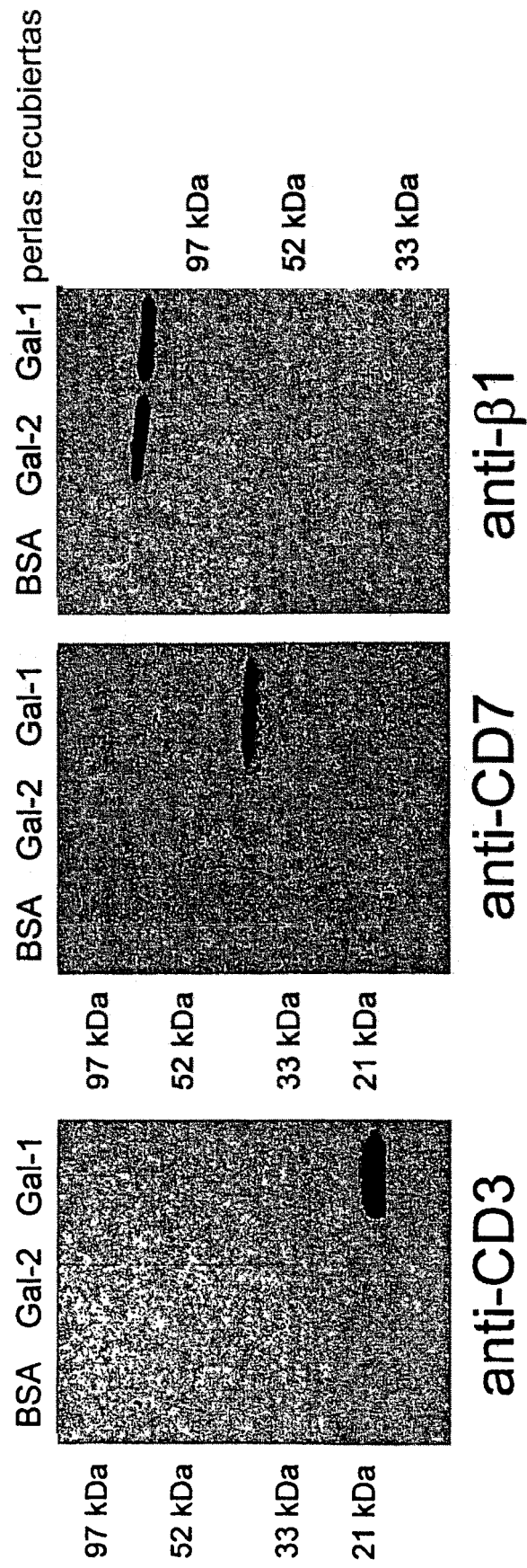


Figura 3B

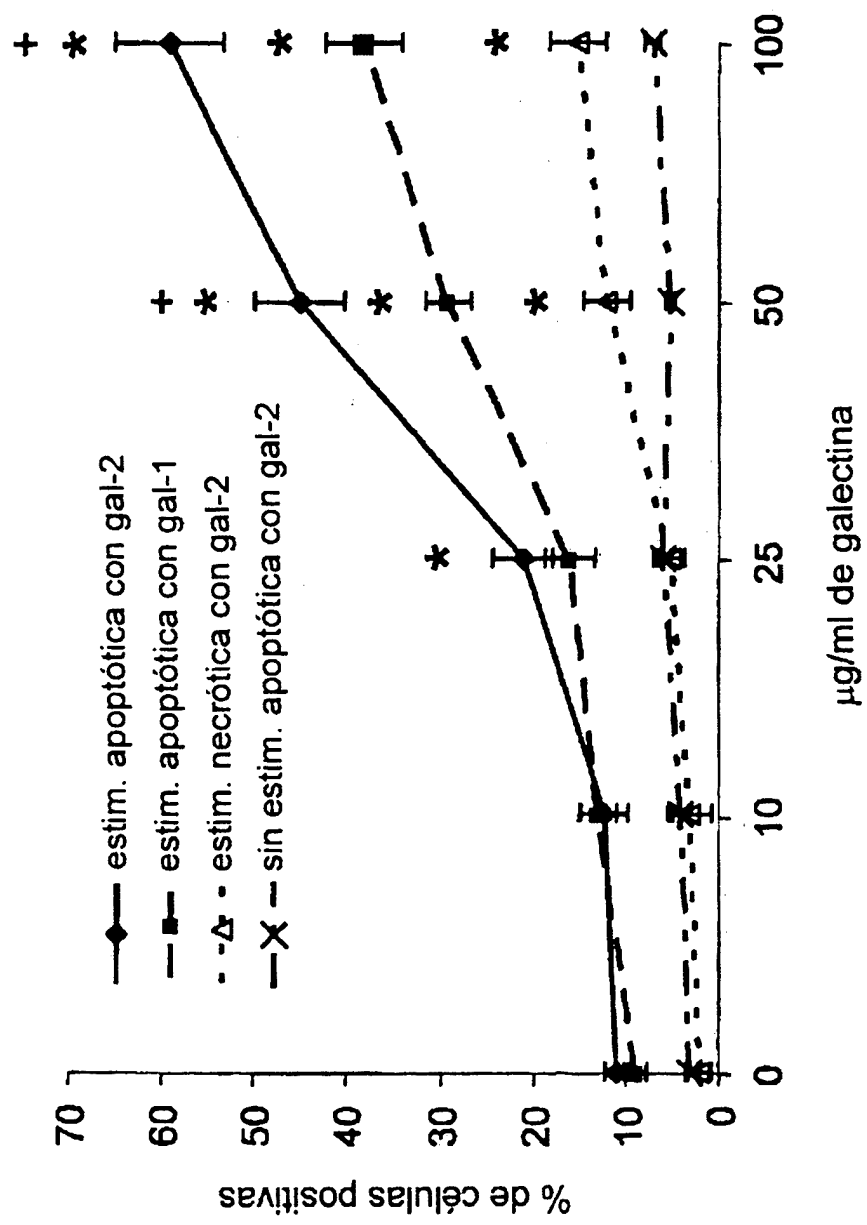


Figura 4

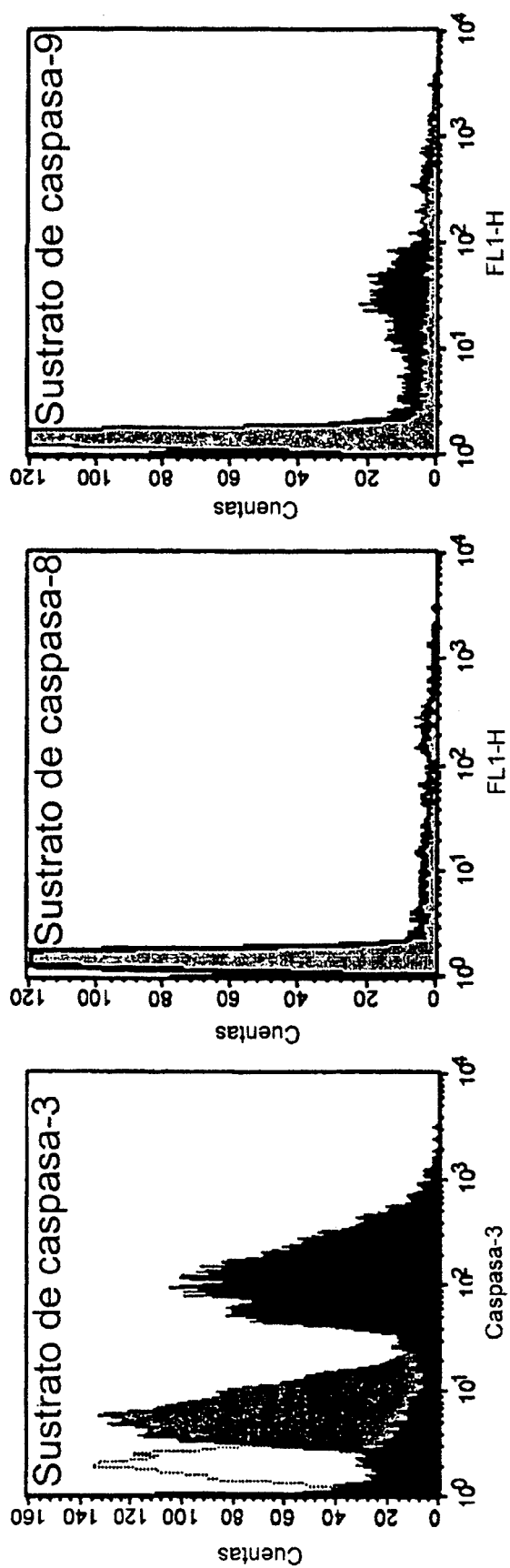


Figura 5A

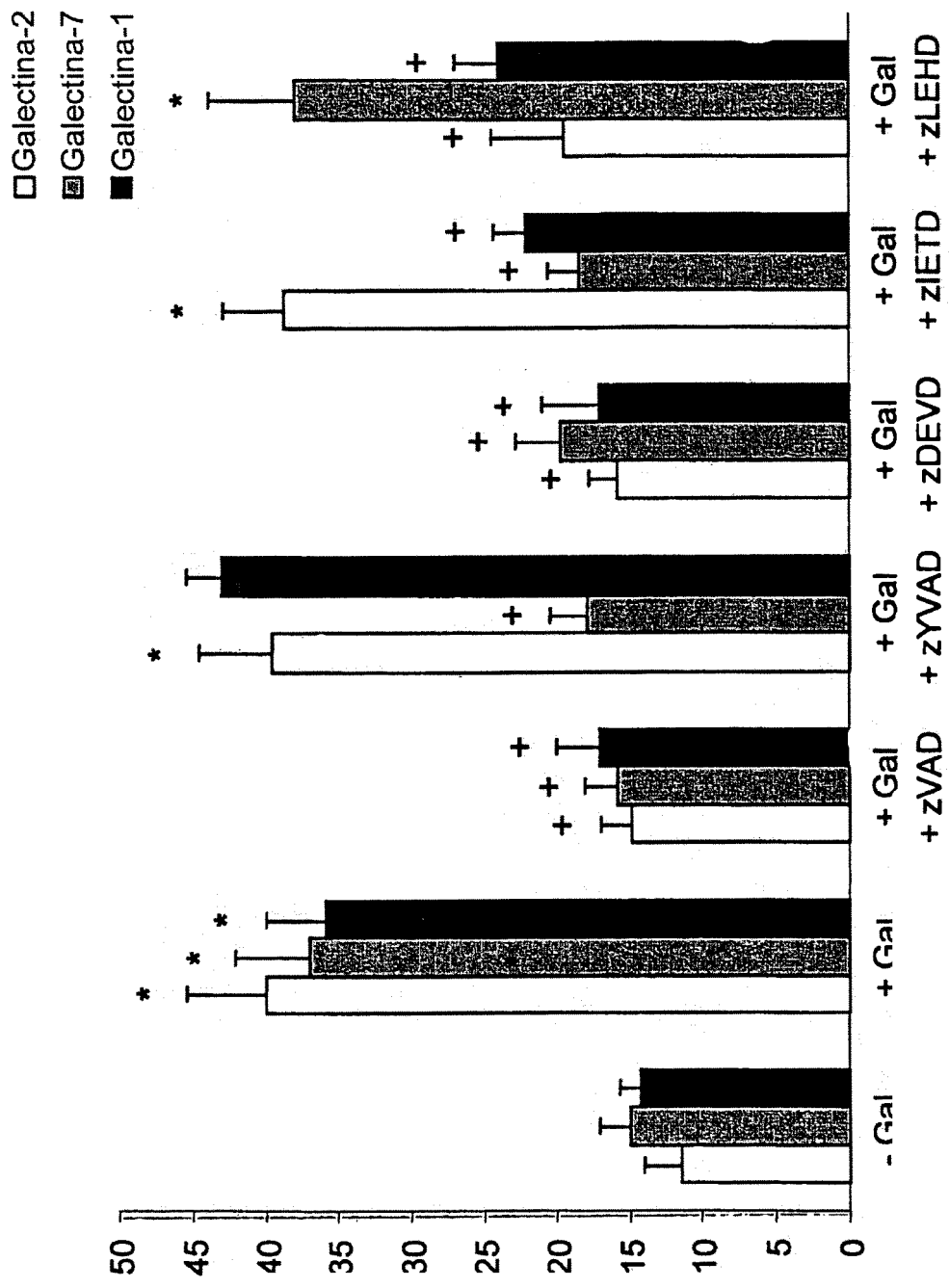


Figura 5B

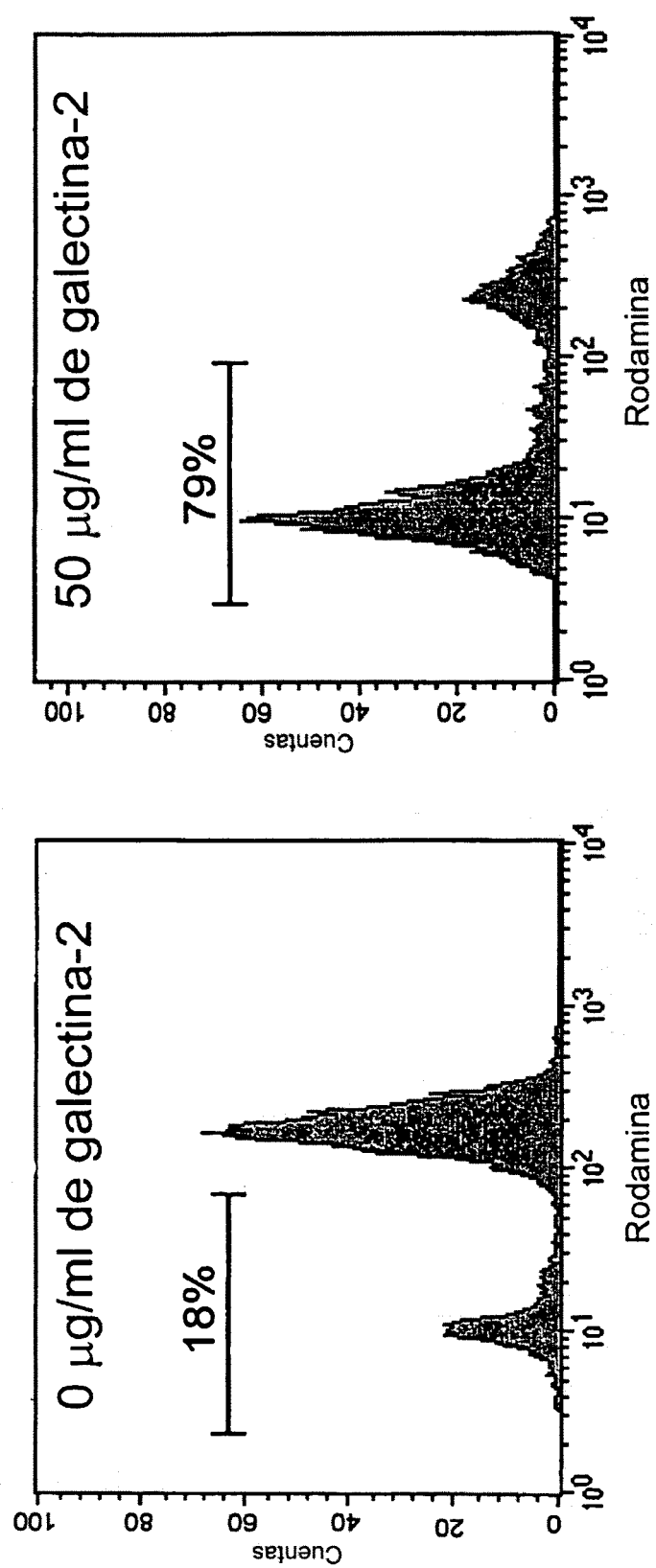


Figura 6A

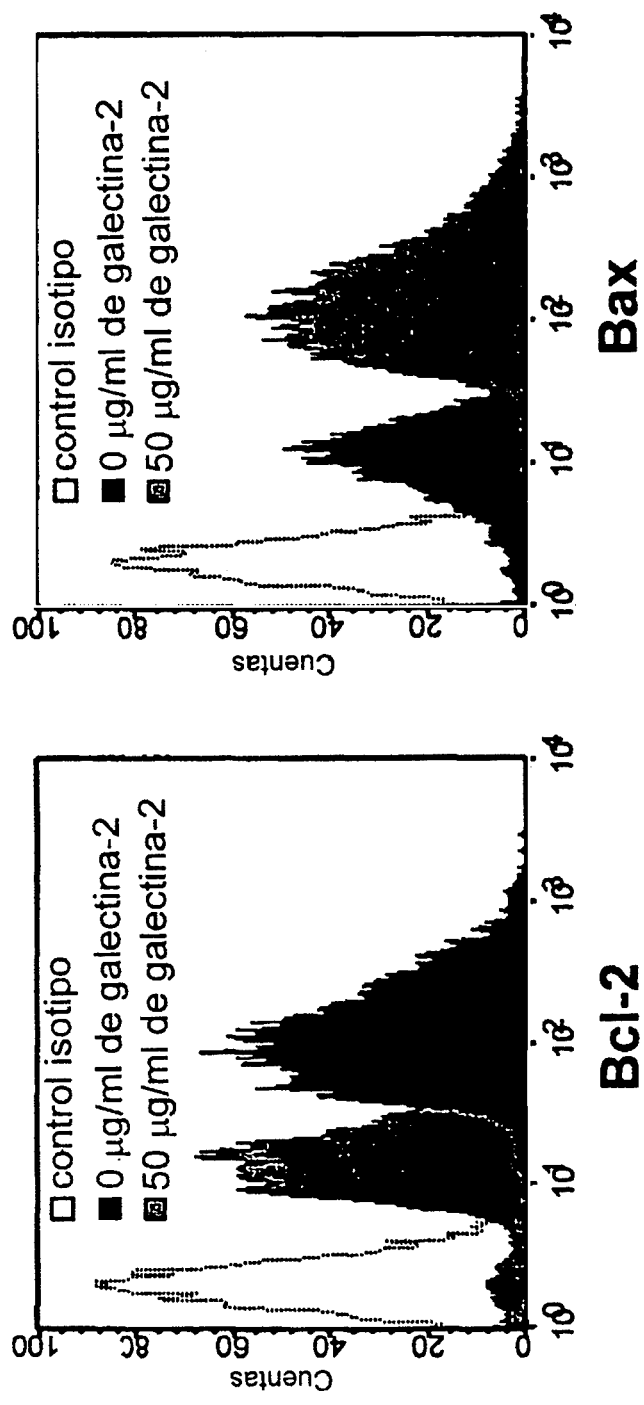


Figura 6B

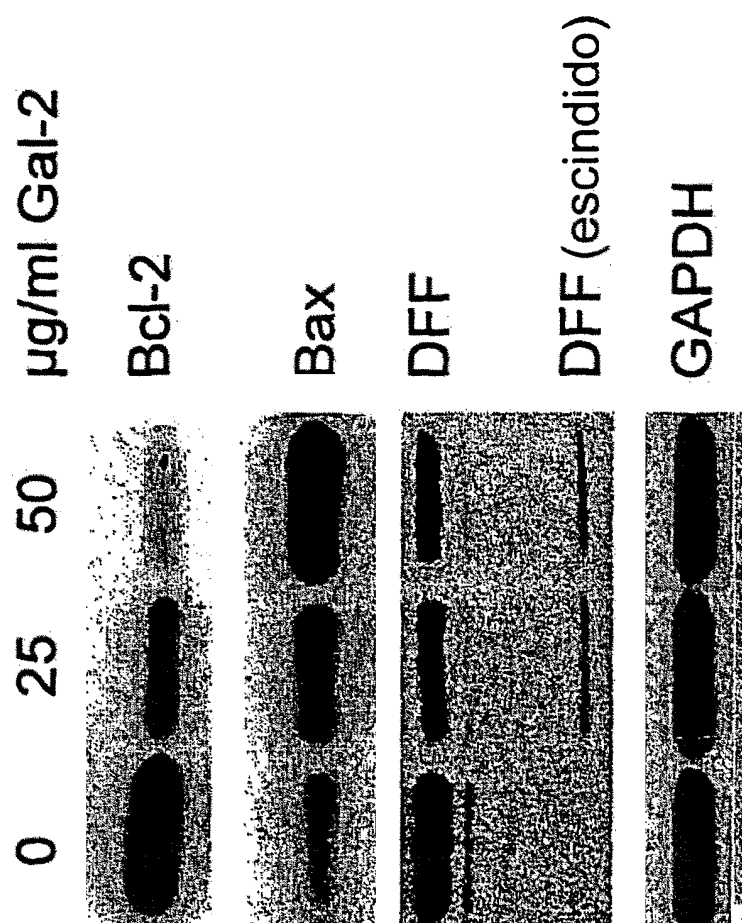


Figura 6C

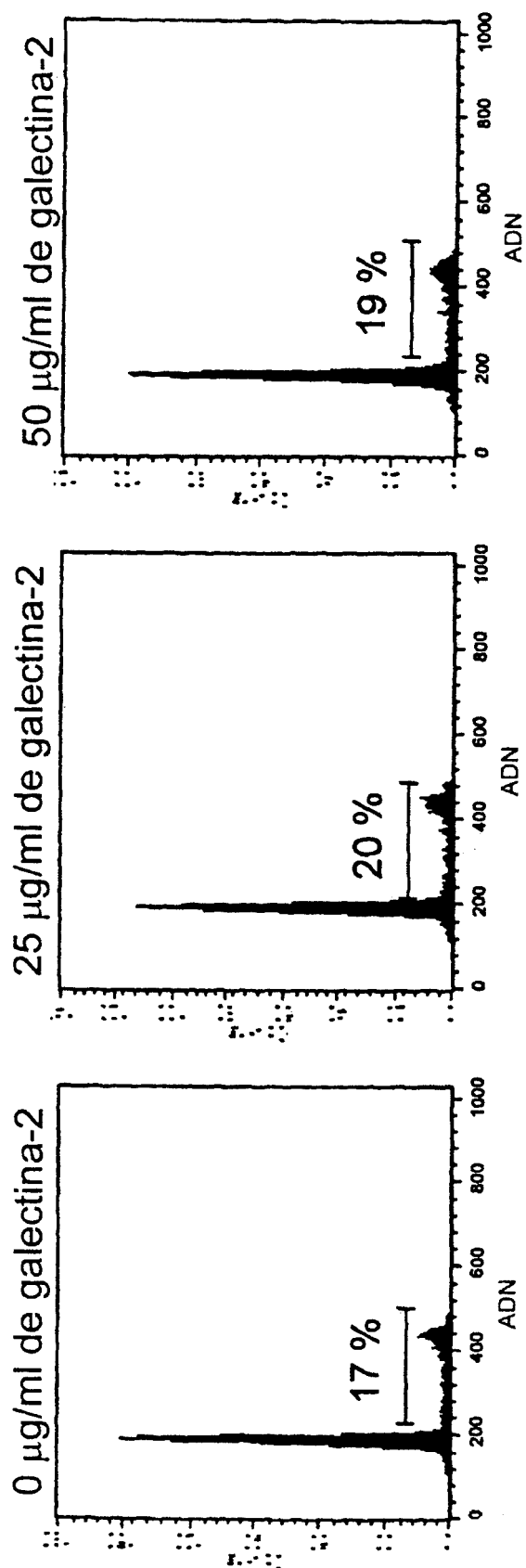


Figura 7A

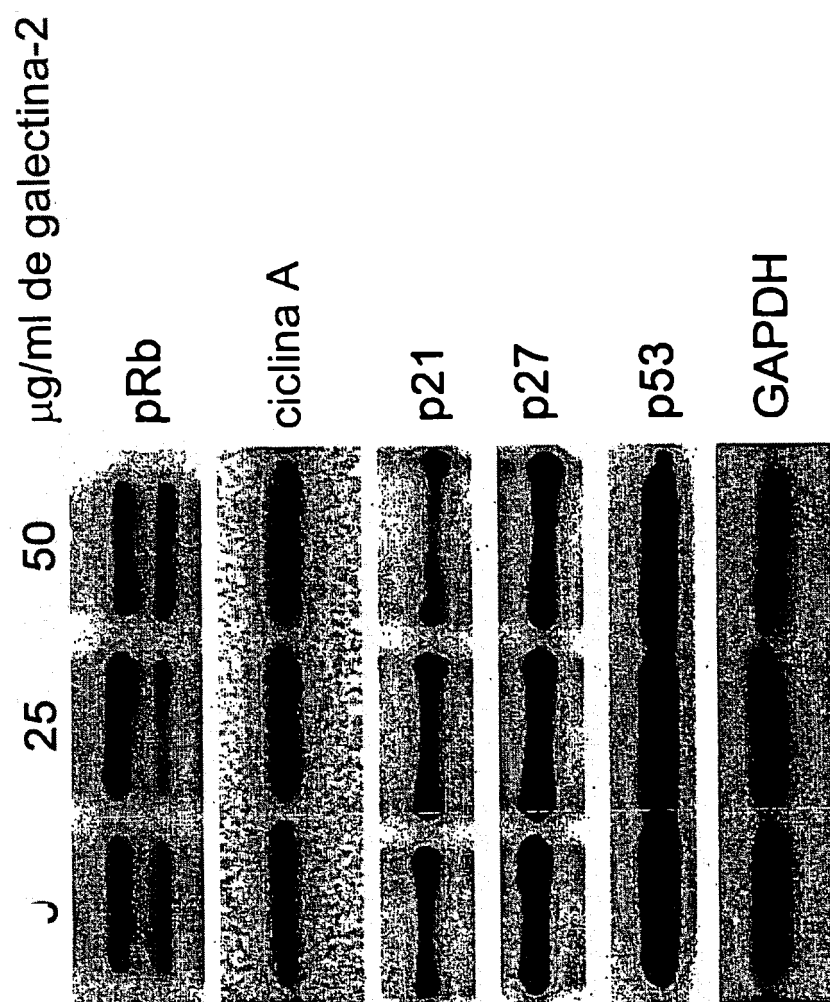


Figura 7B

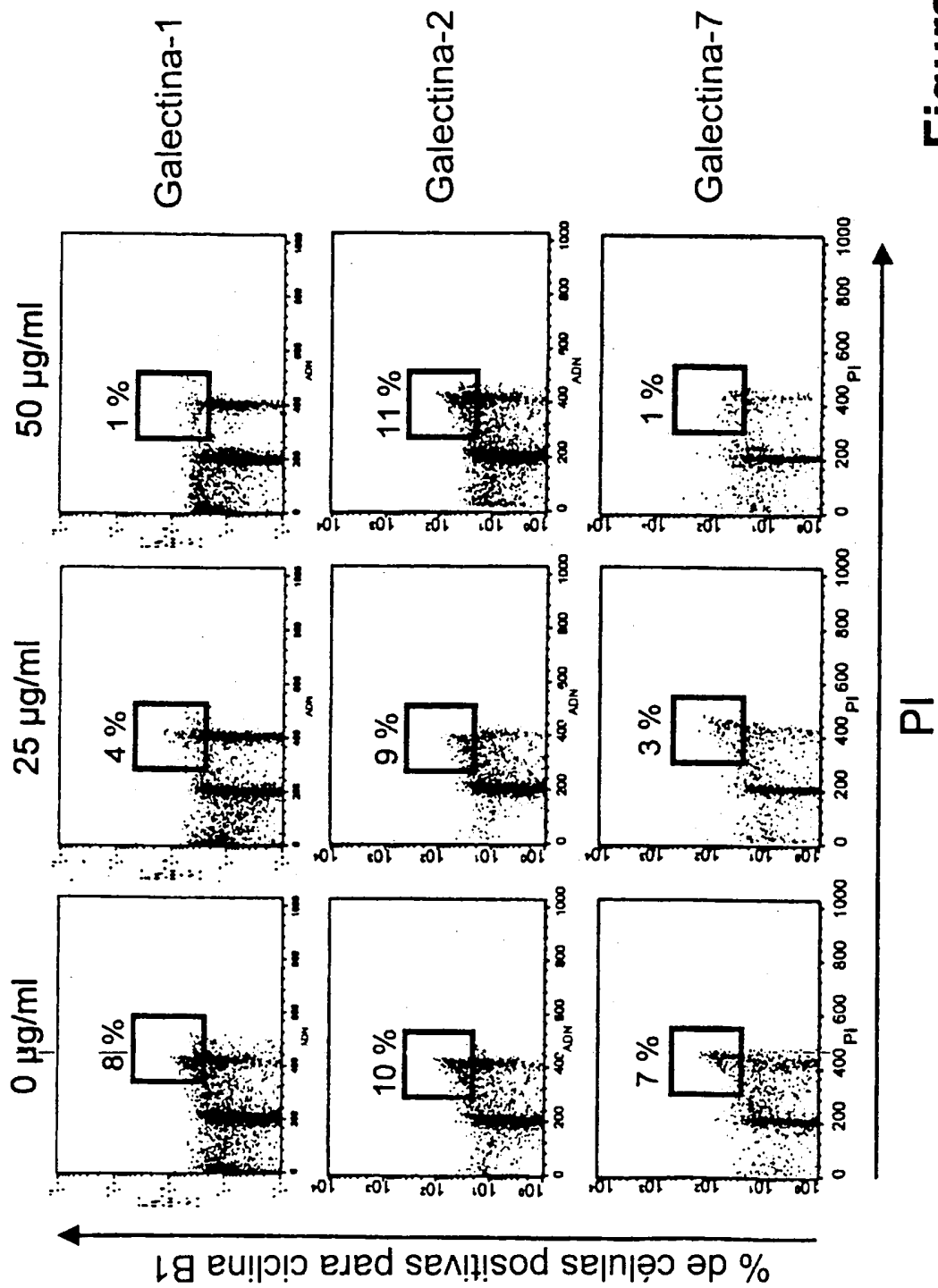


Figura 8

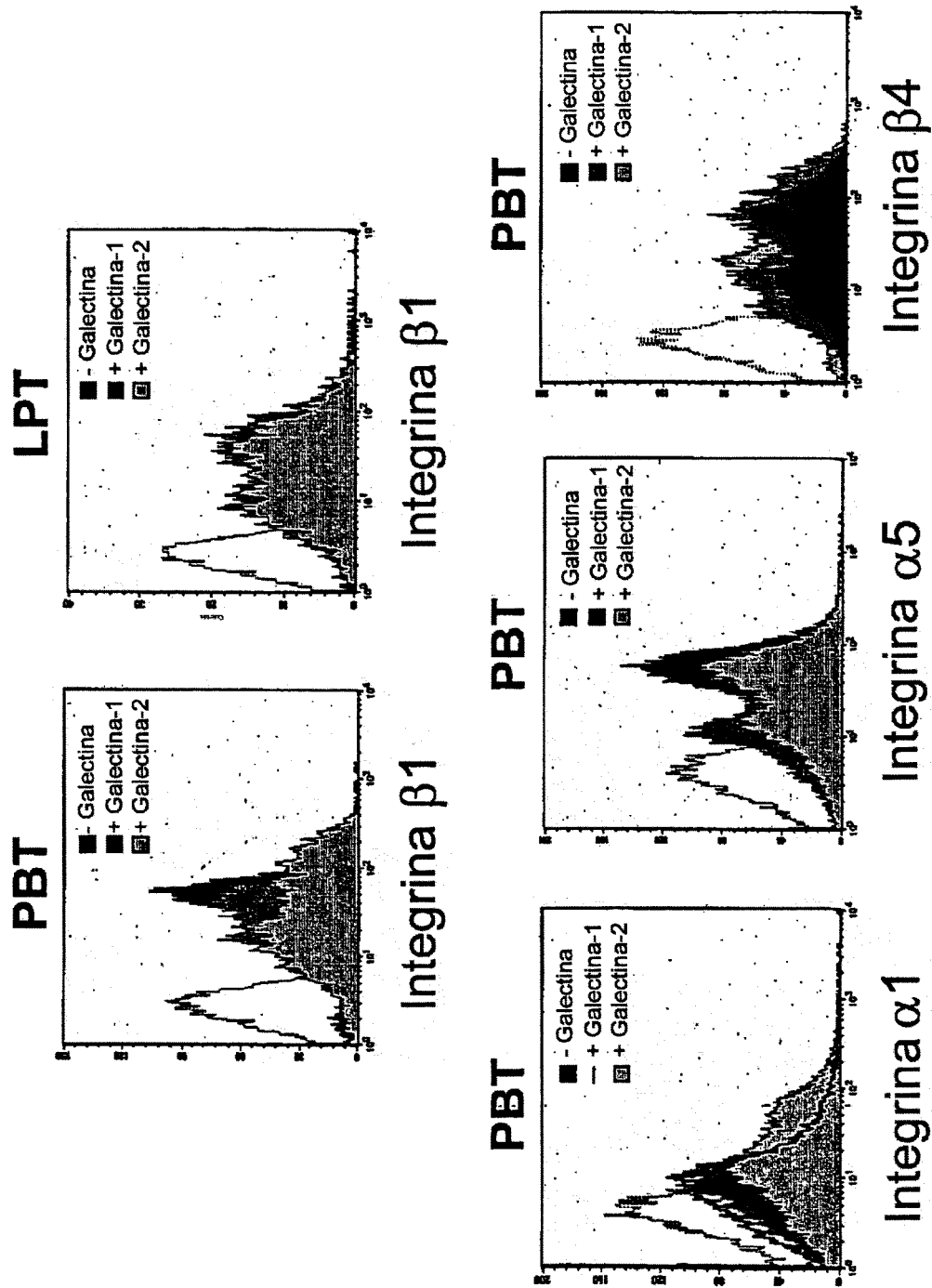


Figura 9

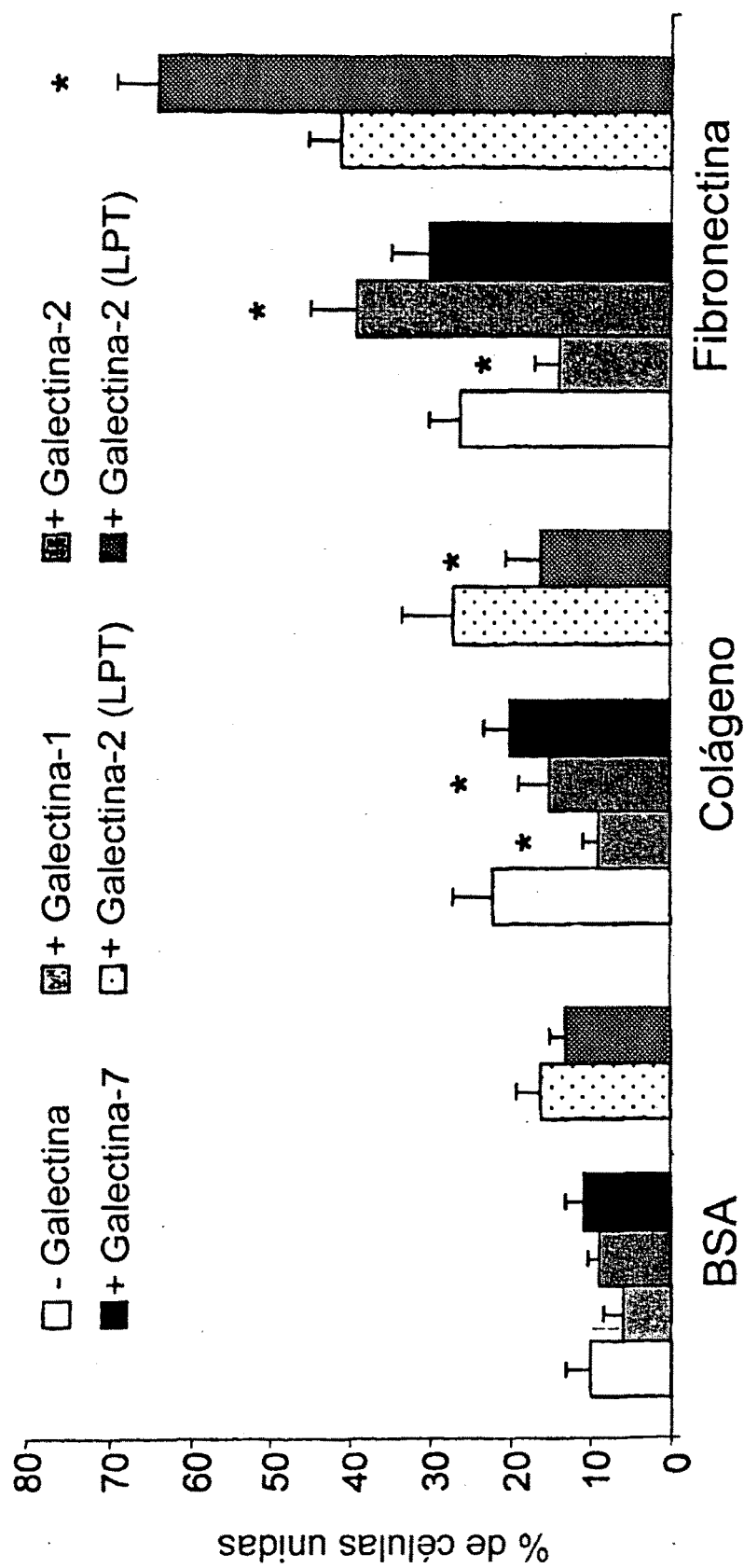


Figura 10A

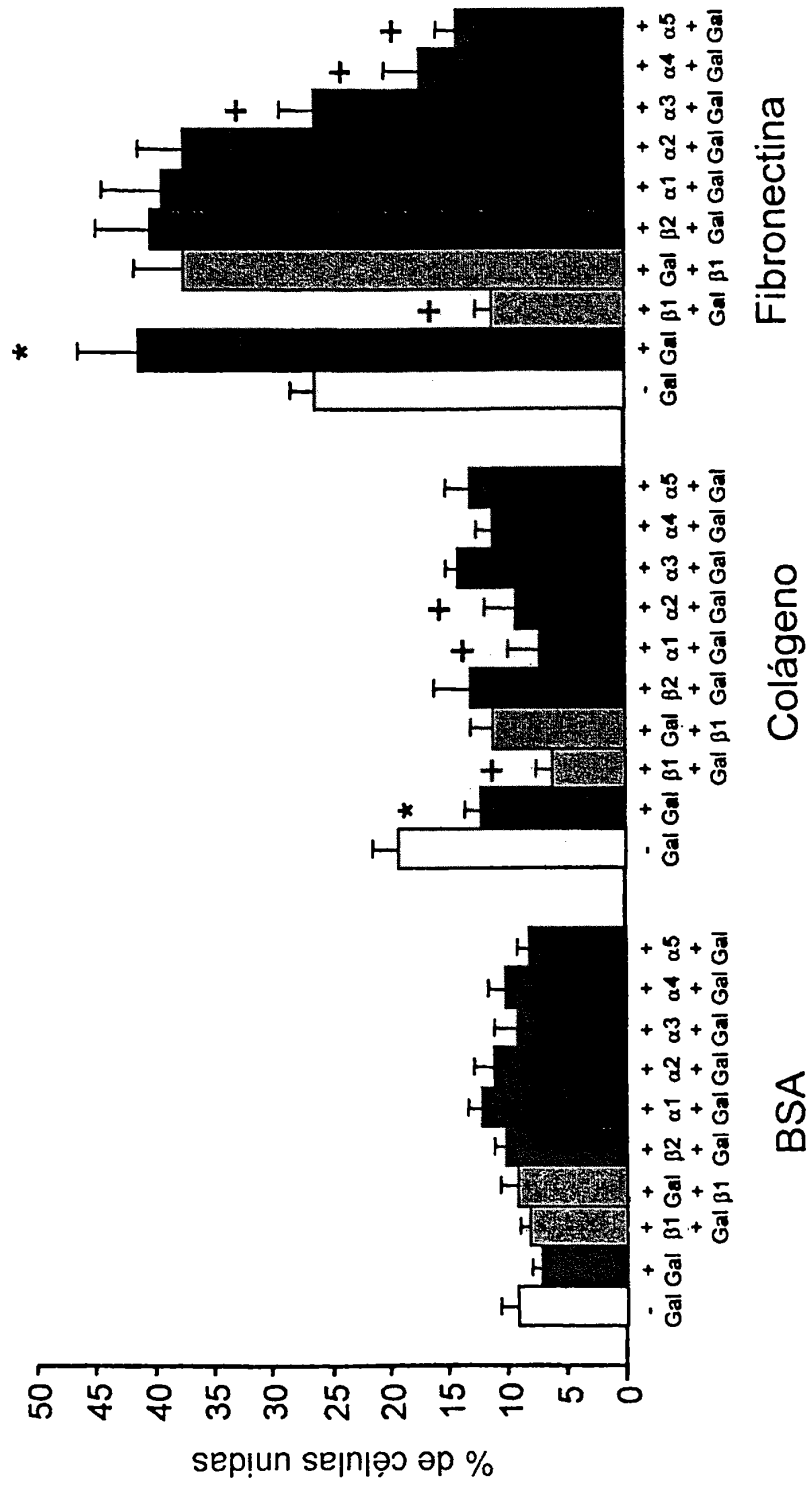


Figura 10B

*

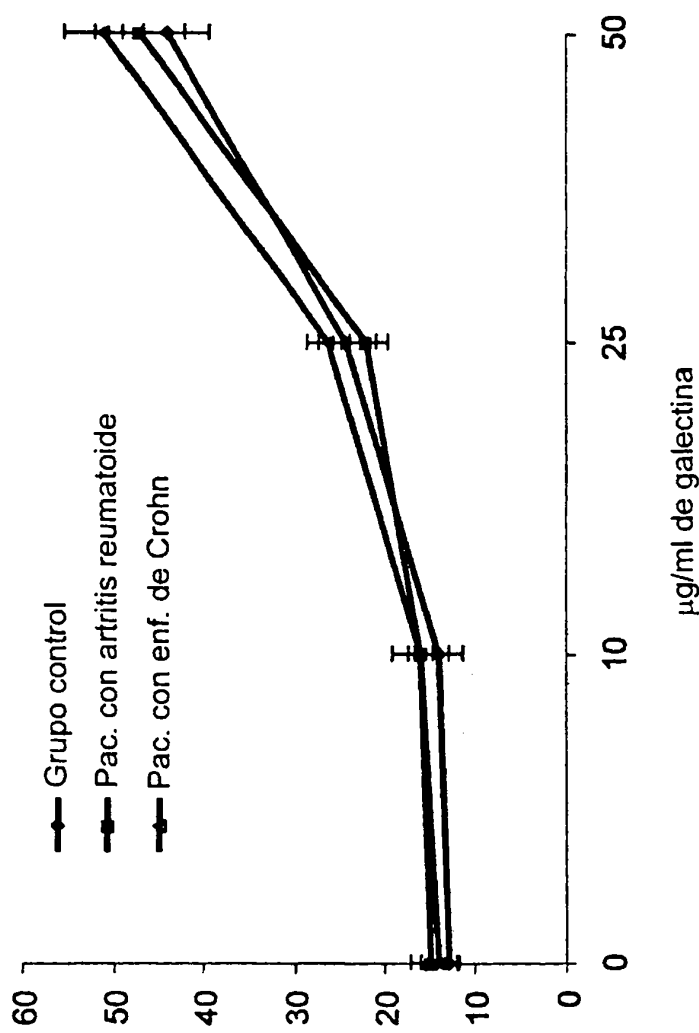


Figura 11

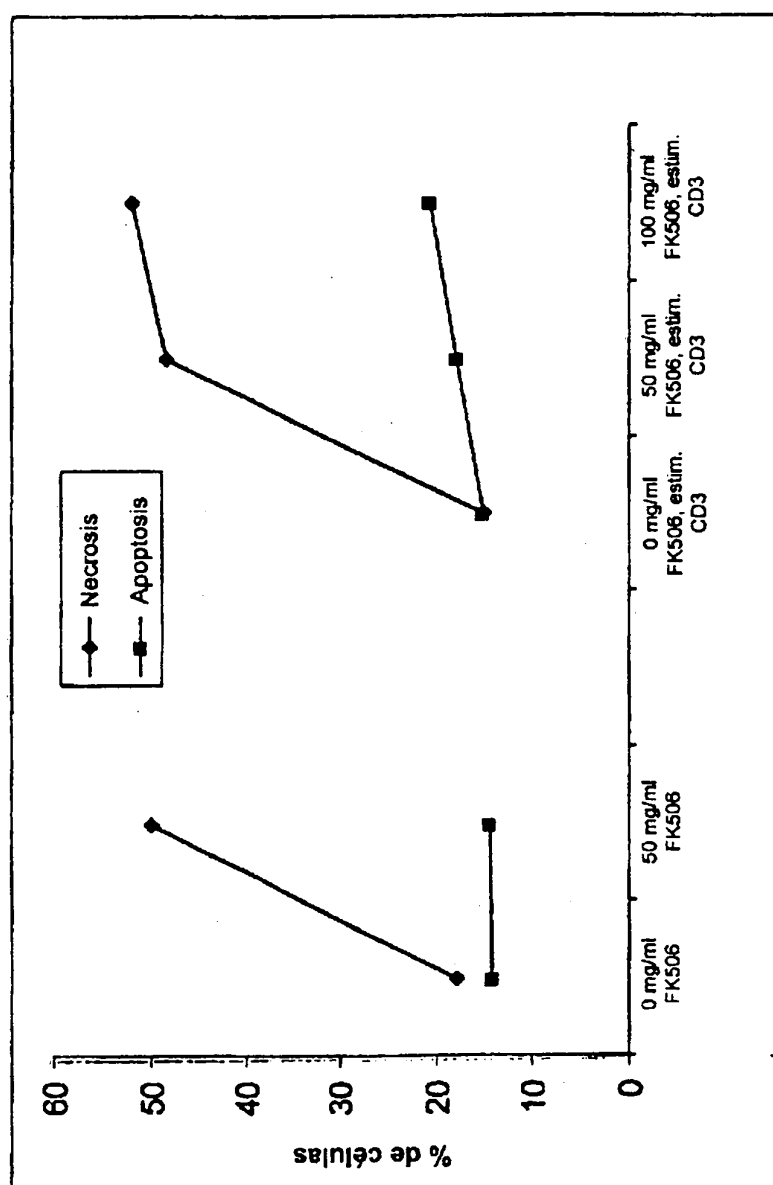


Figura 12

ES 2 282 750 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Charite
 5 <120> Usos de galectina 2
 <130> FB13465
 10 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.2
 15 <210> 1
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 1

 25 Met Thr Gly Glu Leu Glu Val Lys Asn Met Asp Met Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 30 Thr Leu Lys Ile Thr Gly Ser Ile Ala Asp Gly Thr Asp Gly Phe Val
 20 25 30

 35 Ile Asn Leu Gly Gln Gly Thr Asp Lys Leu Asn Leu His Phe Asn Pro
 35 40 45

 40 Arg Phe Ser Glu Ser Thr Ile Val Cys Asn Ser Leu Asp Gly Ser Asn
 50 55 60

 45 Trp Gly Gln Glu Gln Arg Glu Asp His Leu Cys Phe Ser Pro Gly Ser
 65 70 75 80

 50 Glu Val Lys Phe Thr Val Thr Phe Glu Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys
 85 90 95

 55 Leu Pro Asp Gly His Glu Leu Thr Phe Pro Asn Arg Leu Gly His Ser
 100 105 110

 60 His Leu Ser Tyr Leu Ser Val Arg Gly Gly Phe Asn Met Ser Ser Phe
 115 120 125

 65 Lys Leu Lys Glu
 130

ES 2 282 750 T3

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

 $\langle 400 \rangle$ 2

10 Met Ser Glu Lys Phe Glu Val Thr Asn Leu Asn Met Lys Ser Gly Met
1 5 10 15

15 Ser Leu Lys Ile Lys Gly Lys Ile His Asn Asp Val Asn Ser Phe Thr
 20 25 30

20 Ile Asn Leu Gly Gln Gly Lys Glu Thr Leu Asn Leu His Phe Asn Pro
 35 40 45

25 Arg Phe Asn Glu Ser Thr Ile Val Cys Asn Thr Leu Asp Gly Ser Ser
50 55 60

30 Trp Gly Gln Glu Gln Arg Glu Asn His Ser Cys Phe Ser Pro Gly Ser
65 70 75 80

35 Glu Val Lys Leu Thr Leu Thr Phe Gln Asp Lys Asp Phe Lys Val Thr
 85 90 95

Leu Pro Asp Gly His Ser Leu Thr Phe Pro Asn Arg Leu Gly His Asn
 100 105 110

45
His Leu Arg Tyr Leu Ser Met Asp Gly Leu Gln Ile Ser Ser Phe Lys
115 120 125

50

Leu Glu
130

55

60

65