

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/63 (2013.01) **A61K 31/70** (2013.01)
A61K 39/00 (2013.01) **A61K 39/38** (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01) **G01N 33/53** (2013.01)
A01N 43/04 (2013.01) **C07K 16/00** (2013.01)
C12P 21/08 (2013.01) **C07K 14/705** (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01) **C12N 5/783** (2013.01)
C12N 5/74 (2013.01) **C12N 5/71** (2013.01)

(22) Data de pedido: **2004.03.01**

(30) Prioridade(s): **2003.02.28 US 451039 P**
2003.06.24 US 482143 P
2003.12.22 US 531704 P

(43) Data de publicação do pedido: **2008.03.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.08.14**
221/2013

(73) Titular(es):

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
3400 N. CHARLES STREET BALTIMORE, MD
21218 US
ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL
INC. US

(72) Inventor(es):

DREW M. PARDOLL US
JONATHAN POWELL US
CHARLES DRAKE US
DARIO A. VIGNALI US
CHUNG-TAI HUANG US

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **REGULAÇÃO DE CÉLULAS T**

(57) Resumo:

AS CÉLULAS T REGULADORAS (TREG) LIMITAM A AUTOIMUNIDADE MAS PODEM TAMBÉM ATENUAR A MAGNITUDE DE ANTI-PATOGÊNEOS E DA IMUNIDADE ANTI-TUMORAL. A COMPREENSÃO DO MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DAS TREG E A MANIPULAÇÃO TERAPÊUTICA DAS TREG IN VIVO REQUER A IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES SELECTIVOS DESTAS CÉLULAS. A ANÁLISE COMPARATIVA DE ARRAYS DE EXPRESSÃO GÉNICA A PARTIR DE ANTIGÊNEOS ESPECÍFICOS DAS CÉLULAS T CD4+, DIFERENCIANDO-SE EM EFECTOR/MEMÓRIA OU EM UM FENÓTIPO REGULADOR, REVELOU A EXPRESSÃO SELECTIVA DO TREG LAG-3 (CD223, UMA MOLÉCULA RELACIONADA COM CD4 QUE SE LIGA AO COMPLEXO MHC CLASSE II. A EXPRESSÃO DE LAG-3 NAS CÉLULAS TREG CD4+ CORRELACIONA-SE COM A ACTIVIDADE SUPRESSORA DESTAS CÉLULAS IN VITRO, E A EXPRESSÃO ECTÓPICA DE LAG-3 NAS CÉLULAS T CD4 CONFERE UMA ACTIVIDADE SUPRESSORA SOBRE AS CÉLULAS T. ANTICORPOS CONTRA LAG-3 INIBEM ESTA SUPRESSÃO QUER IN VITRO, COMO IN VIVO. O LAG-3 MARCA POPULAÇÕES DE CÉLULAS T REGULADORAS E CONTRIBUI PARA A SUA ACTIVIDADE SUPRESSORA.

RESUMO

"REGULAÇÃO DE CÉLULAS T"

As células T reguladoras (Treg) limitam a autoimunidade mas podem também atenuar a magnitude de anti-patogéneos e da imunidade anti-tumoral. A compreensão do mecanismo de funcionamento das Treg e a manipulação terapêutica das Treg *in vivo* requer a identificação de receptores selectivos destas células. A análise comparativa de arrays de expressão génica a partir de antigéneos específicos das células T CD4+, diferenciando-se em efector/memória ou em um fenótipo regulador, revelou a expressão selectiva do Treg LAG-3 (CD223, uma molécula relacionada com CD4 que se liga ao complexo MHC classe II. A expressão de LAG-3 nas células Treg CD4+ correlaciona-se com a actividade supressora destas células *in vitro*, e a expressão ectópica de LAG-3 nas células T CD4 confere uma actividade supressora sobre as células T. Anticorpos contra LAG-3 inibem esta supressão quer *in vitro*, como *in vivo*. O LAG-3 marca populações de células T reguladoras e contribui para a sua actividade supressora.

DESCRIÇÃO

"REGULAÇÃO DE CÉLULAS T"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a métodos terapêuticos e de triagem de fármacos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Várias doenças são caracterizadas pelo desenvolvimento de imunossupressão progressiva em um paciente. A presença de uma resposta imunitária em pacientes com cancro tem sido particularmente bem documentada. Doentes com cancro e ratos portadores de tumores demonstraram ter várias funções imunitárias alteradas, tais como: diminuição da hipersensibilidade do tipo retardado, uma diminuição da função lítica e da resposta proliferativa de linfócitos. S. Broder *et al.*, N. Engl. J. Med., 299: 1281 (1978); Hersh, EM *et al.*, N. Engl. J. Med., 273: 1006 (1965); North and BuARNUker, (1984). Muitas outras doenças ou intervenções são também caracterizadas pelo desenvolvimento de uma resposta imunitária deficiente. Por exemplo, a imunossupressão progressiva foi observada em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), sepsia, lepra, infecções por citomegalovírus, malária e semelhantes, bem como com tratamentos de quimio- e de radioterapia. Os mecanismos responsáveis pela regulação negativa da resposta imunitária, no entanto, não foram ainda completamente elucidados.

A resposta imunitária é um fenómeno complexo. Os linfócitos T (células T) são fundamentais para o

desenvolvimento de todas as reacções imunitárias mediadas por células. As células T auxiliares controlam e modulam o desenvolvimento de respostas imunitárias. As células T citotóxicas são células efectoras, que desempenham um papel importante em reacções imunológicas contra parasitas intracelulares e vírus, através da lise das células alvo infectadas. As células T citotóxicas, também têm sido implicadas na protecção do organismo contra o desenvolvimento de cancro através de um mecanismo de vigilância imunológica. As células T reguladoras bloqueiam a indução e/ou a actividade de células T auxiliares. As células-T em geral não reconhecem o antígeno livre, mas reconhecem-no na superfície de outras células. Estas outras células podem ser células especializadas apresentadoras de antígenos capazes de estimular a divisão das células T ou podem ser células infectadas viralmente dentro do corpo que se tornam um alvo para as células T citotóxicas.

As células T citotóxicas reconhecem, geralmente, antígenos em associação com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I, produtos que são expressos em todas as células nucleadas. As células T auxiliares, e a maioria das células T, que proliferam em resposta ao antígeno *in vitro*, reconhecem o antígeno em associação com produtos do MHC de classe II. Os produtos de classe II são expressos a grande custo em células apresentadoras de antígenos e em alguns linfócitos. As células T podem também ser divididas em duas subpopulações principais com base nas suas glicoproteínas de membrana, tal como definido com anticorpos monoclonais. O subconjunto de células CD4+ que exprime uma glicoproteína de 62 kD, reconhece geralmente o antígeno no contexto de antígenos da classe II, enquanto que o subconjunto CD8+ expressa uma

glicoproteína de 76 kD e é restrito ao reconhecimento de antígenos no contexto do MHC de classe I.

O aumento da resposta imunitária em animais imunocomprometidos, por meio de perfusões de linfocinas, imunoterapia adoptiva, tem tido um sucesso variável e limitado. São necessários métodos para melhorar este tipo de tratamento. Por exemplo, fornecer linfócitos, sangue e outras perfusões celulares aos pacientes imunodeficientes sob certas condições. No entanto, acelerar e melhorar a reconstituição de uma população de células T saudável pode proporcionar um aumento significativo dos benefícios e a eficácia de tratamento para esses pacientes.

Algumas condições podem resultar em uma actividade deletéria das células T. Por exemplo, doenças inflamatórias e autoimunitárias mediadas por células T são caracterizadas por uma actividade deletéria de células T, na qual as células T que reconhecem auto-antígenos proliferam e atacam as células que expressam esses antígenos. Outros exemplos incluem a ocorrência de rejeição de um enxerto mediada por células T do hospedeiro e enxerto versus doença do hospedeiro.

As terapias imunossupressoras existentes, disponíveis para tratar estas condições incluem a administração de compostos imunossupressores tais como: ciclosporina A, FK506 e rapamicina. No entanto, estas terapias não são inteiramente eficazes e estão associadas a efeitos secundários adversos significativos, tais como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hipertensão, hirsutismo, e neurotoxicidade. Assim, terapias adicionais, que podem suprimir de modo mais eficaz a actividade das células T e com menos efeitos secundários são necessárias para tratar estas condições.

A homeostasia linfocítica é um processo biológico central que é fortemente regulado. Tanchot, C. *et al.*, *Semin.Immunol.* 9: 331-337 (1997); Marrack, P. *et al.*, *Nat.Immunol.* 1: 107-111 (2000), C. D. Surh, C.D. e Sprent, J., *Microbes.Infect.* 4: 51-56 (2002); Jameson, S.C., *Nat.Rev.Immunol.* 2: 547-556 (2002). Apesar do controle molecular deste processo ser pouco compreendido, as moléculas envolvidas na mediação de duas vias de sinalização, são consideradas essenciais. Pela primeira vez, o reconhecimento de moléculas próprias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é importante na manutenção da homeostasia das células T ingênuas ("naïve") e função das células T de memória. Takeda, S. *et al.*, *Immunity* 5: 217-228 (1996); Tanchot, C. *et al.*, *Science* 276:2057-2062 (1997).

Além do mencionado anteriormente, estudos recentes demonstraram que a expressão do receptor das células T (TCR) é necessária para a sobrevivência continuada de células T ingênuas. Polic, B. *et al.*, *Proc.* 98: 8744-8749 (2001); Labrecque, N. *et al.*, *Immunity* 15: 71-82 (2001). Segundo, as citocinas que sinalizam via a cadeia gama comum (γ c) são fundamentais para a sobrevivência e homeostasia de células T ingênuas, especialmente a interleucina-7 (IL -7). Schluns, K.S. *et al.*, *Nat.Immunol.* 1: 426-432 (2000); Tan, J. T. *et al.*, *Proc.* 98: 8732-8737 (2001). Todas estas moléculas regulam positivamente a homeostasia das células T. Em oposição, apenas o CTLA-4 e o TGF- β têm sido implicados na regulação negativa da homeostasia das células T, embora ainda necessite de confirmação através da transferência de células T para hospedeiros linfopénicos ou análise da expansão neonatal. Waterhouse, P. *et al.*, *Science* 270: 985-988 (1995); Tivol, E.A. *et al.*, *Immunity* 3: 541-547 (1995); Lucas, P.J. *et al.*,

J. Exp. Med. 191: 1187-1196 (2000); Gorelik , L. e Flavell , RA, Immunity 12: 171-181 (2000).

A molécula LAG-3 é especialmente interessante devido à sua estreita relação com o CD4. A LAG-3 tem uma organização genómica semelhante ao CD4 e reside na mesma localização cromossómica. Bruniquel, D. *et al.*, Immunogenetics 47: 96-98 (1997). A LAG-3 é expressa em células CD4+ activadas e linfócitos T CD δ + $\alpha\beta$ e um subconjunto de células T $\gamma\delta$ e células NK. Baixeras, E. *et al.*, J. Exp. Med. 176: 327-337 (1992); Triebel, F. *et al.*, J. Exp. Med. 171: 1393-1405 (1990); Huard, B. *et al.*, Immunogenetics. 39: 213-217 (1994); Workman, CJ *et al.*, Eur.J.Immunol. 32: 2255-2263 (2002). Tal como o CD4, a LAG-3 liga-se a moléculas do MHC classe II, mas com uma afinidade muito mais elevada. Huard, B. *et al.*, Immunogenetics 39: 213-217 (1994); Huard, B. *et al.* Eur.J.Immunol. 25: 2718-2721 (1995).

O transplante de células que expressam a LAG-3 na sua superfície resulta na protecção contra a rejeição do enxerto (Patente de invenção internacional WO 98/23748).

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida nas reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1A a 1E. As células T CD4+ específicas da HA tornam-se tolerantes e desenvolvem a actividade das células T reguladoras aquando da transferência adoptiva para ratinhos transgénicos C3-HA^{high}. (Figura 1A) Ratinhos

transgênicos C3-HA^{high} expressam altos níveis de HA em vários compartimentos epiteliais, com o nível mais elevado expresso no epitélio pulmonar. Os receptores ou destinatários C3-HA^{high} morrem entre 4-7 dias após a transferência adoptiva de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ transgênicas para TCR específicas de HA (6.5), devido a pneumonia associada com uma fase efectora transiente de activação que ocorre antes do desenvolvimento de um fenótipo anérgico. A transferência de um número inferior de células T CD4⁺ 6.5 resulta numa patologia pulmonar menos grave e os receptores C3-HA^{high} sobrevivem à transferência. Células T 6.5 residuais tornam-se anérgicas tal como definido pela sua incapacidade de produzir interferon γ ou de proliferar para o antígeno HA *in vitro*. Os ratinhos que receberam uma dose sub-letal de células T 6.5 estão protegidos contra a subsequente perfusão de 2.5×10^6 células T ingênuas 6.5. Assim, as células T toleradas inicialmente desenvolvem actividade Treg que suprime a pneumonia letal induzida por uma segunda dose elevada de células T 6.5. (Figuras 1B a 1E)

Localização de células T efectoras/memória vs. Supressão de células T em ratinhos C3-HA^{high}. As células T ingênuas (Thy 1.1+/1.2-) foram transferidas adoptivamente para receptores C3-HA^{high} (Thy 1.1-/1.2+), quer na ausência quer na presença de células 6.5 anérgicas/Treg (Thy 1.1-/1.2+). Os baços e os pulmões foram retirados 3 dias após a transferência adoptiva e as células Thy 1.1+ foram coradas por imunohistoquímica. Na ausência de células T reguladoras, as células T efectoras são distribuídas pelos folículos do baço (Figura 1B) e infiltram os vasos pulmonares (Figura 1C). Na presença de células Treg, as células T 6.5 específicas de HA suprimidas ficam sequestradas na bainha linfática peri-arteriolar do baço

(Figura 1D) e deixam de se infiltrar nos vasos pulmonares (Figura 1B).

Figura 2A-2C. A LAG-3 é diferencialmente expressa entre células T CD4⁺ anérgicas/Treg e efetoras/memória e a expressão da LAG-3 em células T CD4⁺ anérgicas/Treg está correlacionada com a expressão de IL-10. A expressão diferencial foi verificada por análise génica em *chip* e foi confirmada por (Figura 2A) RT-PCR quantitativo em tempo real. A expressão diferencial de LAG-3 em dias anteriores (dia 2 ao dia 4) estende-se até 30 dias após a transferência adoptiva. (Figura 2B) Os níveis da proteína de superfície celular LAG-3 foram analisados por coloração com anticorpos. Os esplenócitos foram recolhidos a partir de ratinhos C3-HA^{high}, tipo selvagem B10.D2 imunizados com Vac-HA, ou ratinhos wt B10.D2 5 dias após injeção I.V. com esplenócitos 6.5+/- Thyl.1+/-, e preparados em uma suspensão de célula única. Todas as amostras foram primeiramente incubadas com IgG de rato total para bloquear os receptores Fc. As células foram coradas com anticorpos específicos para TCR anti-6.5-biotina+SA-APC, LAG-3-PE, ou os controlos de isotipo correspondentes. As células foram duplamente fechadas na população total de linfócitos e dos linfócitos 6.5 positivos. Controlo de isotipo-linha ponteadada, Células ingénuas-linha cinza claro, Células efetoras/memória-linha cinza escura, células anérgicas/Treg-linha preta. (Figura 2C) A análise de múltiplas amostras de populações anérgicas/Treg durante vários ensaios confirma uma correlação directa entre o nível de LAG-3 e o nível de mARN de IL-10.

Figura 3A-3B. A LAG-3 é expressa em células T reguladoras induzidas, independentemente de CD25, e é um marcador de função Treg. (Figura 3A) Células T 6.5 anérgicas/Treg a partir de baços de receptores C3-HA^{high} 5 dias após a transferência foram coradas para a expressão de LAG-3 e a expressão de CD25, e comparadas com os controlos de isotipo. (Figura 3B) As células foram sorteadas em quatro populações baseadas na coloração da LAG-3 e do CD25 de superfície: LAG-3^{high}CD25^{high}, LAG-3^{high}CD25^{low}, LAG-3^{low}CD25^{high} e LAG-3^{low}CD25^{low}. 1x10⁵ de cada um dos diferentes subconjuntos de células foram adicionados como supressores em um ensaio de supressão *in vitro* com 1x10⁴ células 6.5 CD4⁺ ingênuas como respondedoras. As células LAG-3^{low}CD25^{low} foram as menos supressivas. As células LAG-3^{high}CD25^{high}, LAG-3^{high}CD25^{low}, e LAG-3^{low}CD25^{high} são comparáveis em termos de actividade supressiva, sendo que as células LAG-3^{high}CD25^{high} duplamente positivas exibiram a actividade mais supressiva. Este é o resultado representativo de três experiências reprodutíveis.

Figura 4. Os anticorpos anti-LAG-3 bloqueiam a actividade Treg *in vitro*. O anticorpo monoclonal anti-LAG-3 adicionado ao ensaio de supressão *in vitro* em uma concentração de 2 mg/ml, inverte totalmente a supressão da proliferação das células T CD4⁺ 6.5 ingênuas *in vitro* pelas células CD4⁺ 6.5 supressoras em um rácio de 0,04:1 de supressoras:respondedoras.

Figura 5A a 5C. O anticorpo anti-LAG-3 elimina a supressão *in vivo* exercida pelas células Treg CD4⁺ 6.5, através da inibição directa das células Treg. (Figura 5A) Os ratinhos C3-HA^{high} pré-tratados com 8 000 células T CD4⁺ 6.5 sobreviveram ao desafio subsequente com 2,5x10⁶ de células

T CD4⁺ 6.5 administradas quatro dias após o estabelecimento da transferência inicial da população Treg (com protecção). Sem o pré-tratamento subletal, os receptores C3-HA^{high} morrem 4-6 dias após o desafio letal (sem protecção). O anticorpo monoclonal anti-LAG-3 (200 µg) foi administrado I.V. aos ratinhos C3-HA^{high} com a dose letal de células T 6.5, 4 dias depois de terem sido previamente tratados com 8 000 células T CD4⁺ 6.5 e outra dose de 200 µg foi administrada 2 dias depois. Os ratinhos tratados com o anticorpo anti-LAG-3 não toleraram o desafio letal subsequente (Protecção + aLAG-3). Em oposição, o tratamento com o anticorpo controlo de isotipo de IgG1 de rato não conseguiu eliminar a supressão *in vivo* (Protecção + RatIgG1). (Figuras 5B e 5C) O anti-LAG-3 mAb não hiperativou as células T CD4⁺ 6.5 ingénuas na ausência de Treg. Os ratinhos C3-HA^{high} receberam quer 2.5X10⁵ (dose sub-letal; Fig.5B) quer 8X10⁵ (letalidade parcial entre 7 a 14 dias após a transferência; Fig.5C) de células T CD4⁺ 6.5 ingénuas em associação com o anticorpo anti-LAG-3, o anticorpo controlo de rato, o anticorpo de IgG1, ou sem anticorpo. Não foi observada letalidade com as perfusões do anticorpo anti-LAG-3 em uma dose de 2.5x10⁵, enquanto que a letalidade na dose a 8x10⁵ não foi afectada pelos anticorpos anti-LAG-3.

Figura 6A a 6D. Papel da LAG-3 em células T CD4⁺CD25⁺ naturais. (Figura 6A) Células T CD4⁺CD25⁺ naturais têm maiores níveis de expressão do mRNA de LAG-3 em comparação com as suas células CD4⁺CD25⁻ correspondentes. As células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ foram purificadas a partir de nódulos linfáticos de BALB/c selvagem. As células T CD4⁺CD25⁺, a população documentada para conter as células T reguladoras naturais, têm níveis significativamente mais

elevados de ARN de CD25 e LAG-3, bem como para CTLA-4, GITR e Foxp3, em comparação com as suas células correspondentes CD4+CD25- (A expressão de cada mRNA no subconjunto de células CD4+CD25- foi normalizada para um valor de 1). (Figura 6B) A coloração da LAG-3 à superfície é negativa em células T naturais reguladoras CD4+CD25+, bem como nas suas células CD4+CD25- correspondentes. No entanto, a coloração intracelular para a LAG-3 revela uma população positiva de células CD4+CD25+, mas não em células T CD4+CD25-. (Figura 6C) As células T CD4+CD25+ separadas a partir dos nódulos linfáticos dos ratinhos BALB/c foram utilizadas como supressoras e as células T CD4+CD25- como respondedoras em um ensaio *in vitro* de supressão (rácio de 0,04:1 de supressor:efetor), sendo os anticorpos anti-CD3 (0,5 µg/ml) o estímulo das células T. Os anticorpos anti-LAG-3 à concentração de 50 µg/ml em reverterem a supressão *in vitro* das células T regulatórias CD4+CD25+ naturais ao passo que o anticorpo de isotipo controlo não o faz. (Figura 6D) Após o ensaio de supressão em C, as células CD4+CD25+ (distintas das células efetoras por marcação com Thy1.2) foram coradas com anti-LAG-3 ou o anticorpo de isotipo controlo.

Figura 7. Expressão ectópica do tipo selvagem, mas não da forma mutante de LAG-3 em células T CD4+ 6.5 deletadas de Cd25 confere potente actividade reguladora *in vitro*. As células T CD4+ 6.5 foram primeiramente suprimidas de quaisquer Tregs CD25+ "natural" e, em seguida, transduzidas com vectores retrovirais baseados em MSCV que codificam a GFP apenas, a GFP + tipo selvagem de LAG-3 ou GFP + um mutante LAG-3.Y73FΔCY que tem ligação reduzida ao MHC de classe II, e não pode mediar a sinalização a jusante. Depois de um período de descanso de 10 dias,

praticamente não se observou coloração da LAG-3 endógena nas células GFP+ 6.5 transduzidas com os vectores MSCV-LAG-3/GFP e MSCV-LAG-3.Y73FΔCY/GFP. As células GFP+ das transduções com o MSCV-LAG-3/GFP e MSCV-LAG-3.Y73FΔCY/GFP coraram intensamente com os anticorpos anti-LAG-3, enquanto que as células transduzidas com MSCV-GFP exibiram virtualmente nenhuma coloração da LAG-3. Separaram-se as células GFP+ de cada grupo e misturaram-se em diferentes proporções com APC, 5 µg/ml do péptido HA110-120 e células CD4+CD25+ 6.5 ingénuas em um ensaio de proliferação.

A Figura 8 mostra que a expressão ectópica da LAG- 3 em um clone de células T específicas para fognina confere protecção contra a diabetes após co-transferência com esplenócitos de ratinhos NOD. 10⁷ esplenócitos NOD pré-diabéticos, foram transferidos sozinhos (em absoluto) ou em associação com clone 4 de células T específicas para fognina (obtido a partir de John Hutton) transduzidas com os vectores (MIG), LAG-3, ou um mutante com sinalização afectada, LAG-3K, em ratinhos NOD/SCID. Os ratinhos NOD/SCID (5/grupo) foram monitorizados para diabetes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A LAG-3 é uma molécula da superfície celular relacionada com CD4, induzida por activação e que se liga ao MHC de classe II com uma afinidade elevada. Verificou-se que ratinhos velhos deficientes em LAG-3 têm o dobro de células T CD4+ e CD8+ comparando com os controlos de tipo selvagem. As células T deficientes em LAG-3 mostram maior expansão homeostática em hospedeiros linfopénicos, a qual é dependente da ligação da LAG-3 a moléculas do MHC de classe II. Tal foi abolido pela expressão ectópica da LAG-3 tipo selvagem, mas

não por um mutante com sinalização afectada. Esta desregulação da homeostasia das células T resulta na expansão de múltiplos tipos de células. Os nossos dados sugerem que a LAG-3 regula negativamente a homeostasia das células T CD4+ e CD8+ e apresentam a LAG-3, tal como um alvo terapêutico para acelerar o enxerto de células T após transplante de medula.

O CD223, também conhecido como antigénio de linfócito do gene 3 ou LAG-3, é uma proteína de superfície celular semelhante a CD4 induzida por activação que se liga a moléculas de MHC de classe II com uma elevada afinidade. Baixeras, E. *et al.*, J. Exp. Med. Chem. 176: 327 (1992). Ver Triebel, F., " Lag-3 (CD223)", Protein Reviews on the Web (PROW) 3:15-18 (2002), no endereço URL: [http tipo de arquivo, www servidor hospedeiro, nome de domínio ncbi.nlm.gov, diretório PROW, guia subdiretório, o nome do documento 165481751_g.htm.](http://www.ncbi.nlm.gov/PROW/guia/subdiretorio/165481751_g.htm); Triebel, F. *et al.* "LAG- 3, um novo gene de activação de linfócitos intimamente relacionado com CD4", J. Exp. Med. Chem. 171: 1393-1405 1990). Um ADN de ratinho representativo e a sequência de aminoácidos de CD223 é apresentada como SEQ ID NOS: 1 e 2, respetivamente. Veja também GenBank Código de Acesso X9113. Um DNA humano representativo e a sequência de aminoácidos para CD223 é apresentada como SEQ ID NOS: 3 e 4, respectivamente. Veja também GenBank número de acesso X51985. Estas sequências são derivadas de indivíduos únicos. Espera-se que existam variações alélicas na população que diferem em menos do que cerca de 5% das posições. Tais variantes alélicas estão incluídas no âmbito do significado de CD223 de origem de ratinho ou humana.

As células T reguladoras são um subgrupo de células T, que funcionam através da inibição das células T efectoras. As

células T reguladoras são CD223+ e normalmente são também CD4+CD25+. As células T reguladoras desempenham um papel central no equilíbrio da tolerância autoimunitária e capacidade de resposta imunitária. Tais células podem ser isoladas a partir de células CD223 utilizando anticorpos e técnicas de separação conhecidos na área. Estas incluem, mas não estão limitadas a: cromatografia de imunoafinidade, FACS, imunoprecipitação, etc.. As células CD223+ podem ser administradas em pacientes com doença autoimunitária, alergia ou asma. No caso de um paciente com doença autoimunitária as células podem ser pré-activadas com o auto-antigénio. As células CD223 podem ser igualmente transferidas para pacientes com cancro, pacientes com infecção bacteriana ou viral, ou pacientes com SIDA.

Uma análise comparativa das matrizes de expressão génica do antigénio específico das células T CD4+ diferenciando-se quer em efectora/memória ou um fenótipo regulador revelou a expressão específica de Treg da LAG-3, um homólogo de CD4 que se liga ao MHC de classe II. As células T CD4+ LAG-3^{high} exibem uma actividade supressora *in vitro* e anticorpos para LAG-3 inibem a supressão tanto *in vitro* como *in vivo*. Estes resultados identificam a LAG-3 como um receptor ou co-receptor específico Treg de modulação da actividade supressora. A manipulação de células Treg por meio de LAG-3 pode, portanto, ser utilizada para melhorar a imunoterapia de doenças autoimunitárias, cancro e doenças infecciosas, bem como melhorar o enxerto de linfócitos em condições de perfusão de linfócitos do doador, transplante de medula óssea e de transferência adoptiva de células T.

A CD223 é uma molécula reguladora de superfície celular específica das células T que regula a função de células T

reguladoras. A função de um regulador de células T pode ser melhorada através do reforço ou aumento da actividade de CD223, ou pelo aumento do número de células CD223+ em uma população de células T. O reforço da função reguladora das células T de um organismo pode ser utilizado para limitar a resposta imunitária das células T, em circunstâncias em que essa resposta é indesejável, tal como quando um sujeito sofre de uma doença autoimunitária. Por outro lado, a função de um regulador de células T pode ser inibida através da inibição da actividade da CD223 ou diminuindo o número de células CD223+ de uma população de células T. A inibição da função de células T reguladoras em um organismo pode ser utilizada para melhorar a resposta imunitária de células T em circunstâncias em que essa resposta é desejável, tal como em um doente que sofre de cancro, infecção crónica, ou um receptor de transplante de medula óssea.

Quando se trata um paciente com cancro com um agente inibidor que se liga à proteína CD223 ou ao mARN, pode-se co-administrar facultativamente uma vacina anti-tumoral. Tais vacinas podem ser dirigidas a antigénios isolados, ou a grupos de antigénios ou para células tumorais inteiras. Pode ser desejável administrar o agente inibidor com agentes quimioterápicos. O tratamento com vários agentes não precisa de ser efectuado com uma mistura de agentes, mas pode ser feito utilizando as preparações farmacêuticas em separado. As composições não necessitam de ser administradas ao mesmo tempo, mas podem ser coordenadas para serem administradas a um paciente durante o mesmo período de tratamento, ou seja, dentro de uma semana, um mês ou outro qualquer período. Assim, uma composição que compreende dois componentes activos pode ser reconstituída no corpo do paciente. Qualquer tratamento anti-tumoral apropriado pode ser coordenado com os

tratamentos da presente invenção orientados para CD223. Do mesmo modo, aquando do tratamento de pacientes com infecções, outros agentes anti-infecciosos podem ser coordenados com o tratamento da presente invenção orientado para CD223. Tais agentes podem ser pequenas moléculas de fármacos, vacinas, anticorpos, etc..

O número de células CD223+ de uma população de células T pode ser modificado por meio de um anticorpo ou outro agente que selectivamente se ligue a CD223. As células CD223+ representam uma população enriquecida de células T reguladoras que podem ser introduzidas de volta para a fonte original das células T ou noutro hospedeiro compatível para melhorar a função das células T reguladoras. Alternativamente, as células CD223 representam uma população de células T deficiente em actividade de células T reguladoras, que pode ser reintroduzida na fonte original das células T ou em um outro hospedeiro compatível para inibir ou reduzir a função das células T reguladoras, enquanto retém a actividade de células T em geral.

Quaisquer meios desejados, quer para aumentar quer para diminuir (modulação) a actividade da CD223 pode ser utilizado nos métodos da presente invenção. Isto inclui a modulação directa da função da proteína CD223, a modulação da transdução do sinal da CD223, e a modulação da expressão de CD223 nas células T, quer através da modulação da transcrição quer da tradução, ou de ambas. Os processos que modulam selectivamente a actividade da CD223 preferem-se mais do que os moduladores não seletivos. Além disso, esses processos inibitórios que criam uma deficiência transitória em CD223 em uma população de células T, que, em seguida, retornam aos níveis normais de actividade da CD223 podem ser preferidos

para o tratamento de uma deficiência temporária de células T. As células T transientemente afectadas podem ser utilizadas para reconstituir uma população diminuta de células T com células T que serão geneticamente normais relativamente às CD223. Esta deficiência temporária nas células T ocorre, por exemplo, em pacientes que recebem uma transferência de células estaminais após mioablação. Modulação da actividade da CD223 pode ser efectuada em células *in vitro* ou em animais inteiros, *in vivo*. As células que são tratadas *in vitro* podem ser administradas a um paciente, quer à fonte original das células individuais quer a um outro indivíduo não relacionado.

A fim de inibir a função de CD223, anticorpos contra CD223 ou pequenas moléculas inibidoras podem ser utilizadas. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos, que são úteis para este propósito serão aqueles que se podem ligar a CD223 e bloqueiam a sua função. Tais anticorpos podem ser anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (ver, por exemplo, Workman, CJ *et al.* "Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3)", Eur. J. Immunol. 32:2255-2263 (2002)), anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia simples, moléculas de MHC de classe II solúveis, fragmentos de anticorpos, etc..

Os anticorpos gerados contra polipéptidos CD223 podem ser obtidos por injeção directa dos polipéptidos CD223 em um animal ou por administração de polipéptidos CD223 a um animal, de preferência não humano. O anticorpo obtido desta forma ligar-se-á aos polipéptidos de CD223. Deste modo, mesmo uma sequência codificando apenas um fragmento do polipéptido de CD223 pode ser utilizada para gerar anticorpos que se ligam a todo o CD223 polipéptido nativo.

Para a preparação de anticorpos monoclonais, qualquer técnica que proporcione anticorpos produzidos por culturas continuadas de linhas de células podem ser utilizados. Exemplos incluem a técnica do hibridoma (Kohler e Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), a técnica do trioma, a técnica do hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), e a técnica de hibridoma-EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole, et al., 1985, em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss, Inc., pp 77-96).

As técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (Patente de invenção norte-americana No. 4 946 778) podem ser prontamente utilizadas para produzir anticorpos de cadeia simples para polipéptidos CD223. Além disso, os ratinhos transgênicos podem ser utilizados para expressar anticorpos humanizados para polipéptidos imunogênicos CD223.

Para aumentar ou activar a função de CD223, qualquer agente que aumente o nível de CD223 ou a actividade de CD223 existente nas células T pode ser utilizado. Tais agentes podem ser identificados utilizando os ensaios de rastreio descritos a seguir. Os vectores de expressão que codificam CD223 podem também ser administradas para aumentar a dosagem de gene. Os vectores de expressão podem ser vectores plasmídicos ou vectores virais, tal como são conhecidos na área. Qualquer vector pode ser escolhido pelo clínico para propriedades especialmente desejáveis.

Composições que compreendem uma mistura de anticorpos que se ligam especificamente a CD223 e uma vacina anti-cancro podem ser produzidas *in vitro*. De preferência, a composição é

produzida sob condições que a torna adequada para utilização como uma composição farmacêutica. As composições farmacêuticas podem ser estéreis e isentas de pirogénios. Os componentes da composição também podem ser administrados separadamente a um paciente dentro de um período de tempo de tal modo que eles estão ambos dentro do corpo do paciente ao mesmo tempo. Tal administração separada no tempo conduz à formação de uma mistura de anticorpos e vacinas dentro do corpo do paciente. Se o anticorpo e a vacina forem administrados de uma forma separada no tempo, poderão ser fornecidos em conjunto num kit. Dentro do kit, os componentes podem ser embalados ou acondicionados separadamente. Outros componentes como excipientes, veículos, outros moduladores ou adjuvantes imunológicos, instruções para a administração do anticorpo e da vacina, e dispositivos para a injeção também podem ser fornecidos com o kit. As instruções podem disponibilizar-se em formato escrito, vídeo ou formato de áudio, podem apresentar-se em papel, meio eletrónico, ou mesmo como uma referência a uma outra fonte, tal como um *website* ou um manual de referência.

Os anticorpos Cd223 podem ser utilizados para aumentar a magnitude da resposta anti-cancro do paciente com cancro à vacina anti-cancro. Eles também podem ser utilizados para aumentar o número de doentes que respondem favoravelmente ao tratamento em uma população de pacientes com cancro. Assim, os anticorpos podem ser utilizados para ultrapassar a supressão imunitária encontrada em pacientes refratários para vacinas contra o cancro. As vacinas contra o cancro podem ser qualquer uma conhecida na área, incluindo, mas não se limitando a vacinas de células de tumores inteiros, antigénios tumorais isolados ou polipeptídeos compreendendo um ou mais epítomos de antigénios tumorais.

A expressão de CD223 nas células T pode ser modulada, ao nível da transcrição ou da tradução. Os agentes que são capazes de tal modulação podem ser identificados utilizando os ensaios de rastreio descritos seguidamente.

A tradução de mRNA de CD223 pode ser inibida utilizando ribozimas, moléculas anti-sentido, pequenas moléculas de ARN de interferência (siARN; Veja Elbashir, SM *et al.*, "Duplexes of 21-nucleotide ARNs mediate ARN interference in cultured mammalian cells", *Nature* 411:494-498 (2001)) ou pequenas moléculas inibidoras da presente invenção que têm como alvo o mRNA de CD223. A tecnologia anti-sentido pode ser utilizada para controlar a expressão do gene através de formação de hélice tripla ou ADN ou ARN anti-sentido, ambos os métodos são baseados na ligação de um polinucleótido a ADN ou ARN. Por exemplo, a parte 5' codificante da sequência de polinucleótido, que codifica para os polipéptidos maduros da presente invenção, é utilizada para conceber um oligonucleótido de ARN anti-sentido de cerca de 10 a 40 pares de bases de comprimento. Um oligonucleótido de ADN é projetado para ser complementar de uma região do gene envolvida na transcrição (hélice tripla - Ver Lee *et al.* *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 1979); Cooney *et al.*, *Science*, 241:456 (1988), e Dervan *et al.*, *Science*, 251: 1360 (1991)), impedindo assim a transcrição e a produção de CD223. O oligonucleótido de ARN anti-sentido hibrida com o mRNA *in vivo* e bloqueia a tradução da molécula de mRNA no polipéptido CD223 (Antisense - Okano, J. *Neurochem*, 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla (1988)). Os oligonucleótidos descritos antes podem também ser entregues a células através de segmentos ou construções ("*constructs*") de expressão anti-sentido de modo que o ARN anti-sentido ou ADN

pode ser expresso *in vivo* para inibir a produção de CD223. Tais segmentos são bem conhecidos na área ou arte.

Construções anti-sentido, oligonucleótidos anti-sentido, segmentos de ARN de interferência ou moléculas de siARN duplo de ARN podem ser utilizadas para interferir com a expressão de CD223. Geralmente, pelo menos, 15, 17, 19 ou 21 nucleótidos do complemento CD223 da sequência de mRNA são suficientes para uma molécula anti-sentido. Geralmente, pelo menos, 19, 21, 22 ou 23 nucleótidos CD223 são suficientes para uma molécula de ARN de interferência. De preferência, uma molécula de ARN de interferência terá uma extremidade 3' com dois nucleótidos. Se a molécula de ARN de interferência é expressa em uma célula de um segmento, por exemplo a partir de uma molécula de *hairpin* ou a partir de uma repetição invertida da sequência desejada de CD223, a maquinaria celular endógena irá criar as extremidades. As moléculas de siARN podem ser preparadas através de síntese química, transcrição *in vitro*, ou digestão de dsARN longo por ARNase III ou Dicer. Estes podem ser introduzidos nas células por transfecção, eletroporação, ou por outros métodos conhecidos na arte. Veja Hannon, GJ, 2002, RNA Interference, Nature 418: 244-251; Bernstein E et al., 2002, The rest is silence. RNA 7: 1509-1521; Hutvagner G et al., RNAi: Nature abhors a double-strand. Curr. Opin. Genetics & Development 12: 225-232; Brummelkamp de 2002, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 296:550-553; Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, e Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. Nature Biotechnol. 20:500-505; Miyagishi M, e Taira K. (2002). U6-promoter-driven siARNs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in

mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 20:497-500; Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, e Conklin DS. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells *Genes & Dev.* 16:948-958 ; Paul CP , Good PD , Winer I, e Engelke DR . (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnol.* 20:505-508 ; Sui G, Soohoo C, affar EB , Gay F , Shi Y, Forrester WC, e Shi Y.(2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 99 (6):5515-5520, Yu JY, DeRuiter SL, e Turner DL. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 99 (9):6047-6052.

Além dos moduladores conhecidos, moduladores de actividade CD223 adicionais que são úteis nos métodos da presente invenção podem ser identificados utilizando testes de dois híbridos, abordagens bioquímicas convencionais, e rastreio baseado em células, tais como moléculas de rastreio para candidatos com capacidade para se ligarem a CD223 ou de rastreio para compostos que inibam a actividade de CD223 em cultura de células. Como um exemplo, os presentes inventores identificaram uma lisozima de ovo de galinha (HEL), específica de 48-62, hibridoma 3A9 de células T restrito a H-2A^k que não expressa CD223, mesmo após a activação. A expressão ectópica do tipo selvagem, sem afectação da sinalização, a CD223 reduziu significativamente a resposta a IL-2 deste hibridoma de células T para o seu péptido específico. Isto fornece um sistema simples para ensaio *in vitro* para triagem de moduladores de actividade da CD223. Este último método pode identificar agentes que interagem directamente com CD223 e a modulam, assim como agentes que

modulam indirectamente a actividade da CD223, afectando um passo na via de transdução de sinal da CD223.

Os ensaios baseados em células que expressam CD223 empregues podem ter células que são isoladas a partir de mamíferos e que naturalmente expressam CD223. Alternativamente, as células que foram geneticamente modificadas para expressar CD223 podem ser utilizadas. De preferência, as células geneticamente modificadas são células T.

Os agentes que modulam a actividade da CD223, modulando a expressão do gene CD223 podem ser identificados com base em ensaios celulares de rastreio medindo quantidades da proteína CD223 nas células na presença e na ausência de agentes candidatos. A proteína CD223 pode ser detectada e medida, por exemplo, por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-CD223 monoclonais específicos. O mRNA de CD223 também pode ser detectado e medido utilizando técnicas conhecidas na arte, incluindo, mas não limitado a Northern blot, RT-PCR e hibridização de matriz.

Uma sequência alvo especialmente útil para a identificação de moduladores de CD223 é o aminoácido padrão KIEELE (SEQID NO: 5) na CD223 de domínio citoplasmático, que é essencial para a função de CD223, *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios de rastreio para os agentes que se ligam a este motivo irão identificar candidatos CD223 moduladores cuja actividade como um inibidor ou activador de CD223 pode ser ainda caracterizada por meio de testes adicionais, tais como em ensaios celulares. Esse motivo ("*motif*") pode estar presente em um polipéptido que consiste em 50 ou menos resíduos de aminoácidos contíguos de CD223. Alternativamente, o motivo pode estar contido dentro de uma proteína de fusão

que compreende uma porção de CD223 e toda ou uma porção de uma segunda (não-CD223) proteína. A segunda proteína pode ser uma proteína natural ou pode ser um polipéptido sintético, por exemplo, contendo uma *tag* de histidina, ou outra característica útil do polipéptido. Os ensaios de ligação proteína-proteína são bem conhecidos na arte e qualquer uma das várias técnicas pode ser utilizada.

A CD223 pode ser processada pós-tradução para produzir uma forma solúvel da proteína. A forma solúvel compreende, pelo menos, os resíduos de aminoácidos 1-431 de CD223 de ratinho, e, pelo menos, os resíduos de aminoácido 1-440 de CD223 humano. A cauda citoplasmática está ausente em todos os casos. Todo ou parte do domínio transmembranar está ausente. Esta forma solúvel modula as respostas do MHC restrito a classe II/células T CD4+. Assim, a forma solúvel, pode ser útil para administração aos pacientes de doenças autoimunitárias, pacientes com alergias, asmáticos, ou pacientes com cancro, por exemplo. A administração da forma solúvel pode ser efetuada por qualquer dos meios convenientes, incluindo administração por perfusão, tópica, ou intravenosa.

Inibidores de CD223 podem ser administradas a um organismo para aumentar o número de células T no organismo. Este método pode ser útil para o tratamento de organismos que sofrem de condições resultantes de uma reduzida população de células T. Tais condições incluem as doenças resultantes de imunodeficiência tais como a SIDA, assim como desordens que envolvem invasão celular indesejada ou do crescimento, tais como a invasão do organismo por microrganismos estranhos (bactéria ou vírus) ou o crescimento de tumor ou cancro.

Tal deficiência de células T é também um perigo para os doentes que receberam uma transferência de células estaminais após mioablação. As células T destes pacientes são comprometidas e deliberadamente um alvo para a destruição de modo que, podem ser substituídas por células T de dadores saudáveis. O processo de reconstituição de uma população de células T saudável de uma transferência de células estaminais pode levar vários meses, período durante o qual o paciente é muito suscetível a infeções oportunistas que podem pôr a vida em risco. Através da inibição da CD223 nas células T do dador ou utilizando as células T do dador que foram selecionados ou desenvolvidas para uma deficiência em CD223, a divisão de células T é aumentada e o processo de reconstituição de células T pode ser acelerado e o período de deficiência em células T pode ser reduzido.

Inibidores de CD223 podem também ser úteis quando administrados em associação com terapias convencionais para tratar distúrbios sensíveis à proliferação de células T. Por exemplo, um tumor, o qual é uma doença sensível à proliferação de células T, é convencionalmente tratado com um agente quimioterápico que funciona matando as células que se dividem rapidamente. Os inibidores de CD223 da presente invenção quando administrados em conjunto com um agente quimioterápico aumentam o efeito tumoricida do agente quimioterápico, estimulando a proliferação de células T, para aumentar a rejeição imunológica de células tumorais.

Activadores ou promotores da expressão de CD223 podem ser administrados a um organismo, para diminuir o número de células T no organismo e, assim, diminuir a actividade deletéria das células T. Este método pode ser útil para o tratamento de organismos que sofrem de condições resultantes

de uma população anormalmente elevada de células T ou a atividade deletéria de células T, por exemplo, rejeição de enxerto mediada pelo apresentador de células T vs enxerto, doenças autoimunitárias e inflamatórias tais como a artrite reumatóide, diabetes tipo 1, esclerose muscular, etc. Os métodos podem ser aplicados a qualquer organismo que contenha as células T que expressam CD223. Isto inclui, mas não está limitado a, qualquer mamífero e, em particular inclui humanos e ratinhos.

Quando os métodos da presente invenção são realizados *in vivo*, a quantidade efectiva de CD223 moduladora utilizada variará com o modulador específico a ser utilizado, a situação específica a ser tratada, a idade e condição física do indivíduo a ser tratado, a gravidade da situação clínica, a duração do tratamento, a natureza da terapia simultânea (se houver), a via de administração específica e factores semelhantes dentro do conhecimento e experiência do profissional de saúde. Por exemplo, uma quantidade eficaz pode depender do grau ao qual um indivíduo tem níveis anormalmente baixos de células T.

Quando administradas, as preparações farmacêuticas da presente invenção são aplicadas em quantidades aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico e em composições aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Estas preparações podem conter habitualmente um sal, agentes tampão, conservantes, veículos compatíveis, e facultativamente outros agentes terapêuticos. Quando utilizados em medicina, os sais devem ser aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, embora sais não aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico possam ser convenientemente utilizados para preparar sais seus derivados aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico e não serem excluídos do âmbito

da presente invenção. Tais sais aceitáveis sob os pontos de vista farmacêutico e farmacológico incluem, mas sem carácter imitativo, os sais preparados a partir dos ácidos seguintes: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, sucínico, e outros similares. Além disso, os sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico podem ser preparados como sais de metais alcalinos ou alcalino-terrosos, tais como sódio, potássio ou sais de cálcio.

Moduladores de CD223 podem associar-se, eventualmente, com um veículo aceitável em farmácia. A expressão "veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico" tal como é aqui utilizado, significa um ou mais diluente(s) ("filler", "diluentt" "encapsulating substances") sólido(s) ou líquido(s) compatível(eis) que são apropriados para administrar ao homem. O termo "veículo" significa um componente orgânico ou inorgânico, natural ou de síntese, com o qual o componente activo se associa para facilitar a administração. Os componentes das composições farmacêuticas são também capazes de se misturarem com as moléculas da presente invenção, e uns com os outros, de uma maneira tal que não há interacção capaz de prejudicar realmente a eficácia farmacêutica desejada.

As composições farmacêuticas podem conter agentes de tamponamento adequados, incluindo: um sal de ácido acético; um sal de ácido cítrico; um sal de ácido bórico; e um sal de ácido fosfórico. As composições farmacêuticas podem também conter, eventualmente, conservantes adequados, tais como: cloreto de benzalcónio, clorobutanol, parabenos e timerosal.

As composições apropriadas para administração parentérica são adequadamente compostas por uma preparação aquosa estéril do agente anti-inflamatório, que é preferencialmente isotónica com o sangue do receptor. Esta preparação aquosa pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos usando agentes dispersantes ou molhantes e agentes de suspensão adequados. A preparação injectável estéril pode também apresentar-se sob a forma de uma solução ou suspensão injectável estéril em um diluente ou solvente não tóxico aceitável para administração parentérica, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que se podem utilizar encontram-se a água, solução de Ringer, e solução isotónica de cloreto de sódio. Além disso, os óleos não voláteis, estéreis, são tradicionalmente utilizados como um solvente ou meio de suspensão. Para este fim pode utilizar-se qualquer óleo não volátil suave incluindo mono- ou diglicéridos de síntese. Além do mais, ácidos gordos tais como ácido oleico podem ser utilizados na preparação de injectáveis. As formulações dos veículos apropriadas para administração oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, etc. podem encontrar-se em Remington's Pharmaceutical Sciences; Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Estão disponíveis várias vias de administração. O modo específico escolhido dependerá, naturalmente, do fármaco escolhido, da gravidade da situação a ser tratada e da dosagem necessária para a eficácia terapêutica. Os métodos da invenção, de um modo geral, podem ser praticados com recurso a qualquer modo de administração que seja aceitável sob o ponto de vista médico, significando qualquer modo que produza níveis eficazes dos compostos activos sem causar efeitos adversos inaceitáveis sob o ponto de vista clínico. Tais modos de administração incluem as vias oral, rectal, tópica,

nasal, intradérmica, ou parentérica. O termo "parentérica" inclui subcutânea, intravenosa, intramuscular, ou perfusão. As vias intravenosa ou intramuscular não são especialmente adequadas para terapia a longo prazo e profilaxia. Elas podem, no entanto, ser preferidas em situações de emergência. A administração oral será preferida devido à conveniência para o paciente, bem como ao programa de dosagem.

As composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas sob a forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos bem conhecidos na arte farmacêutica. Todos os métodos incluem a fase de manutenção do agente activo em associação com um veículo composto por um ou mais componentes acessórios. Em geral, as composições são preparadas associando uniformemente e intimamente o agente activo com um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e depois, se necessário, moldando o produto.

As composições adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades distintas, tais como cápsulas, comprimidos, pastilhas, cada uma contendo uma quantidade pré-determinada do agente activo. Outras composições incluem suspensões em líquidos aquosos ou líquidos não aquosos tais como um xarope, elixir ou uma emulsão.

Outros sistemas de administração podem incluir sistemas de libertação em um determinado período, de libertação retardada ou de libertação contínua [(constante) "sustained"]. Tais sistemas podem evitar repetidas administrações do agente activo, aumentando a conveniência para o paciente e o médico. Muitos tipos de formas farmacêuticas de libertação estão disponíveis e são

conhecidos dos peritos na especialidade. Estes, incluem sistemas de base polimérica tais como poli(lactido-glicolido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido poli-hidroxibutírico, e polianidridos. Microcápsulas dos polímeros antecedentes contendo fármacos estão descritas em, por exemplo, Patente norte-americana No.5 075 109. Sistemas de administração incluem também sistemas não poliméricos que são: lípidos incluindo esteróis como o colesterol, ésteres de colesterol e ácidos gordos ou gorduras neutras, tais como mono-, di- e triglicéridos; sistemas de libertação à base de hidrogéis; sistemas à base de sislástico; sistemas à base de péptidos; revestimentos cerosos; comprimidos fabricados utilizando aglutinantes convencionais e excipientes; implantes parcialmente fundidos; e similares. Os exemplos específicos incluem, mas não estão limitados a: (a) sistemas de erosão em que o agente anti-inflamatório está acondicionado sob uma forma no interior de uma matriz tais como aqueles descritos nas Patentes de invenção norte-americanas N°s 4 452 775, 4 667 014, 4 748 034 e 5 239 660 e (b) sistemas de difusão em que um componente activo se difunde a uma velocidade controlada a partir de um polímero tal como descrito nas Patentes de invenção norte-americanas N°s 3 832 253 e 3 854 480. Mais ainda, sistemas de administração por bomba com *hardware* integrado podem ser utilizados, alguns dos quais são adaptados para implantação.

A utilização de um implante de libertação contínua [(constante) "*sustained*"] a longo prazo poderá ser particularmente adequada para o tratamento de condições crónicas. A libertação a longo prazo, aqui utilizada, significa que o implante é construído e organizado para administrar concentrações terapêuticas do componente activo

durante pelo menos 30 dias, e preferencialmente 60 dias. Implantes de liberação contínua [(constante) “*sustained*”] a longo prazo são bem conhecidos dos especialistas na matéria e incluem alguns dos sistemas de liberação descritos antes.

EXEMPLOS

Exemplo 1–Regulação Negativa da Homeostasia Celular pela LAG-3.(CD223)

O exemplo seguinte mostra que a LAG-3 (CD223) regula negativamente a homeostasia celular das células T CD4+ e CD8+, apoiando a sua identificação como um novo alvo terapêutico para acelerar o enxerto de células T após transplante de medula óssea.

Os ratinhos tipo selvagem C57BL/6 têm um número constante de células T $\alpha\beta$ + entre as 4-52 semanas de idade. Como anteriormente referido, ratinhos jovens LAG-3^{-/-} com 4 semanas de idade têm um número de células T normal. Miyazaki, T. *et al.*, Science 272:405-408 (1996). Em contraste, o número de células T $\alpha\beta$ + em ratinhos LAG-3^{-/-} aumenta progressivamente a partir dos 3 meses de idade, para números ~2 vezes superiores quando comparados com os ratinhos tipo selvagem. Esta diferença é altamente significativa, dada a regulação homeostática controlada do número de células T $\alpha\beta$ + evidenciado pelo desvio padrão muito baixo. Ambas as células CD4+ e CD8+ foram aumentadas em ratinhos LAG-3^{-/-}, mas o rácio CD4:CD8 permaneceu inalterado. Do mesmo modo, ratinhos LAG-3^{-/-} transgênicos para o TCR OT-II (ovalbumina específica para 339-326, restritos em H-2^{a,b}) aumentaram o número de células T CD4+ V α 2⁺ em comparação com ratinhos controlo tipo selvagem transgênicos para OT-II, no entanto estas diferenças foram

evidentes às 5 semanas de idade. Aproximadamente 20% das células T $\alpha\beta^+$ e das células NK CD49b⁺ expressam constitutivamente a LAG-3 em ratinhos tipo selvagem (Workman, CJ et al., Eur. J. Immunol 32:2255-2263 (2002)), e esta expressão aumentou, também, significativamente em ratinhos LAG-3^{-/-}. Surpreendentemente, vários outros tipos de células tais como as células B B220⁺, Gr-1⁺ granulócitos e Mac-1⁺ macrófagos, sendo que nenhuma destas expressa LAG-3, também viram os níveis de LAG-3^{-/-} aumentados em comparação com os ratinhos controle. O aumento no número de células observado em ratinhos LAG-3^{-/-} foi consistente com um aumento de ~50% do número células BrdU⁺ *in vivo*. É importante notar que a diferença no número de células observadas entre ratinhos LAG-3^{-/-} e de tipo selvagem foi altamente consistente e reproduzível. A ausência de LAG-3 não parece ter qualquer efeito significativo sobre o fenótipo da superfície celular de células T em ratinhos LAG-3^{-/-}. Estes dados suportam a ideia de que a LAG-3 regula o número de células T em ratinhos e, indiretamente afecta os números de leucócitos em geral.

Para determinar se a LAG-3 influencia a expansão homeostática das células T em um ambiente linfopénico, células T puras foram transferidas adoptivamente para ratinhos RAG^{-/-}, que carecem de células T e B, e o número de células T no baço foi determinado 15 dias pós-transferência. Houve um aumento de 2,8 vezes no número de células T LAG-3^{-/-} em comparação com o controle de tipo selvagem. Surpreendentemente, apenas uma pequena percentagem das células T do tipo selvagem expressa a LAG-3, apesar do efeito evidente que a ausência da LAG-3 tem sobre a expansão das células T. Infere-se que uma expressão breve e transitória de LAG-3 pode ser suficiente para ela exercer o seu efeito sobre as células em divisão. O aumento da expansão de células T

CD4⁺ e CD8⁺ foi observado o que demonstra que ambos os tipos de células foram igualmente afectados pela ausência de LAG-3. Curiosamente, houve também um aumento de duas vezes no número de células $\alpha\beta^-$ derivadas do hospedeiro nos receptores de LAG-3^{-/-} em comparação com as células T LAG-3^{+/+}. Este aumento foi consistente com o aumento do número de macrófagos e de granulócitos observado em ratinhos LAG-3^{-/-} não manipulados. Para garantir que o aumento da expansão das células T LAG-3^{-/-} observado nos ratinhos RAG^{-/-} é independente da especificidade do antígeno, foram utilizadas células T purificadas a partir de OVA [Ovalbumina 257-264 específica, restrita em H-2K^b; Hogquist, KA et al., Cell 76: 17-27 (1994)] e em ratinhos OT-II transgênicos [ovalbumina 326-339 específica, restrita em H-2K^b; Barnden, MJ et al., Immunol. Cell Biol. 76: 34-40 (1998)]. Células T OT-II CD4⁺ V α 2⁺ tipo selvagem expandem-se mal em ratinhos RAG^{-/-}, de acordo com trabalhos anteriores que indicam que estas células mostram pouca expansão homeostática em hospedeiros linfopénicos. Ernst, B. et al., Immunity 11: 173-181 (1999). Em oposição, esta limitação não se aplica às células T de ratinhos LAG-3^{-/-} OT-II transgênicos, que se expandem energeticamente em hospedeiros linfopénicos em números que foram mais de 3,2 vezes superiores aos das células T do tipo selvagem aos 15 dias após a transferência. Do mesmo modo, o número de células T LAG-3^{-/-} CD8⁺ V α 2 OVA transgênicas recuperadas de ratinhos RAG-1^{-/-} foi 4 vezes mais elevado do que em células T OVA de controlo de tipo selvagem. Notavelmente, esta diferença persistiu por, pelo menos, um mês após a transferência. Estes dados demonstram uma vez mais que tanto as células T CD4⁺ como as células T CD8⁺ são igualmente afectadas pela perda da LAG-3. Para avaliar a importância da ligação da LAG-3 a moléculas de MHC classe II, células T LAG-3^{-/-} e células T OVA transgênicas T de tipo selvagem foram transferidas para ratinhos sem moléculas de

MHC classe I e moléculas de classe II ($\beta 2m^{-/-}$ xH-2A $^{\beta b-/-}$). Os dados mostram claramente que o aumento de expansão das células T LAG-3 $^{-/-}$ é anulado na ausência de moléculas de MHC de classe II, demonstrando a importância desta interacção.

Ratinhos LAG-3 $^{-/-}$ ou receptores adoptivos de células T LAG-3 $^{-/-}$ têm números aumentados de células que são normalmente negativas para a LAG-3, tais como as células B e os macrófagos. Este facto suporta a ideia de que uma alteração no controlo da homeostasia das células T, devido à ausência da LAG-3, modifica directamente o controlo de outros tipos de células de leucócitos. Para testar directamente esta hipótese, as células B foram co-transferidas com células T LAG-3 $^{-/-}$ ou células T do tipo selvagem em ratinhos RAG $^{-/-}$. Utilizámos ainda esta abordagem para avaliar as funções contraditórias de moléculas de MHC de classe II na regulação da homeostasia de células T. Estudos anteriores demonstraram claramente que a expansão homeostática e a sobrevivência a longo prazo das células T CD4 $^{+}$ requerem uma interacção periódica com moléculas MHC de classe II. Takeda, S. *et al.*, *Immunity* 5: 217-228 (1996); Rooke, R., *et al.*, *Immunity* 7:123-134 (1997). Por outro lado, é possível que a interacção entre a LAG-3 e as moléculas de MHC de classe II tenham o efeito oposto. Como verificado anteriormente, houve um aumento de 3,0 vezes no número de células T LAG-3 $^{-/-}$ em comparação com as células T controlo de tipo selvagem quando transferidas com células B de MHC classe II $^{-/-}$. No entanto, na presença de células B do tipo selvagem, a diferença entre as células T LAG-3 $^{-/-}$ e as células T LAG-3 $^{+/+}$ aumentou 4,9 vezes. O aumento do número de células T LAG-3 $^{-/-}$ é provavelmente devido a um aumento da interacção MHC:TCR, potenciando, assim, a expansão. Em contraste, as células T LAG-3 $^{+/+}$ seriam submetidas a um controlo homeostático quer positivo (através da interacção

MHC:TCR) quer negativo (pela interacção MHC:LAG-3), o que resulta na expansão comparável de células T de tipo selvagem.

Na presença de células T de tipo selvagem, o número de células B recuperadas do baço 7 dias após a transferência foi idêntico ao dos ratinhos que receberam apenas as células B. Em oposição, houve um aumento de 2,7 vezes no número de células B recuperadas de receptores de células T LAG-3^{-/-}, o que providencia uma demonstração directa de que o aumento do número de células B foi devido à “desregulação” de células T LAG-3^{-/-}. Curiosamente, verificou-se um aumento no número de células B MHC de classe II na presença de células T do tipo selvagem em comparação com os ratinhos que receberam apenas as células B. Tal suporta a ideia de que a ausência ‘local’ da interacção LAG-3:MHC de classe II pode resultar no aumento da expansão de células B devido à desregulação transitória de células T do tipo selvagem, embora os ratinhos RAG^{-/-} receptores tenham macrófagos MHC de classe II⁺ e células dendríticas no baço. Outra hipótese é que a ligação das moléculas de MHC de classe II pela LAG-3 fornece um sinal de regulação negativa às células B, impedindo assim a expansão. Embora esta hipótese seja aceitável para as células B, não explica o aumento dos números de células de MHC de classe II, tais como os granulócitos, em ratinhos LAG-3^{-/-}. Uma possibilidade, que está a ser investigada, é que a expansão desregulada de células T LAG-3^{-/-} origina a sua produção de citocinas que induzem uma ampla expansão de muitos tipos de células.

A influência da expressão de LAG-3 na expansão homeostática em ratinhos linfopénicos não está limitada a células T ingénuas. A transferência de antigénios expostos a células T memória OT-II resultou, também na expansão

substancialmente acelerada de LAG-3^{-/-} em comparação com as células T nas células controlo de tipo selvagem [7,2 vezes mais]. Foi importante verificar que a LAG-3 foi directamente responsável por essa expansão das células T “desreguladas” e não um gene intimamente ligado que foi interrompido pela estratégia de marcação original. Assim, as células T LAG-3^{-/-} OT-II foram transduzidas com retrovírus com base em vírus de células estaminais de ratinho (MSCV) que continham quer LAG-3 de tipo selvagem quer um mutante com sinalização afectada, a LAG-3.ΔK^M. Workman, C.J. et al., Eur. J. Immunol. 32: 2255-2263 (2002). O vector também continha um local de entrada interno ribossomal (IRES) e uma cassete da proteína verde fluorescente (GFP) para facilitar a análise das células transduzidas. Persons, D.A. et al., Blood 90:1777-1786 (1997). As células T LAG-3^{-/-} e células T LAG-3+/+ OT-II também foram transduzidas com um vector “vazio”/GFP controlo. As células transduzidas foram transferidas para receptores RAG-1^{-/-} e o número de células T OT-II recuperadas 15 dias pós-transferência determinado. Tal como esperado, o controlo de células T LAG-3^{-/-} GFP expandiu-se mais do que as células GFP do tipo selvagem [2,8 vezes mais]. A expressão ectópica de LAG-3 reduziu o número de células T OT-II a um nível comparável ao do controlo de tipo selvagem, enquanto que a expressão do mutante LAG-3 com sinalização afectada não teve nenhum efeito sobre a expansão homeostática. Estes dados demonstram que a LAG-3 é directamente responsável pelos efeitos observados.

Os nossos dados mostram claramente que a LAG-3 regula negativamente a expansão homeostática das células T. Os dados apoiam, também, a ideia de que as células T podem contribuir para a homeostasia de muitos tipos celulares. Apesar do efeito evidente que a ausência de LAG-3 tem no número de

células T em ratinhos *knockout* e na expansão de células T em ratinhos linfopénicos, é notável que apenas uma percentagem muito pequena de células T expresse LAG-3. Curiosamente, a expressão ectópica da LAG-3 em todas as células T não tem um efeito maior sobre a expansão homeostática que o nível baixo da expressão transitória de LAG-3 visto em células do tipo selvagem. Tal sugere que o limiar para a sinalização de LAG-3 pode ser muito baixo, e que pode haver outros fatores que limitem o efeito da sinalização de LAG-3. Identificar a(s) molécula(s) de sinalização a jusante que interage(m) com a LAG-3 e a determinação do mecanismo através do qual a LAG-3 regula a expansão homeostática será claramente um importante foco de pesquisa futura.

Uma observação surpreendente foi o aumento do número de células que não expressam a LAG-3, tais como as células B e macrófagos. Experiências de co-transferência demonstraram claramente que a ausência de LAG-3 nas células T foi responsável pelo aumento observado de outros tipos de células. Tal facto pode dever-se a uma proteína da superfície celular ou solúvel que ou é induzida pela sinalização de LAG-3 que limita o número e/ou a expansão de outros tipos de células ou produzidas devido à ausência de regulação negativa pela LAG-3, que limita o número e/ou a expansão de outros tipos de células. A natureza exacta desta expansão e o seu papel fisiológico ainda não foram determinados.

Os pacientes que recebem medula óssea ou doses elevadas de transplantes de células estaminais são especialmente susceptíveis a infecções nos primeiros 4-6 meses, devido à baixa taxa de reconstituição de linfócitos. O nosso estudo suporta a ideia de que a LAG-3 é um alvo terapêutico viável e que o bloqueio da expressão ou da função da LAG-3 irá

acelerar o enxerto de células T e significativamente reduzir essa janela de susceptibilidade.

Exemplo 2-Materiais e Métodos

Este exemplo fornece os métodos experimentais e materiais para o exemplo 1.

Ratinhos: Foram utilizados os seguintes ratinhos: LAG-3^{-/-} [provenientes de Yueh-Hsiu Chen, Stanford University, Palo Alto, CA, com autorização de Christophe Benoist e Diane Mathis, Joslin Diabetes Center, Boston, MA; Miyazaki, T. et al., Science 272: 405-408 (1996)]; C57BL/6J [Jackson Labs, Bar Harbor, ME]; B6.PL-Thy1^a/Cy (Thy1.1 congénico) [Jackson Labs]; RAG-1^{-/-} [Jackson Labs, Bar Harbor, ME; Mombaerts, P. et al., Cell 68: 869-877 (1992)]; MHC de classe II^{-/-} [providenciado por Peter Doherty, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN; Grusby, M.J. et al., Science 253:1417-1420 (1991)]; MHC de classe I^{-/-}/II^{-/-} [Taconic, Germantown, NY; Grusby, M.J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90:3913-3917 (1993)]; ratinhos OT-II TCR transgênicos [providenciados por Stephen Schoenberger, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA, com autorização de William Heath, Walter e Eliza Hall Institute, Parkville, Victoria Australia; Barnden, M.J. et al., Immunol. Cell Biol. 76: 34-40 (1998)] e ratinhos OT-I (OVA) TCR transgênicos [Jackson Labs; Hogquist, K.A. et al., Cell 76: 17-27 (1994)]. A análise de microssatélites em uma série de genomas demonstrou que 97% dos 88 marcadores genéticos testados para ratinhos LAG-3^{-/-} foram gerados a partir de ratinhos B6 (Charles River Laboratories, Troy, NY). LAG-3^{-/-}, MHC de classe II^{-/-}, colônias OT-I.LAG-3^{-/-} e OT-II.LAG-3^{-/-} foram mantidas em St. Jude Animal Resource Center. Todos os ensaios com animais

foram feitos em um serviço SPF creditado pela AAALAC, segundo normas nacionais, estatais e institucionais. Os protocolos animais foram aprovados por St. Jude IACUC.

Segmentos ("constructs") de LAG-3 e a transdução retroviral: os segmentos de LAG-3 foram produzidos por PCR recombinante como descrito (Vignali, DAA e KM Vignali, J. Immunol 162:1431-1439 (1999)). O LAG-3.WT e LAG-3. Δ KM (LAG-3, com uma deleção do motivo conservado KIEELE na cauda citoplasmática) foram descritos (Workman, CJ et al., J. Immunol. 169: 5392-5395 (2002)). Os segmentos de LAG-3 foram clonados em um vector retroviral (MSCV) de vírus de células estaminais de ratinho, que contém um local de entrada ribossômica interno (IRES) e proteína fluorescente verde (GFP), e retrovírus produzido como descrito (Persons, DA et al., Blood 90: 1777-1786 (1997); Persons, DA et al., Blood Cells Mol Dis 24: 167-182 (1998)). As linhas celulares produtoras de retrovirais foram geradas por transdução repetida de células GPE+86 (7-10 vezes) até se obter um título viral superior a 10^5 /ml após 24 h (Markowitz, D. et al., J. Virol 62: 1120-1124 (1988)).

Citometria de fluxo: As suspensões de células isoladas prepararam-se a partir de baços de RBC e lisaram-se com solução de Gey. Os esplenócitos foram corados primeiramente com Fc Block, anti-CD16/CD32 (2.4G2) (BD PharMingen, San Diego, CA) durante 10 min em gelo. As células foram então coradas com os seguintes marcadores de superfície celular utilizando vários anticorpos conjugados a partir de BD-PharMingen: $\alpha\beta$ TCR + (H-57-597), V α 2 (B20.1), $\gamma\delta$ TCR (GL3), CD4 (RM4-4), CD8a (53-6,7), CD45R/B220 (RA3-6B2), CD11b/Mac1 (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5), CD44 (IM7), CD25/IL2R (7D4), CD69 (H1.2F3) e células CD244.2/NK (2B4). A expressão de LAG-3 foi

avaliada com um ratinho biotinilado anti-LAG-3 mAb (C9B7W, IgG1k;. Workman, CJ *et al.*, Eur. J..Immunol. 32: 2255-2263 (2002)) ou o mesmo anticorpo obtido como um conjugado de PE (BD PharMingen). As células foram em seguida analisadas por citometria de fluxo (Becton Dickinson, San José, CA).

Incorporação de Bromodeoxiuridina: Às 5, 16, 28 e 52 semanas de idade, ratinhos LAG-3^{+/+}, LAG-3^{-/-}, OTII.LAG-3^{+/+} e OTII.LAG-3^{-/-} receberam BrdU (Sigma, St. Louis, MO) na água de beber durante 8 dias (0,8mg/ml). Os ratinhos foram depois sacrificados por inalação de CO₂ e os baços removidos. A coloração para a incorporação de BrdU foi realizada como descrito (Flynn, KJ *et al.*, Proc Natl Acad Sci EUA 96:8597-8602 (1999)). Resumidamente, os esplenócitos de LAG-3^{-/-} e de LAG-3^{+/+} foram corados para a expressão de TCRαβ, CD4, CD8 e B220. Os esplenócitos de OTII.LAG-3^{+/+} e OTII.LAG-3^{-/-} foram corados para a expressão de Vα2 e CD4 (PharMingen). As células foram então fixadas com 1,2 ml de etanol a 95% arrefecido em gelo durante 30 min em gelo. As células foram lavadas e permeabilizadas com PBS + 1 % de paraformaldeído + 0,01 % de Tween 20 durante 1h à temperatura ambiente. As células foram então lavadas e incubadas com 50 KU de ADNase (stigma) em 0,15M de NaCl + 4,2 mm MgCl₂ pH 5,0, durante 10 min a 37 °C. O BrdU foi detectado através da adição de anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson) durante 30 min à temperatura ambiente e então analisado por citometria de fluxo.

Experiências de transferência adoptiva: as células T e/ou células B de esplenócitos foram separadas positivamente por FACS ou separadas negativamente pela separação com contas magnéticas (MACS). Para as purificações de FACS, os esplenócitos foram corados para a expressão de TCRhh, CD4 e CD8 e classificados por selecção positiva em MoFlow

(Cytomation, Ft. Collins, CO). Para a purificação negativa de MACS, os esplenócitos foram corados com PE-anti-B220 acoplado, o anti-Gr1 anti-Mac1, anti-TBR119 (eritrócitos), anti-CD244.2 (células NK) e anti-CD8 (negativo para a purificação de células T OTII transgênicas). As células foram então incubadas com contas magnéticas acopladas com o anticorpo anti-PE (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) e a seguir separadas negativamente em uma autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) para 90-95% de pureza. Em alguns ensaios, as células T foram marcadas com éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). As células foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em PBS com 0.1% de BSA a 1×10^7 células/ml e incubadas com CFSE 5 mM durante 10min a 37 °C. As células foram lavadas duas vezes com PBS suplementado com 0,1% BSA. As células T purificadas por CFSE ou marcadas com radioisótopos (5×10^6 ou 1×10^7) e, em alguns casos, células B (5×10^6) foram injectadas intravenosamente em ratinhos RAG-1^{-/-} ou 1.1⁺ (B6.PL).

Transdução retroviral de células T normais: baços de ratinhos OTII.LAG-3^{+/+} e OTII.LAG3^{-/-} foram removidos e suspensões de células individuais preparadas a 2.5×10^6 células/ml. Os esplenócitos foram activados com o péptido OVA 326-339 [10 µM] em cultura durante dois dias. Os esplenócitos activados foram então incubados com uma monocamada de células produtoras de retrovirais GFP, de LAG-3.WT/GFP ou LAG-3.ΔKM/GFP durante 2 dias na presença de polibreno. As células foram deixadas em repouso durante 10 dias e separadas pela expressão de Vα2⁺/CD4⁺/GFP⁺ por FACS. As células foram deixadas a repousar durante mais dois dias e, em seguida, 5×10^6 células foram injectadas em ratinhos RAG^{-/-} através da veia caudal. Quinze dias após a transferência, os ratinhos foram sacrificados por inalação de CO₂ e os baços removidos.

Os esplenócitos foram corados e analisados por citometria de fluxo.

Exemplo 3-Células Treg induzidas com potente actividade regulatória

De modo a identificarem-se moléculas específicas de Treg, foi realizada uma análise da expressão diferencial de genes de antígenos específicos das células T diferenciando-as em células efectoras/memória em resposta à infecção viral ou células Treg mediante interação com antígeno cognato como um auto-antígeno. Esta análise revelou que o gene LAG-3 foi selectivamente regulado positivamente nas células Treg. O papel fisiológico da LAG-3, um homólogo de ligação de CD4 MHC de classe II, ainda não foi totalmente elucidado. Vários estudos *in vitro* sugerem que a LAG-3 pode ter uma função de regulação negativa (Hannier et al., 1998, Huard et al., 1994; Workman et al., 2002a; Workman et al., 2002b). Demonstra-se aqui que a expressão membranar de LAG-3 marca selectivamente as células Treg independentemente de CD25 e que a LAG-3 modula tanto *in vitro* como *in vivo* a actividade supressora das células Treg.

Para o estudo das diferenças entre as células T efectoras/memória e a indução de tolerância, utilizámos a transferência adoptiva do receptor de células T (TCR) de células T CD4+ transgénicas (clone 6.5) específico para um antígeno modelo da hemaglutinina (HA). Em ratinhos tipo selvagem infectados com o vírus vaccinia recombinante que expressa HA (Vac-HA), células T CD4+ 6.5 específicas de HA adoptivamente transferidas diferenciam-se em células efectoras/memória após contacto com HA. A resposta de memória/efetora é caracterizada por uma fase típica de

expansão/contração e o desenvolvimento de marcadores de memória. Quando removidas do animal adotivamente transferido, essas células efetoras/memória são hiper-respondedoras à HA *in vitro* relativamente às células T CD4⁺ 6.5 tal como ensaiado através do antígeno específico da resposta proliferativa e produção de interferon- γ . Esta resposta de memória persiste por meses após a transferência adoptiva. Em contraste, a transferência adoptiva de células T CD4⁺ 6.5 em ratinhos transgênicos C3-HA, que expressam HA em múltiplos tecidos epiteliais, resulta em tolerância (Adler *et al.*, 2000, Adler *et al.*, 1998). Semelhante à resposta efetora/memória há uma fase rápida de expansão/ativação caracterizada por uma proliferação e expressão de citocinas efetoras, tais como interferon- γ . No entanto, após a fase de ativação, a população de células T específicas de HA contraem e as células residuais 6.5 não conseguem produzir interferon- γ ou proliferar *in vitro* mediante a estimulação do antígeno, 4-7 dias após a transferência adoptiva (Adler *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2003). A extinção da capacidade de produção de linfocinas tais como a IL-2 e γ -interferon e a proliferação em resposta ao antígeno representa a definição operacional padrão do fenótipo anérgico.

A intensidade inicial da fase efetora *in vivo* em ratinhos C3-HA, que precede a indução de tolerância, é proporcional para o número de células T CD4⁺ 6.5 transferidas adoptivamente, bem como o nível de expressão do antígeno de HA em ratinhos recetores. Assim, ratinhos C3-HA^{low} toleram a transferência de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ 6.5 bastante bem, mas ratinhos C3-HA^{high}, que têm a expressão de HA 1 000 vezes superior que nos ratos C3-HA^{low}, morrem entre 4-7 dias após a transferência de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ 6.5 (Fig.1A). A causa de morte é vasculite pulmonar letal devido à infiltração de

células T CD4⁺ 6.5 transgênicas no pulmão, onde a expressão de HA é mais elevada. A transferência adoptiva de menos de $2,5 \times 10^5$ células T CD4⁺ 6.5 em ratinhos C3-HA^{high} provoca vasculite pulmonar de menor gravidade e os destinatários sobrevivem (Fig.1A) (Huang et al., 2003). Curiosamente, células T CD4⁺ 6.5 transferidas a uma dose subletal adquirem um fenótipo regulatório, uma vez que são capazes de proteger os ratinhos da morte após perfusão subsequente de que seria uma dose letal de células T CD4⁺ 6.5 em ratinhos C3-HA^{high} desprotegidos. Esta função de regulação *in vivo* é extremamente potente, visto que a transferência de tão poucas quanto 8 000 células (0,3% da dose letal) protege completamente os animais da morte após perfusão subsequente de $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ 6.5 ingênuas. Esta protecção é observada logo em 4 dias após a transferência inicial e permanece ativa até 6 meses (Fig.1A). Depleção de células T CD4⁺, mas não células T CD8⁺, antes da transferência adoptiva elimina totalmente o efeito protector, definindo assim o fenótipo Treg das células T CD4⁺ 6.5 clonotípicas anergizadas.

A supressão da pneumonia letal é acompanhada por uma acumulação das células T 6.5 (Treg) nos pulmões e uma redução drástica do número de infiltração de células T efetoras da segunda perfusão. Em vez de se acumularem nos pulmões, como ocorre na ausência de células T reguladoras, as células T efetoras acumulam-se na bainha peri-arteriolar linfática do baço (Fig.1B). Outra evidência de que as células anérgicas têm função Treg vem da constatação de que estas células inibem a activação de células T CD8⁺ citotóxicas específicas de HA *in vivo* (dados não apresentados). A eliminação de células T CD25⁺ antes da primeira transferência adoptiva (protecção) não afecta o desenvolvimento de células T

reguladoras capazes de proteger os animais de uma estimulação letal subsequente com células T 6.5. Assim, é provável que o fenótipo Treg das células T iniciais tenha sido adquirido após a transferência adoptiva em vez de ser consequência das células Treg naturais entre a população adoptivamente transferida. Estes resultados são altamente concordantes com os resultados publicados por Von Boehmer e colegas, que demonstram que células T CD4⁺ 6.5 se tornaram tolerantes após a transferência em ratinhos transgênicos que expressam HA no compartimento de células B, exibem de facto função Treg (Jooss *et al.*, 2001).

Exemplo 4-A LAG-3 é diferencialmente expressa em células Treg induzidas

Com o intuito de identificar genes associados com o fenótipo anérgico/Treg no nosso sistema *in vivo*, foi realizada a análise em chip Affymetrix em células T CD4⁺ 6.5 após a transferência adoptiva em recipientes não-transgênicos seguida de imunização por Vac-HA para gerar células T de memória/efetoras ou, após a transferência em ratinhos C3-HA^{high} para gerar células anérgicas/Treg. Células T 6.5 congênicas Thy1.1(+)Thy1.2(-) foram purificadas a partir de tipo selvagem Thy1.1(-)Thy1.2(+) infectadas com Vac-HA (efetoras/memória) ou destinatários C3HA^{high} (anérgicas/Treg) através de um procedimento de isolamento sequencial com coluna MACS de depleção de células T CD8⁺, células B e células T Thy1.2(+), seguindo-se a separação por citometria de fluxo para grau de pureza >95%. Este protocolo evita a utilização de anticorpos específicos de TCR e de co-receptor de CD4, que poderiam potencialmente alterar o padrão de expressão génica dependente de TCR ou de CD4.

O ARN foi isolado a partir de células T CD4⁺ 6.5 ingênuas como amostra do dia 0 e isolado a partir de células T CD4⁺ 6.5 nos dias 2, 3 e 4 de pós-transferência adoptiva para análise em chip. Os genes que foram diferencialmente expressos entre as populações anérgicas/Treg e as populações efectoras/memória foram ordenados de acordo com um algoritmo que resumiu a sua expressão diferencial a partir de 0-4 dias. Um número surpreendentemente elevado de genes foi activado selectivamente em populações anérgicas/Treg mesmo nos instantes iniciais de pós-transferência adoptiva. Muitos destes genes ESTs representados sem função conhecida. Entre os genes que foram previamente identificados, a LAG-3 estava entre os mais diferencialmente expressos em populações anérgicas/Treg em relação às populações efectoras/memória. Este resultado foi subsequentemente validado por análise de RT-PCR com um LAG-3 par de oligonucleótidos sonda para vários períodos de tempo até 1 mês após a transferência adoptiva. Após um aumento mínimo inicial nas células efectoras/memória, a expressão de LAG-3 retorna à linha de base, 20 dias pós-transferência adoptiva. Em um contraste flagrante, a expressão de LAG-3 aumenta 20-50 vezes nos primeiros 5 dias entre populações de células anérgicas/Treg e permanece elevada ao longo da análise nas 4 semanas subsequentes (Fig.2A). Por outro lado, os níveis de FoxP3, e GITR e CTLA-4 apresentaram aumentos modestos (1,5-4 vezes) que foram semelhantes em ambas as células de memória/efectoras e nas células anérgicas/Treg induzidas durante os primeiros 4-5 dias (dados não apresentados).

A expressão de LAG-3 na superfície celular em populações de células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg relativamente a células T CD4⁺ 6.5 efectoras/memória foi analisada com um anticorpo monoclonal anti-LAG-3 (Workman et al., 2002b) (fig.

2B). Apesar dos níveis muito reduzidos da coloração de LAG-3 nas células efectoras/memória, uma proporção significativa de células anérgicas/Treg de ratinhos C3-HA^{high} transgênicos exibe níveis moderados a elevados de LAG-3, correlacionando-se com os resultados de expressão génica. Como IL-10 é comumente associada com a diferenciação e a função de Treg (Moore et al., 2001), analisámos os níveis endógenos de mRNA de IL-10 e a sua correlação com os níveis de mRNA de LAG-3 em subconjuntos de células T CD4⁺ a partir de ratinhos C3-HA^{high} (células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg). A análise de amostras múltiplas de populações anérgicas/Treg durante vários ensaios revelou uma correlação entre o nível de mRNA de LAG-3 e o nível de mRNA de IL-10 com um coeficiente de correlação (R²) de 0,87 (Fig.2C).

Exemplo 5-A LAG-3 é necessária para a função máxima de Treg

A expressão de LAG-3 na superfície celular em populações de células T CD4⁺ 6.5 anérgicas/Treg foi analisada utilizando anticorpos anti-LAG-3 e anticorpos monoclonais anti-CD25, de forma coordenada. Apesar de proporções semelhantes de efectoras/memória e anérgicas/Treg as células expressam CD25 (dados não apresentado), a expressão de LAG-3, e de CD25 em células anérgicas/Treg não estava completamente concordante (Fig.3A). Posto isto, separámos as células em populações LAG-3^{high}CD25^{high}, LAG-3^{high}CD25^{low}, LAG-3^{low}CD25^{high}, e LAG-3^{low}CD25^{low} e analisámos a sua actividade regulatória em um ensaio padrão de supressão *in vitro*. A supressão *in vitro* de respostas proliferativas, entre células T CD4⁺ 6.5 ingênuas revelou que a população LAG-3^{high}CD25^{high} exibiu a maior actividade supressora, a população de LAG-3^{low}CD25^{low} teve a menor enquanto que, a actividade supressora das células LAG-3^{high}CD25^{low} e LAG-3^{low}CD25^{low} eram comparáveis (Figura 3B).

Estes resultados sugerem que, dentre as células Treg induzidas, a associação de LAG-3 e de CD25 pode seleccionar células Treg com a maior actividade supressora.

Para melhor avaliar o papel directo de LAG-3 na regulação da supressão por células Treg induzidas, determinou-se primeiramente se os anticorpos anti-LAG-3 podiam bloquear a capacidade de células que expressam LAG-3 de suprimirem *in vitro* as respostas proliferativas de células T específicas para HA ingénuas. Os anticorpos anti-LAG-3 em uma concentração de 2µg/ml inibem a supressão pelas células T Treg CD4⁺ 6.5 no sistema de ensaio *in vitro* (Figura 4). Durante o período de ensaio de 2 dias, os anticorpos anti-LAG-3 não afectaram as respostas proliferativas das células T 6.5 estimuladas na ausência de Treg, confirmando-se que o efeito de anticorpos anti-LAG-3 era de facto sobre as células Treg e não sobre as células efetoras (dados não apresentados). A capacidade dos anticorpos anti-LAG-3 para bloquear *in vitro* a supressão por células Treg demonstra que a LAG-3 não é simplesmente um marcador selectivo de Treg, mas é também uma molécula que modula a actividade Treg.

Exemplo 6—A LAG é necessária para a actividade induzida por Treg *in vivo*

Avaliámos, de seguida, o papel da LAG-3 na modulação da função Treg *in vivo*, determinando se a administração de anticorpos anti-LAG-3 podem bloquear a supressão de pneumonia letal por Tregs em ratinhos C3-HA^{high}. Os ratinhos C3-HA^{high} foram pré-tratados com 8 000 células T CD4⁺ 6.5 (dose subletal), e de seguida por uma dose de 6.5 $2,5 \times 10^6$ células T CD4⁺ ingénuas 4 dias após a primeira transferência. Como descrito antes, nesta fase as Tregs já se desenvolveram. Um

anticorpo anti-LAG-3 (200 µg) foi administrado i.v. juntamente com a subsequente estimulação com $2,5 \times 10^6$ células 6.5 e outras de 200 µg foram administradas 2 dias mais tarde. Este tratamento com o anticorpo elimina totalmente *in vivo* a actividade supressora das células Treg e os ratinhos morreram em um período de tempo comparável aos ratinhos C3-HA^{high} letalmente estimulados sem protecção do pré-tratamento subletal com 6.5. Por outro lado, os ratinhos tratados com Treg estabelecidas e tratadas com o anticorpo de controlo de isotipo (IgG1 de rato) ou sem anticorpo sobreviveram ao estímulo subsequente com $2,5 \times 10^6$ células T 6.5 ingénuas (Figura 5A). Embora estes resultados sugiram que os anticorpos anti-LAG-3 bloqueiam a actividade Treg *in vivo*, uma possibilidade alternativa formal foi a de que, ao invés de inibirem directamente as células Treg, os anticorpos anti-LAG-3 hiperactivam as células T na população estimulada de tal forma que eles conseguem ultrapassar os efeitos inibitórios das Tregs. Para descartar esta possibilidade, questionámos se a administração *in vivo* de anticorpos anti-LAG-3, juntamente com uma dose de apenas células T 6.5 abaixo do limiar de letalidade iria provocar letalidade na ausência de uma população Treg preestabelecida. Por conseguinte, administrámos $2,5 \times 10^5$ células T 6.5 (a dose máxima que não provoque letalidade) ou $8,0 \times 10^5$ células T 6.5 (cerca de 50% de letalidade entre 7 a 14 dias após a transferência) em ratinhos C3-HA^{high} em conjunto com anticorpos anti-LAG-3 ou anticorpos de controlo de isotipo. A Figura 5B mostra que o tratamento com anti-LAG-3 não igualou a dose letal de $2,5 \times 10^5$ de células T 6.5 nem aumentou a letalidade parcial da dose de $8,0 \times 10^5$ de células T 6.5. Portanto, o efeito dos anticorpos anti-LAG-3 no ensaio representado da Figura 5A teve como objetivo a inibição direta das células Treg.

Exemplo 7-A LAG-3 é expressa pelas células Treg naturais e é necessária para a actividade supressora

Considerados em conjunto, estes dados confirmam um papel importante para a LAG-3 na mediação da função supressora de Treg induzidas. Tendo em conta que a relação entre Treg induzidas e Treg naturais ainda não é claro, é de interesse verificar se LAG-3 é expressa selectivamente em células T CD4⁺ CD25⁺ de ratinhos de tipo selvagem. O mRNA de LAG-3 (juntamente com o mRNA de CTLA-4, FoxP3 e GITR) é, expresso selectivamente em células CD4⁺ CD25⁺ em comparação com as células CD4⁺ CD25⁻ (Fig.6A). Apesar desta constatação ser reprodutível, não conseguimos detectar LAG-3 na superfície em ambas as células CD4⁺ CD25⁺ ou CD4⁺ CD25⁻ por coloração com anticorpos. No entanto, a coloração com anticorpo em células permeabilizadas indicou claramente que 10-20% das células CD4⁺ CD25⁺ expressam reservas intracelulares de LAG-3. A coloração de contraste de células permeabilizadas CD4⁺ CD25⁻ demonstra a inexistência de uma população LAG-3⁺ (Figura 6B). Estes resultados sugerem que pelo menos algumas Tregs naturais possuem reservas intracelulares de LAG-3, que podem ser rapidamente recrutadas para a superfície da célula após contacto com o antigénio cognato e posteriormente mediar a supressão. Enquanto as Treg naturais estão contidas dentro da população de células T CD4 e são definidas pelas CD25, é possível que as células Treg reais sejam aquelas que expressam intracelularmente LAG-3. Para avaliar directamente o papel de LAG-3 na função reguladora natural das Tregs, questionámos se os anticorpos anti-LAG-3 poderiam inibir in vitro a supressão mediada pelas células T CD4⁺ CD25⁺ purificadas. A Figura 6C demonstra que os anticorpos anti- LAG-3 bloqueiam realmente a supressão mediada pelas células T CD4⁺ CD25⁺ purificadas, o que sugere

que a LAG-3 desempenha um papel na supressão mediada pelas Treg naturais e induzidas. A coloração das células CD4+CD25+, no final do ensaio de supressão *in vitro* revelou que cerca de 20% expressam níveis elevados de LAG-3 na sua superfície, apoiando a noção de que a LAG-3 intracelular é mobilizada para a superfície sob circunstâncias em que o TCR está ocupado e medeia a actividade reguladora (Figura 6D).

Exemplo 8-A expressão ectópica de LAG-3 confere actividade regulatória

Os ensaios de bloqueio nas Figuras 5 e 6 sugerem que a LAG-3 é necessária para a função máxima das Treg. Para melhor validar esta conclusão, realizou-se uma série ensaios de transdução para determinar se a expressão ectópica da LAG-3 nas células T confere a actividade reguladora. Para estas experiências, células T CD4+ 6.5 foram primeiramente depletadas de quaisquer Tregs CD25+ “naturais” e transduzidas com vetores retrovirais baseados em MSCV que codificam a GFP apenas, a GFP + LAG-3 tipo selvagem ou GFP + um mutante LAG-3.Y73FΔCY que reduziu substancialmente afinidade por MHC de classe II e não pode mediar a sinalização a jusante (Workman *et al.*, 2002a). Depois de um período de repouso de 10 dias, não foi observada coloração endógena de LAG-3 em células T CD4+ 6.5 GFP+ transduzidas com o vector de MSCV-GFP, no entanto observaram-se níveis elevados de coloração LAG-3 em células 6.5 GFP+ transduzidas com o MSCV-LAG-3/GFP e vectores MSCV-LAG-3.Y73FΔCY/GFP. As células GFP+ de cada grupo foram seleccionadas e misturadas em diferentes proporções com a APC, o péptido HA¹¹⁰⁻¹²⁰ e células CD4+CD25- 6.5 em um ensaio de proliferação. Como mostrado na Figura 7, as células 6.5 que expressam a LAG-3 de tipo selvagem suprimem fortemente a proliferação de células 6.5 ingénuas, enquanto que não se

observou supressão com o controlo de células 6.5 GFP transduzidas ou células que expressam o mutante de LAG-3.Y73FΔCY não funcional. A proliferação encontrava-se aumentada nos dois últimos grupos, uma vez que as próprias células 6.5 GFP e LAG-3.Y73FΔCY transduzidas proliferam além do ensaio com células 6.5 ingénuas. As células T LAG-3 do tipo selvagem transduzidas demonstraram, de facto, uma redução significativa das respostas proliferativas além de inibirem a proliferação das células 6.5 não-transduzidas. Estes resultados fornecem evidências diretas que confirmam o papel funcional da LAG-3 na supressão. Curiosamente, a transdução de LAG-3 não induziu outros genes associados com as Tregs, incluindo Foxp3, CD25, CD103 e GITR (dados não apresentados). Este resultado, juntamente com a falta de expressão diferencial significativa destes genes entre as células T 6.5 diferenciadas em fenótipos efectoras/memória vs anérgicas/Treg, sugere que a LAG-3 pode mediar uma via distinta da função das células T independente da regulação da via de Foxp3.

Exemplo 9-Discussão

Estes resultados identificam a LAG-3, tal como uma molécula da superfície celular selectivamente regulada positivamente em células Treg que podem estar directamente envolvidas na mediação da função das Treg. Tendo em conta os muitos sistemas em que a actividade das Treg naturais e induzidas foi definida, resta determinar se a LAG-3 é um marcador de Treg “universal” ou se marca selectivamente apenas determinados subconjuntos Treg. Os nossos resultados sugerem que, para além de Treg CD4+ induzidas, as células LAG-3 têm um papel na mediação de supressão por células Treg CD4+CD25+ naturais. Além disso, outros dados experimentais

demonstram um papel para a LAG-3 na regulação da expansão de linfócitos homeostático por Treg natural (Workman e Vignali, anexos ao artigo). A descoberta de que a expressão de LAG-3 é significativamente maior entre células T CD4+CD25+ de ratinhos de tipo selvagem sugere que pode desempenhar um papel na função das Treg naturais, bem como na das induzidas. Como sugerido pelos ensaios na Figura 3, a associação da LAG-3 e CD25 pode definir subconjuntos de Treg com actividade supressora mais potente. Não propomos que a LAG-3 seja um “marcador de linhagem” para Treg por ser expressa em níveis variáveis, que se correlacionam com a magnitude da actividade reguladora em ensaios *in vitro*. Na verdade, não é claro que as Treg representam uma linhagem estável ou um estado de diferenciação capaz de promover a tolerância de forma celularmente não autónoma (von Boehmer, 2003). Diferentes mecanismos foram definidos para a função Treg em sistemas diferentes (revisto em Shevach, 2002). Células LAG-3^{high} produzem maiores quantidades de IL -10 e exibem actividade aumentada de supressão *in vitro*, mas o papel da IL -10 na mediação da função supressora no nosso sistema continua por determinar. Os anticorpos para LAG-3 inibem a actividade supressora de células Treg, tanto *in vitro* como *in vivo*. Como tal, propomos que a LAG-3 é um receptor específico de Treg ou co-receptor que modula a actividade supressora deste subconjunto de células T.

Vários estudos sugeriram um papel inibitório celularmente autónomo para a LAG-3 (Huard *et al.*, 1994, Workman *et al.*, 2002b), contudo estudos iniciais com ratinhos KO para LAG-3 não conseguiram descobrir qualquer evidência de auto-imunidade ostensiva ou de hiper-imunidade (Miyazaki *et al.*, 1996). Dada o papel por nós proposto para a LAG-3 na função das Treg, espera-se que ratinhos LAG-3 KO exibam

autoimunidade de sistema múltiplo (ou seja, semelhante ao *Knockout* para *Foxp3* ou ratinhos *scurfy*), o que não foi avaliado nestes ratinhos. No entanto, tratam-se de defeitos claros nas células T reguladoras presentes nos ratinhos *LAG-3 Knockout*, tais como um defeito na regulação da homeostasia celular (Workman e Vignali, anexo ao artigo). Encontramo-nos a reexaminar os ratinhos mais velhos *LAG-3 Knockout* para a verificação de uma evidência mais sutil da autoimunidade de início tardio, como foi observada em ratinhos *PD-1 Knockout* (Nishimura *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001). É também concebível que outros mecanismos reguladores pudessem ter sido reforçados nestes ratinhos para compensar a perda da expressão de *LAG-3*.

Por ser expressa em níveis mais elevados em células Treg, a *LAG-3* fornece um excelente alvo potencial para a manipulação selectiva da actividade Treg para tratamento de cancro e doenças autoimunitárias. O *CD25*, o marcador padrão de preferência para Treg, é induzido em níveis elevados em células activadas, sendo um componente fundamental do complexo receptor da *IL-2*. O facto de aparentemente as células T *CD4+ CD25+* serem enriquecidas em actividade Tregs não é por o *CD25* ser específico para a função Treg, mas sim porque as células Treg são cronicamente estimuladas por contacto continuado com o auto-antigénio disponível na periferia. Mais recentemente, o recetor *TNF* membro da super-família de 18 moléculas (também chamado *GITR*) demonstrou estar regulado positivamente em células Treg. Mais ainda, os anticorpos para *GITR* têm sido descritos para inibição da actividade de Treg tanto *in vivo* como *in vitro*. No entanto, o *GITR* é igualmente regulado positivamente em células T activadas e, portanto, aparentemente, não é mais selectivo como marcador para células Treg que o *CD25* (McHugh *et al.*,

2002; Shimizu *et al.*, 2002). Por outro lado, existem vários estudos que mostram que as populações de células CD4+CD25- podem suprimir certas funções imunitárias (Annacker *et al.*, 2001; Apostolou *et al.*, 2002; Curotto de Lafaille *et al.*, 2001; Graca *et al.*, 2002; Shimizu e Moriizumi, 2003; Stephens e Mason, 2000). No entanto, a descoberta de que as células CD25^{high}LAG-3^{high} exibem maior actividade supressora sugere que os anticorpos contra ambas estas moléculas de superfície celular podem ser utilizadas para manipular coordenadamente a actividade Treg.

Os nossos dados demonstram que a LAG-3 é necessária para a actividade supressora máxima de ambas as células Treg naturais e induzidas. No entanto, será suficiente? Até agora, a única molécula que mostra conferir actividade reguladora nas células T activadas é a Foxp3 (Fontenot *et al.*, 2003, Hori *et al.*, 2003). Essencialmente demonstrámos aqui que a expressão ectópica da LAG-3, mas não um mutante funcionalmente afectado, em células T CD4+ também pode conferir uma actividade reguladora.

Outra questão fundamental é saber se as células Treg suprimem a reactividade dos linfócitos nas células efetoras CD4+ e CD8+ através interações T-T directas ou através de intermédios DC. A identificação de expressão selectiva e funcional de Treg da LAG-3, uma molécula de ligação ao MHC de classe II, deverá proporcionar uma nova pista na dissecação de mecanismos e manipulação da função das Treg para doenças nas quais estas células desempenham um papel importante.

Exemplo 10–Procedimentos Experimentais

Ratinhos Transgénicos

Os ratinhos C3-HA transgênicos foram previamente descritos (Adler *et al.*, 2000, Adler *et al.*, 1998). Em suma, o gene da hemaglutinina (HA) derivado do vírus da gripe A/PR/8/34 (estirpe Mount Sinai) foi colocado sob o controle do promotor C3 (1) de rato. Duas linhas fundadoras foram estabelecidas no plano de fundo genético B10.D2. Estas duas linhas fundadoras, C3-HA^{high} e C3-HA^{low}, que contêm 30-50 e 3 cópias do transgene, respectivamente, expressam o mRNA híbrido de C3-HA, no mesmo conjunto de tecidos não linfóides, incluindo o pulmão e a próstata. Enquanto a diferença na expressão total da proteína HA entre C3-HA^{high} e C3-HA^{low} não foi medida directamente, no pulmão e na próstata, onde os níveis de expressão são mais elevados, a diferença é cerca de 1 000 vezes superior, como mostrado pelo ensaio biológico de libertação de citocinas por hibridomas induzidas em extractos de tecidos.

A linha de ratinhos transgênicos TCR 6.5, que expressa um TCR que reconhece um epitopo restrito a I-E^d-HA (110SFERFEIFPKE120; SEQ ID NO: 7) (generosamente cedida pelo Dr. Harald von Boehmer, Universidade de Harvar, Boston, MA), foi retrocruzada nove gerações com o fundo genético B 10.D2. O outro ratinho TCR transgênico linhagem Clone-4, que expressa um TCR que reconhece um epitopo HA restrito a K^d (518IYSTVASSL526; SEQ ID NO: 8) (generosamente fornecido pela Dra. Linda Sherman, Scripps Research Institute, La Jolla, CA), foi também retrocruzada mais de 9 gerações no fundo genético Thy1.1/1.1 B10.D2. Atendendo a que nenhum anticorpo clonotípico está disponível para a linhagem Clone-4 TCR, Thy 1.1 foi utilizado como marcador substituto. Após a transferência adoptiva em receptores Thy1.2/1.2, é possível supor que todas as células T CD8⁺ Thy1.1⁺ expressam o TCR clonotípico específico para HA como quase todas as células T

CD8+ maduras em ratinhos clone-4 que reconhece diretamente o epítipo HA restrito a K^d (Morgan *et al.*, 1996).

Os ratinhos transgênicos utilizados nos ensaios tinham entre 8 a 24 semanas. Todas as experiências envolvendo a utilização de ratinhos foram realizadas de acordo com os protocolos aprovados pelo Animal Care and Use Committee de Johns Hopkins University School of Medicine.

Transferência adoptiva

Células T CD4+ ou CD8+ clonotípicas foram preparadas a partir de baços e de gânglios linfáticos reunidos de ratinhos 6.5 ou clone-4 transgênicos. A percentagem clonotípica foi determinada por análise de citometria de fluxo. O marcador de activação CD44 foi analisado para garantir que estas células clonotípicas não estavam activadas em ratinhos doadores e eram de fenótipo ingénuo. Depois de três lavagens com HBSS, um número adequado de células foi ressuspenso em 0,2 ml de HBSS para injeção i.v. na veia da cauda.

Imuno-histoquímica

Os tecidos foram recolhidos a partir de ratinhos três dias após a transferência adoptiva. O tecido foi fixado em ImmunoHistoFix (A Phase sprI, Bélgica) durante 3 dias a 4 °C e, em seguida, incorporado em ImmunoHistoWax (A Phase sprI, Bélgica). Coraram-se cortes seriados utilizando o mAb anti-Thy1.1 marcado com biotina (PharMingen, San Diego, CA). O kit ABC Vectastain (Vector, Burlingame, CA) e NovaRed (Vector) foram utilizados. Os cortes foram contrastados com hematoxilina QS (Vector). Os cortes foram analisados com câmara Nikon Eclipse E800. O processamento final de imagem

foi realizado com recurso ao Adobe PhotoShop (Mountain View, CA).

Enriquecimento e purificação de células T CD4⁺ 6.5 activadas ("primed") in vivo

Com quer indução de moléculas efetoras/memória quer de tolerância *in vivo* após a transferência adoptiva, a percentagem de células T CD4⁺ 6.5 clonotípicas em baços de ratinhos receptores é de apenas 0,2% a 5%. O enriquecimento deliberado e a purificação são acções obrigatórias para a obtenção de suficientes células T CD4⁺ clonotípicas para estudos posteriores, como por análise genética em chip Affymetrix. Doadores de células T 6.5 foram cruzados para com um fundo genético Thy1.1(+)/Thy1.2(-), o que permitiu um enriquecimento em dois passos e procedimentos de purificação após a transferência adoptiva em recipientes Thy1.1(-)/Thy1.2(+). As células T CD4⁺ 6.5 foram enriquecidas utilizando primeiramente os anticorpos anti-CD8 biotinilados (Ly-2, 53-6.7), anti-B220 (RA3-6B2), e anti-Thy1.2(30-H12) (todos adquiridos da BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA) e microgrânulos esféricos de streptovidina MACS e coluna de separação MACS LS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), para remover as células T CD8⁺, as células B e as células T receptoras (Thy 1.2+). Uma vez que as células T CD4⁺ e CD8⁺ são as únicas que têm Thy1.1, e porque as células T CD8⁺ haviam sido depletadas durante o enriquecimento, de classificação para Thy1.1 células (+) utilizando um classificador de células FACSVantage SE (BD Biosciences) resultou em uma população de células T CD4⁺ 6.5 altamente pura (95%). Esta técnica evita o uso de anticorpos específicos de TCR e de anticorpos específicos do co-recetor

de CD4 que poderiam potencialmente alterar os padrões de expressão genética dependentes de TCR ou de CD4.

Análise genética em chip

As células separadas sofreram cisalhamento em colunas Qiashredder (Qiagen, Valencia CA), seguidas de isolamento total de ARN utilizando o kit RNeasy (Qiagen). O cADN foi sintetizado utilizando o kit Superscript Choice (Gibco/BRL) e um primer T7-DT purificado por HPLC (Proligo, Boulder, CO). A sonda de cARN biotinilado foi preparada utilizando o kit BioArray RNA Transcript de ENZO (Affymetrix, Santa Clara, CA). Os chips de genes de murino U174A, B e C foram hibridados e analisados de acordo com protocolos padrão de Affymetrix.

Ranking da expressão diferencial de genes em células T CD4+ entre indução anérgica/Treg e indução de moléculas efetoras/memória

O mARN foi preparado a partir de células T CD4+ 6.5 clenotípicas ingênuas e anérgicas/Treg e efetoras/memória durante vários dias após os quais, a transferência adoptiva foi analisada por análise genética em chip Affymetrix. A expressão diferencial de genes entre indução anérgica/Treg e indução de moléculas efetoras/memória foi classificada pela "distância". A distância foi definida como a soma das diferenças absolutas entre a expressão de células T anérgicas e células T efetoras/memória no dia 2 ($|d1|$), dia 3 ($|d2|$), e no dia 4 ($|d3|$) após a transferência adoptiva, dividido pelo valor de células T CD4+ ingênuas (n) para a normalização.

Anticorpos e coloração

Foram utilizados os seguintes anticorpos. Anti-LAG-3 (C9B7W, de PharMingen) (Workman et al., 2002b) ou PE conjugado ou purificado, anti-CD25 (7D4, de PharMingen), quer purificado ou conjugado com FITC, e anti-GITR (poli-anticorpo clonal adquirido a R&D Systems). Para a coloração da superfície celular para LAG-3 e CD25, esplenócitos de ratinhos 6.5+/-Thy1.1+/- transgênicos foram isolados e enriquecidos para CD4+ utilizando um kit de isolamento por selecção negativa de CD4+ (Miltenyi Biotec). Aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células 6.5 clonotípicas, como determinado por citometria de fluxo (16% do total de células CD4+) foram ressuspensas em HBSS e injectadas na veia da cauda em 137 (C3-HÁ high) ou B10.D2 tipo selvagem. Tratou-se um grupo de ratinhos B10.D2 com 5×10^6 Vac-HA, enquanto o outro grupo foi deixado sem tratamento para controlo ingénuo. Os esplenócitos e os gânglios inguinais e linfáticos axilares foram recolhidos cinco dias mais tarde, e preparados como uma suspensão de células únicas. As RBCs foram lisadas com tampão de lise ACK. As células foram imediatamente bloqueadas com 5 µg de IgG completa de rato (Sigma) durante 15 minutos antes da coloração com os anticorpos anti-6.5 TCR-biotina + S -APC, LAG-3-PE, e CD25-FITC, ou os controlos de isotipo correspondentes. Todos os reagentes de coloração, excepto o anti-6.5-biotina foram adquiridos à Pharmingen (San Diego, CA). Depois de uma curta incubação, as amostras foram lavadas uma vez em PBS+1% de FBS e lidas em um aparelho FACScalibur (BD, San Jose, CA).

Ensaio de supressão in vitro para células T 6.5 reguladoras induzidas

1×10^4 células T CD4+ 6.5 ingênuas purificadas (respondedoras) e 1×10^5 esplenócitos B10.D2 singênicos irradiados com a dose 3000-rad (células apresentadoras de antígenos) misturaram-se com diferentes números de células T CD4+ 6.5 supressoras e incubaram-se em placas de cultura de tecidos de fundo redondo com 96 poços com 10 µg/ml de péptido HA de classe II (110SFERFEIFPKE120; SEQ NO: 7) em 200 µl de meio de CTL. Quarenta e oito a 72 horas mais tarde, as culturas foram pulsadas com 1 µCi de ^3H -timidina e incubaram-se por mais 16 horas antes da colheita com um sistema automático de colheita de células ("Packard Micromate cell harvester"). A determinação da quantidade de contagens da radioactividade incorporada foi realizada com um contador de cintilações (Packard Matrix 96 direct beta counter) (Packard Biosciences, Meriden, CT).

Ensaio de supressão in vitro para células T reguladoras naturais

Ratinhos BALB/c de tipo selvagem foram utilizados para ensaios de Treg naturais. 5×10^4 células T CD4+CD25- seleccionadas por citometria de fluxo (respondedoras) e 5×10^4 esplenócitos de BALB/c irradiados com 3000-rad (células apresentadoras de antígenos) misturaram-se com números diferentes de células T CD4+CD25+ supressoras por citometria de fluxo e incubadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços de fundo redondo com 0,5 µg/ml de anticorpo anti-CD3, em 200 µl de meio CTL. Quarenta e oito a 72 horas mais tarde, as culturas foram pulsadas com 1 µCi de ^3H -timidina e incubadas durante mais 16 horas antes da recolha com um sistema automático de colheita de células Micromate Packard. A determinação da quantidade de contagens da radioactividade incorporada foi realizada com um contador de cintilações

(Packard Matrix 96 direct beta counter) (Packard Biosciences, Meriden, CT).

Análise quantitativa por PCR em Tempo Real

As células T CD4⁺ seleccionadas foram imediatamente utilizadas para a extração de ARN utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada com Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os níveis de cADN foram analisados por PCR quantitativa em tempo real, com o sistema de Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada amostra foi analisada em duplicado ou triplicado para o gene alvo, juntamente com o rARN 18S como referência interna em 25 µl de volume reaccional final, utilizando o Taqman Universal PCR Master Mix e o sistema de detecção de sequência ABI Prism 7700. Os reagentes reaccionais pré-preparados (PDARs) foram fornecidos por Applied Biosystems para detecção de IL-10 e de IL-2. Os conjuntos de par de primers e sonda foram desenhados utilizando o software Primer Express e, em seguida, sintetizados através de Applied Biosystems para LAG-3, CD25, GITR e IFN-γ. O conjunto de primers e de sonda utilizado para Foxp3 encontrou-se citado na literatura (S4). As frequências de mARN relativas determinaram-se por normalização em relação ao ARN 18S do controlo interno. Resumidamente, normalizou-se cada conjunto de amostras utilizando a diferença de os ciclos de limiar (Ct) entre o gene alvo e o ARN 18S: $\Delta Ct_{\text{sample}} = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{18S})$. A amostra de calibração foi designada como a amostra com a mais elevada ΔCt em cada conjunto de ensaio ($\Delta Ct_{\text{calibration}}$). As frequências relativas de mARN foram calculadas como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{calibration}} - \Delta Ct_{\text{sample}})$. Os conjuntos de primers e de sonda utilizados são: a LAG-3 Primer 5'- TCA ACA ACC AGA CAG TGG CCA- 3' (SEQ ID NO: 9

)/Primer 5'- GCA TCC CCT GGT GAA GGT C-3'(SEQ ID NO: 10)/Sonda 5'-6FAM- CAC ACT CCC ATC CCG CCG C - TAMRA -3' (SEQ ID NO: 11); CD25 Primer 5' -TGT ACC ATG AGG CAC CCG TC- 3 '(SEQ ID NO: 12)/Primer 5' - TTA GGA TGG TGC CGT TCT TGT -3 '(SEQ ID NO: 13)/Sonda 5'- 6FAM -CCA ATG CAT TCA AAG CCA TCT CCC CC- TAMRA -3 ' (SEQ ID NO : 14); GITR Primer 5' -TCC GGT CCT GTG TTG GTG -3 '(SEQ ID NO: 15)/Primer 5' - AAC AGT CTG CAG TGA CCG TCA 3 '(SEQ ID NO: 16)/Sonda 5'- 6FAM -CAT GGG CAC CTT CTC CGC AGG T- TAMRA -3 ' (SEQ ID NO : 17); IFN- γ Primer 5'- TGA CAT AAG CCT AGA TCT AAG GAA AAT C -3 '(SEQ ID NO: 18)/Primer 5' - TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG -3 '(SEQ ID NO : 19)/Sonda 5'- 6FAM - TCA CCA TTT TCC TGC CAG TTC CTC CAG- TAMRA -3 ' (SEQ ID NO : 20); Foxp3 Prime 5'- CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT -3 '(SEQ ID NO: 21)/Prime 5' - TTC TCA CAA CCA GCG CAC TTG -3' (SEQ ID NO: 22)/Sonda : 5'- 6FAM - ATC CTA CAC ACT GCT GCG AAA TGG AGT C -3 '(SEQ ID NO: 23).

Segmentos ("constructs") de LAG-3 e linhas celulares produtoras retrovirais

Os segmentos de LAG-3 foram produzidos com recurso a PCR recombinante, como descrito (Vignali e Vignali, 1999). O LAG-3.WT e o mutante funcionalmente nulo LAG-3.Y73F. Δ CY (LAG-3 sem cauda citoplasmática com uma mutação pontual que reduz muito a capacidade da LAG-3 se ligar ao MHC de classe II) têm sido descritos (Workman *et al.*, 2002a). Os segmentos de LAG-3 foram clonados em um vector retroviral baseado em vírus de células estaminais de murino (MSCV), que contém um local interno de entrada ribossomal (IRES) e proteína fluorescente verde (GFP). A GFP e o retrovírus prepararam-se como descrito (Persons *et al.*, 1997; Persons *et al.*, 1998). As linhas celulares produtoras retrovirais foram geradas por transdução repetida de células GPE+86 (~7-10 vezes) até se obter um

título viral superior a 10^5 /ml após 24 h (Markowitz et al., 1988).

Transdução retroviral de células T CD4+/CD25- e ensaio de supressão in vitro

Os esplenócitos de ratinhos 6.5 foram corados com anticorpos biotinados anti-B220, anti-Gr1, anti-Mac1, anti-Ter119, anti-CD49b, anti-CD8 e anti-CD25 (PharMingen, San Diego, CA). As células foram incubadas com esferas magnéticas acopladas a estreptavidina e separadas negativamente em autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn CA) até 90-95% de pureza de células T CD4+/CD25. As células T CD4+/CD25 purificadas foram activadas por ligação em placa a anti-CD3 (2C11) e anti-CD28 (35.71). Nos dias 2 e 3 pós-estimulação, as células T activadas (4×10^5 células/ml) foram transduzidas por rotação ("spin") (90min, 3000 rpm) com sobrenadante viral proveniente apenas do vector, linha celular produtora LAG-3.WT/GFP ou GPE+86 LAG-3.Y73F. Δ CY/GFP retroviral descrita antes mais IL-2 e polibreno (6 μ g/ml). As células foram deixadas em repouso durante 10 dias e depois separadas no máximo ~30-35% células T GFP+/Thy1.2⁺.

Para o ensaio de supressão *in vitro*, as células T GFP+ purificadas foram colocadas em cultura (diluições duplas a partir de $2,5 \times 10^4$) com $2,5 \times 10^4$ de células T CD4+/CD25-6.5 (purificadas por AutoMACS negativas), 5×10^4 esplenócitos irradiados (3000 rads) e 5 μ g/ml HA110-120 em uma placa de 96 poços de fundo redondo. As células foram cultivadas durante 72 horas e pulsadas as últimas 7-8 h em cultura com 1 μ Ci de [³H]-timidina/poço (Du Pont, Wilmington, DE).

Exemplo 11

A CD223 é clivada a partir da superfície da célula e libertada sob uma forma solúvel (sLAG-3). São geradas quantidades significativas de células T activadas *in vitro*. (5 µg/ml) e são também encontradas no soro de ratinhos (80 ng/ml). É provável que tenham sido geradas por uma protease da superfície celular. Detectou-se sLAG-3 por Western Blot. A clivagem ocorre na região transmembranar (por exemplo, aminoácidos 442-466 na SEQ ID NO: 2) ou na região do conector (por exemplo, aminoácidos 432-441 na SEQ ID NO: 2) que imediatamente antecede a amino-terminal.

Exemplo 12

Como demonstrado antes, a LAG-3 não só é necessária para a função máxima das células T reguladoras (Treg) mas também é suficiente. Por outras palavras, a expressão de LAG-3 individualmente é suficiente para converter células a partir de células T efetoras activadas em células T reguladoras.

A seguir quisemos determinar se as células que expressam a LAG-3 ectopicamente poderão também exibir função reguladora *in vivo* e se estarão protegidas em um cenário de doença. Questionámos se a expressão ectópica de LAG-3 em células T específicas de auto-antigénios poderiam proteger ratinhos da diabetes tipo 1. Neste sistema experimental, os esplenócitos de ratinhos NOD propensos a diabetes foram transferidos adoptivamente para ratinhos NOD-SCID, que carecem de linfócitos. Todos os ratinhos desenvolvem diabetes dentro de 3 meses. A nossa análise preliminar sugere que o aparecimento da diabetes induzida por esplenócitos NOD é

impedido por células T específicas da fognina transduzidas com a LAG-3, mas não um mutante de sinalização afectada ou o controlo GFP. Estes dados suportam a ideia de utilização da expressão ectópica de células T específicas de auto-antígenos com LAG-3 como uma nova terapêutica para o tratamento de muitas doenças autoimunitárias, asma e alergias.

Referências

- Adler, A. J., Huang, C. T., Yochum, G. S., Marsh, D. W., and Pardoll, D. M. (2000). In vivo CD4⁺ T cell tolerance induction versus priming is independent of the rate and number of cell divisions. *J Immunol* 164, 649-655.
- Adler, A. J., Marsh, D. W., Yochum, G. S., Guzzo, J. L., Nigam, A., Nelson, W. G., and Pardoll, D. M. (1998). CD4⁺ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 187, 1555-1564.
- Almeida, A. R., Legrand, N., Paplemik, M., and Freitas, A. A. (2002). Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol* 169, 4850-4860.
- Annacker, O., Buren-Defranoux, O., Pimenta-Araujo, R., Cumano, A., and Bandeira, A. (2000). Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol* 164, 3573-3580.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Buren-Defranoux, O., Barbosa, T. C., Cumano, A., and Bandeira, A. (2001). CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166, 3008-3018.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and Von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3, 756-763.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.
- Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2002). CD4⁺ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* 14, 771-778.
- Curotto de Lafaille, M. A., Muriglan, S., Sunshine, M. J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G. C., Wensky, A. K., Olivares-Villagomez, D., and Lafaille, J. J. (2001). Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* 194, 1349-1359.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Graca, L., Thompson, S., Lin, C. Y., Adams, E., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2002). Both CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 168, 5558-5565.
- Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., and Triebel, F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol* 161, 4058-4065.

- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Huang, C.-T., Huso, D. L., Lu, Z., Wang, T., Zhou, G., Kennedy, E. P., Drake, C. G., Morgan, D. J., Sherman, L. A., Higgins, A. D., et al. (2003). CD4⁺ T Cells Pass Through an Effector Phase During the Process of In Vivo Tolerance Induction. *J Immunol* 170, 3945-3953.
- Huard, B., Tournier, M., Hercend, T., Triebel, F., and Faure, F. (1994). Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4⁺ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24, 3216-3221.
- Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-6327.
- Jooss, K., Gjata, B., Danos, O., von Boehmer, H., and Sarukhan, A. (2001). Regulatory function of in vivo anergized CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8738-8743.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Maloy, K. J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62, 1120-1124.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.
- Miyazaki, T., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science* 272, 405-408.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
- Morgan, D. J., Liblau, R., Scott, B., Fleck, S., McDevitt, H. O., Sarvetnick, N., Lo, D., and Sherman, L. A. (1996). CD8⁺ T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* 157, 978-983.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151.
- [Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-322.
- Persons, D. A., Allay, J. A., Allay, E. R., Smeyne, R. J., Ashmun, R. A., Sorrentino, B. P., and Nienhuis, A. W. (1997). Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo. *Blood* 90, 1777-1786.
- Persons, D. A., Mehaffey, M. G., Kaleko, M., Nienhuis, A. W., and Vanin, E. F. (1998). An improved method for generating retroviral producer clones for vectors lacking a selectable marker gene. *Blood Cells Mol Dis* 24, 167-182.
- Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common

role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18-32.

Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.

Shimizu, J., and Morizumi, E. (2003). CD4+CD25- T Cells in Aged Mice Are Hyporesponsive and Exhibit Suppressive Activity *J Immunol* 170,1675-1682.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3,135-142.

Stephens, L. A., and Mason, D. (2000). CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol* 165, 3105-3110.

Stutmuller, R. P., van Duivenvoorde, L. M., van Elsas, A., Schumacher, T. N., Wildenberg, M. E., Allison, J. P., Toes, R.E., Offringa, R., and Melief, C. J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of auto-reactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194, 823-832.

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003). CD4+CD25+ T Cells Regulate Virus-specific Primary and Memory CD8+ T Cell Responses. *J Exp Med* 198, 889-901.

Vignali, D. A., and Vignali, K. M. (1999). Profound enhancement of T cell activation mediated by the interaction between the TCR and the D3 domain of CD4. *J Immunol* 162, 1431-1439.

von Boehmer, H. (2003). Dynamics of Suppressor T Cells: In Vivo Veritas. *J Exp Med* 198, 845-849.

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

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

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

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

<120> T-cell Regulation

<130> 001107.00427

<150> 60/451,039
<151> 2003-02-28

<150> 60/482,143
<151> 2003-06-24

<150> 60/531,704
<151> 2003-12-22

<160> 23

<170> FastSEQ for windows version 4.0

<210> 1

<211> 1566

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

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

<223> murine LAG-3

<221> CDS

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

<223> murine LAG-3 protein

<221> sig_peptide

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

<400> 1

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

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

```

ggg tta cct ggc tcc cgg ggg aag ctg ttg tgt gag gta acc ccg gca 1104
Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala
335 340 345

tct gga aag gaa aga ttt gtg tgg cgt ccc ctg aac aat ctg tcc agg 1152
Ser Gly Lys Glu Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Asn Asn Leu Ser Arg
350 355 360

agt tgc ccg ggc cct gtg ctg gag att cag gag gcc agg ctc ctt gct 1200
Ser Cys Pro Gly Pro Val Leu Glu Ile Gln Glu Ala Arg Leu Leu Ala
365 370 375

gag cga tgg cag tgt cag ctg tac gag ggc cag agg ctt ctt gga gcg 1248
Glu Arg Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Arg Leu Leu Gly Ala
380 385 390

aca gtg tac gcc gca gag tct agc tca ggc gcc cac agt gct agg aga 1296
Thr Val Tyr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala His Ser Ala Arg Arg
395 400 405 410

atc tca ggt gac ctt aaa gga ggc cat ctc gtt ctc gtt ctc atc ctt 1344
Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Val Leu Val Leu Ile Leu
415 420 425

ggt gcc ctc tcc ctg ttc ctt ttg gtg gcc ggg gcc ttt ggc ttt cac 1392
Gly Ala Leu Ser Leu Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Phe Gly Phe His
430 435 440

tgg tgg aga aaa cag ttg cta ctg aga aga ttt tct gcc tta gaa cat 1440
Trp Trp Arg Lys Gln Leu Leu Leu Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His
445 450 455

ggg att cag cca ttt ccg gct cag agg aag ata gag gag ctg gag cga 1488
Gly Ile Gln Pro Phe Pro Ala Gln Arg Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg
460 465 470

gaa ctg gag acg gag atg gga cag gag ccg gag ccc gag ccg gag cca 1536
Glu Leu Glu Thr Glu Met Gly Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
475 480 485 490

cag ctg gag cca gag ccc agg cag ctc tga 1566
Gln Leu Glu Pro Glu Pro Arg Gln Leu *
495

```

<210> 2

<211> 521

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(22)

<223> leader sequence

<221> TRANSMEM

<222> (442)...(466)

<221> DOMAIN

<222> (432)...(441)

<223> connecting

<221> DOMAIN

<222> (467)...(521)

<223> cytoplasmic tail

<400> 2

Met Arg Glu Asp Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Leu Leu Trp

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

<210> 3

<211> 1578

<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

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

<400> 3

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

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

```

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

```

```

gaa ccg gag ccc gag ccc gag ccc gag ccg gag cag ctc tga      1578
Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu *
                               495                               500

```

<210> 4

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(22)

<221> TRANSMEM

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

<221> DOMAIN

<222> (475)...(525)

<223> CYTOPLASMIC TAIL

<221> DOMAIN

<222> (465)...(474)

<223> CONNECTING PEPTIDE

<400> 4

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60
 His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95
 Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110
 Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140
 Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175
 Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190
 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205
 Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220
 Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 260 265 270
 Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335
 Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 340 345 350
 Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 360 365
 Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
 370 375 380
 Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
 405 410 415
 Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
 420 425 430
 Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
 435 440 445
 His Leu Leu Leu Phe Leu Thr Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 450 455 460
 Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480
 Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495
 Ser Lys Ile Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Lys Ile Glu Glu Leu Glu
 1 5

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

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(8)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 6

Gln Xaa Lys Ile Glu Glu Leu Glu
 1 5

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

<400> 7

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

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

<400> 8

Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu

1 5

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 9
 acaicaacca gacagtggcc a 21

<210> 10
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 10
 gcaicccctg gtgaaggtc 19

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 11
 ccaciccga tccggccct 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 12
 tgtatgaacc acccgaggtc 20

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13
 itaggatgt gccgtcttg t 21

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 14
 ccaatgccac attcaagcc ctctcc 26

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 15
 tccggttgt tgcctgtg 18

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 16
 caaagtcgc agtgaccgtc a 21

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 17
 catgggcacc ttctccgag gt 22

 <210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 18
 cattgaaagc ctagaaagtc tgaataac 28

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 19
 tggctctgca ggattttcat g 21

 <210> 20
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 20
 tcaccatctt ttggccagtt cctccagtam ra 32

 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 21
 cccaggaaag acagcaacct t 21

 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 22
 ttctcacaac caggccactt g 21

 <210> 23
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 23
 atctaccca ctgctggcaa atggagtc 28

Lisboa, 12 de Novembro de 2013.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição que consiste em:

anticorpos que se ligam especificamente a CD223 e bloqueiam a sua capacidade de funcionamento; e
uma vacina anti-cancro composta por antigénios tumorais isolados ou polipéptidos isolados compreendendo um ou mais epítomos de antigénios tumorais.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1., que se apresenta sob a forma de uma composição farmacêutica.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1., na qual os anticorpos são anticorpos monoclonais.

4. Kit ("estojo") composto por:

anticorpos que se ligam especificamente a CD223 e bloqueiam a sua capacidade de funcionamento; e
uma vacina anti-cancro que compreende antigénios tumorais isolados ou polipéptidos isolados compreendendo um ou mais epítomos de antigénios tumorais.

5. Kit de acordo com a reivindicação 4., em que os referidos anticorpos e a referida vacina se apresentam em recipientes separados.

6. Kit de acordo com a reivindicação 4., que inclui ainda as instruções para a administração dos componentes desse kit a um paciente com cancro.

7. Anticorpo que se liga especificamente a CD223 e bloqueia a sua capacidade de funcionamento e vacina anti-cancro composta por antigénios tumorais isolados ou polipéptidos isolados compreendendo um ou mais epítomos de antigénios tumorais para utilização no tratamento de cancro.
8. Anticorpo que se liga especificamente a CD223 e bloqueia a sua capacidade de funcionamento e vacina anti-cancro composta por antigénios tumorais isolados ou polipéptidos isolados compreendendo um ou mais epítomos de antigénios tumorais para utilização no tratamento de cancro em um paciente com células T reguladoras que suprimem a resposta imunitária a uma vacina anti-cancro.
9. Anticorpo e vacina anti-cancro para utilização de acordo com a reivindicação 8., em que o anticorpo é monoclonal.
10. Agente inibidor da proteína CD223 ou do mRNA de CD223 escolhido entre:

um anticorpo que se liga especificamente à proteína CD223 e bloqueia a sua capacidade de funcionamento; um oligonucleótido anti-sentido que se liga especificamente ao mRNA de CD223; uma ribozima que se liga especificamente ao mRNA de CD223; uma molécula de ARN de interferência que se liga especificamente ao mRNA de CD223; e um segmento ("*construct*") anti-sentido que codifica o referido oligonucleótido anti-sentido, e uma vacina anti-cancro composta por antigénios tumorais isolados ou polipéptidos isolados compreendendo um ou mais epítomos de antigénios tumorais,

para utilização no tratamento do cancro em um mamífero através do aumento do número de células T nesse mamífero.

11. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é um anticorpo que se liga especificamente à proteína CD223 e bloqueia a sua capacidade de funcionamento.
12. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é um segmento ("*construct*") anti-sentido que expressa uma molécula de ARN anti-sentido que é complementar de pelo menos 7 nucleótidos do mARN de CD223.
13. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é um oligonucleótido anti-sentido que é complementar de pelo menos 7 nucleótidos do mARN de CD223.
14. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é uma ribozima que se liga especificamente ao mARN de CD223.
15. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é uma molécula de ARN de interferência a qual se liga especificamente ao mARN de CD223.
16. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o mamífero é um paciente com cancro.

17. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é para administração com uma população de células T específicas do tumor.
18. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é para administração com um fármaco quimioterápico anti-cancro.
19. Agente inibidor para utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o agente inibidor é para administração com anticorpos anti-cancro.

Lisboa, 12 de Novembro de 2013.

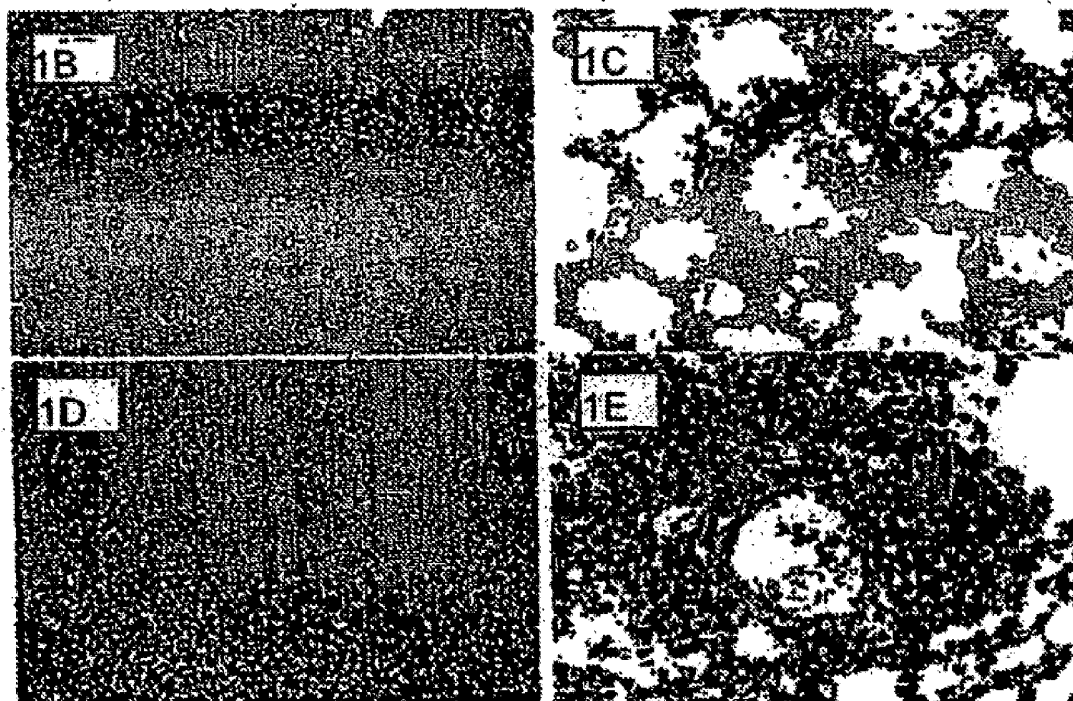
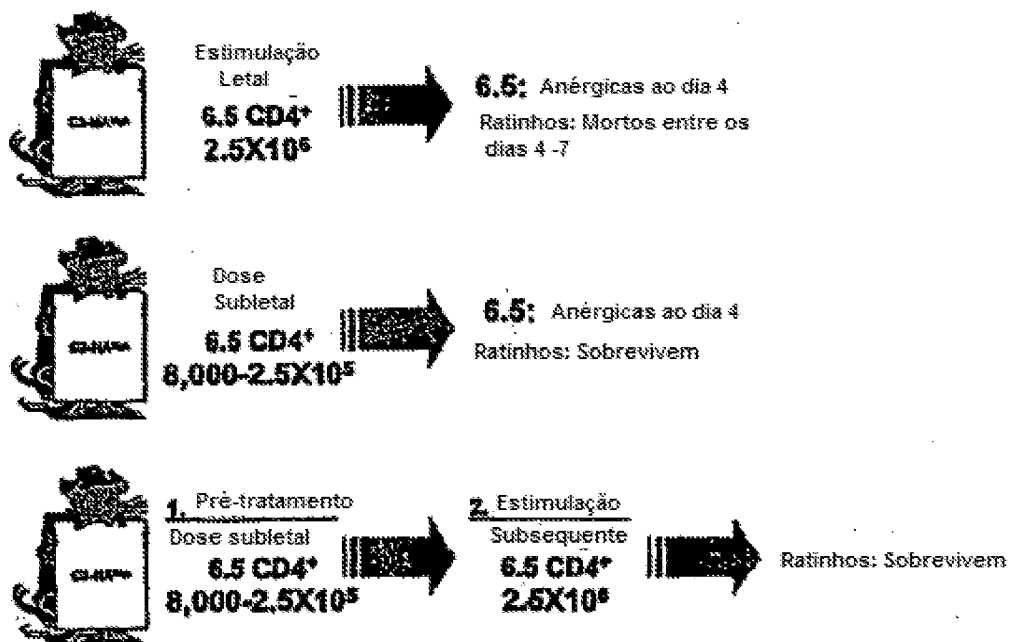


Fig. 2A

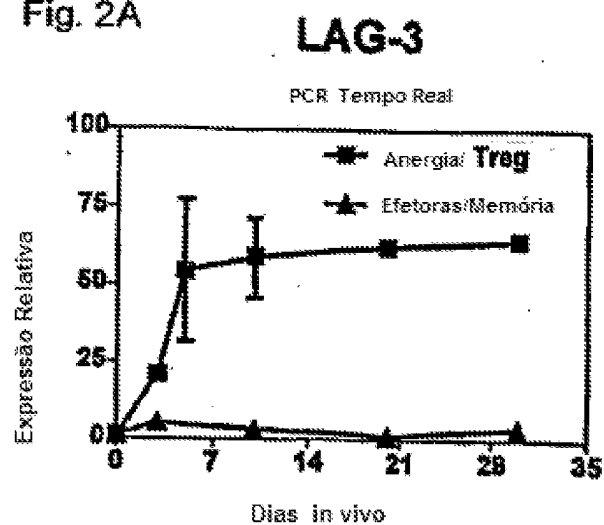


Fig. 2B

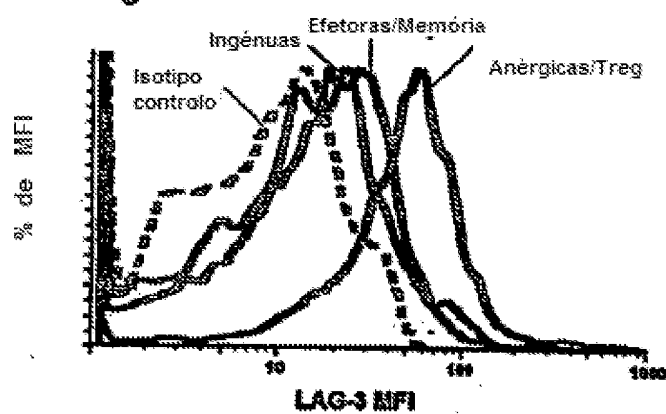


Fig. 2C

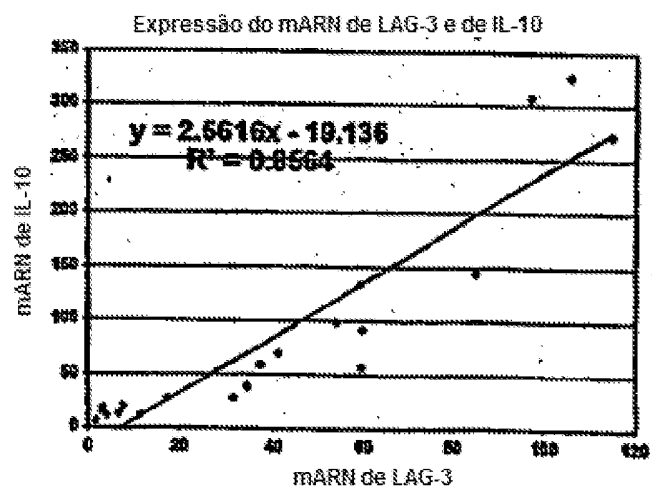


Fig. 3A

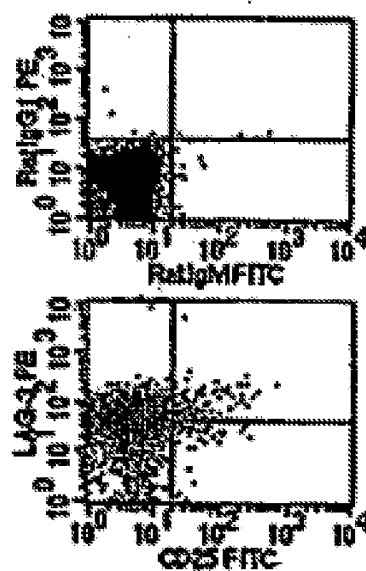


Fig. 3B

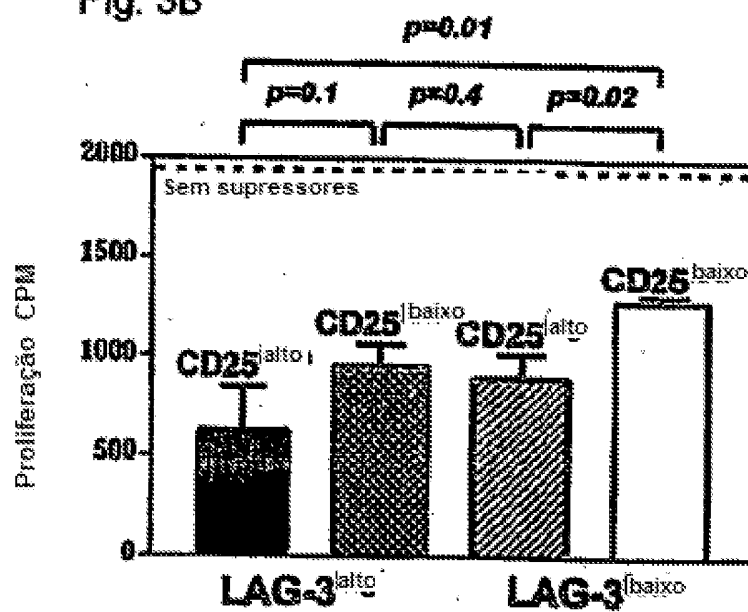


Fig. 4

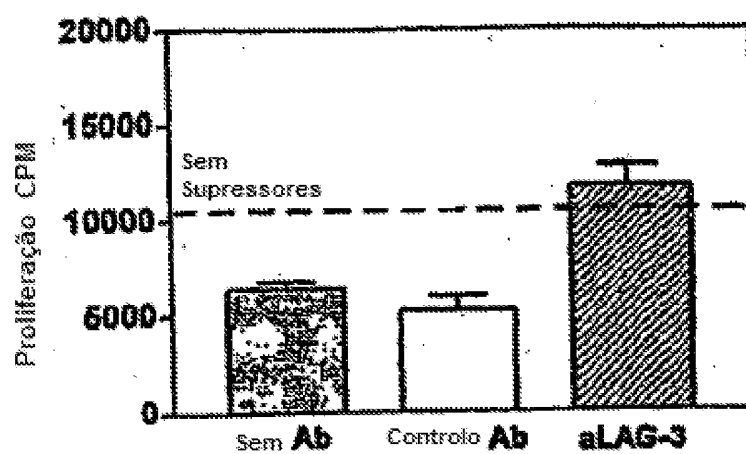


Fig. 5A

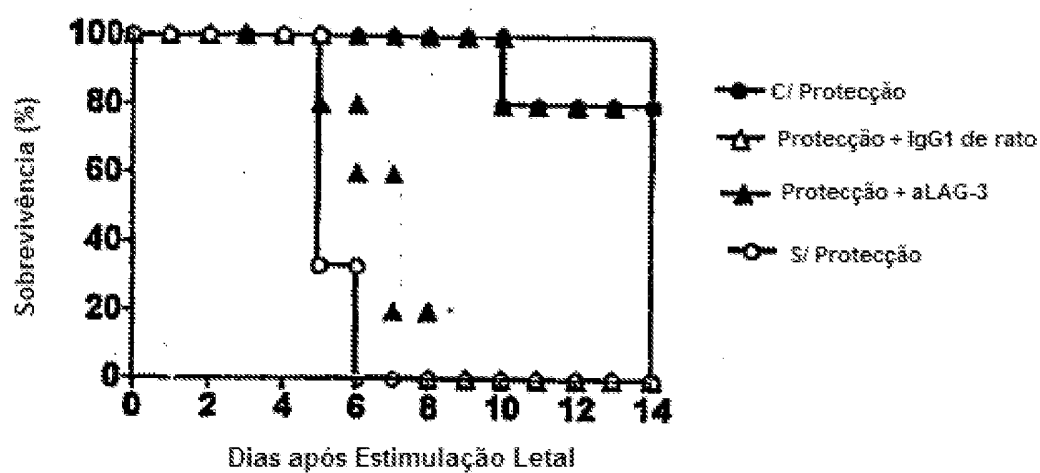


Fig. 5B

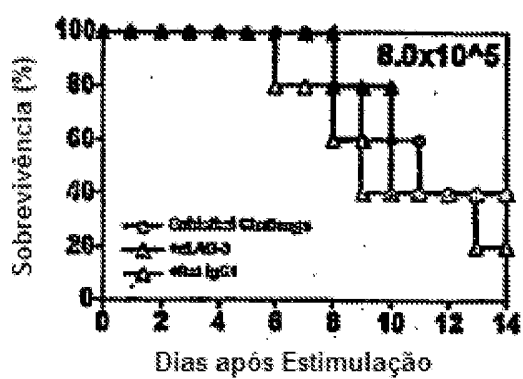


Fig. 5C

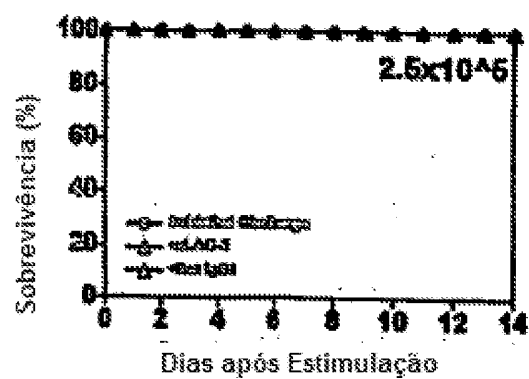


Fig. 6A

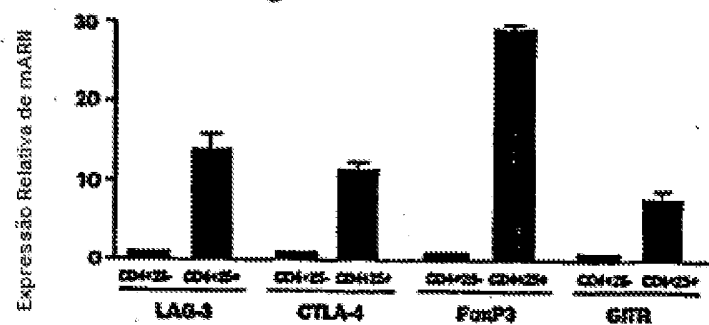


Fig. 6B

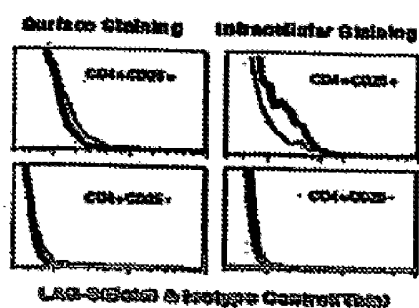


Fig. 6C

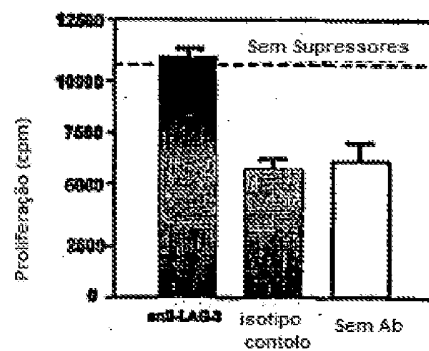


Fig. 6D



Fig. 7

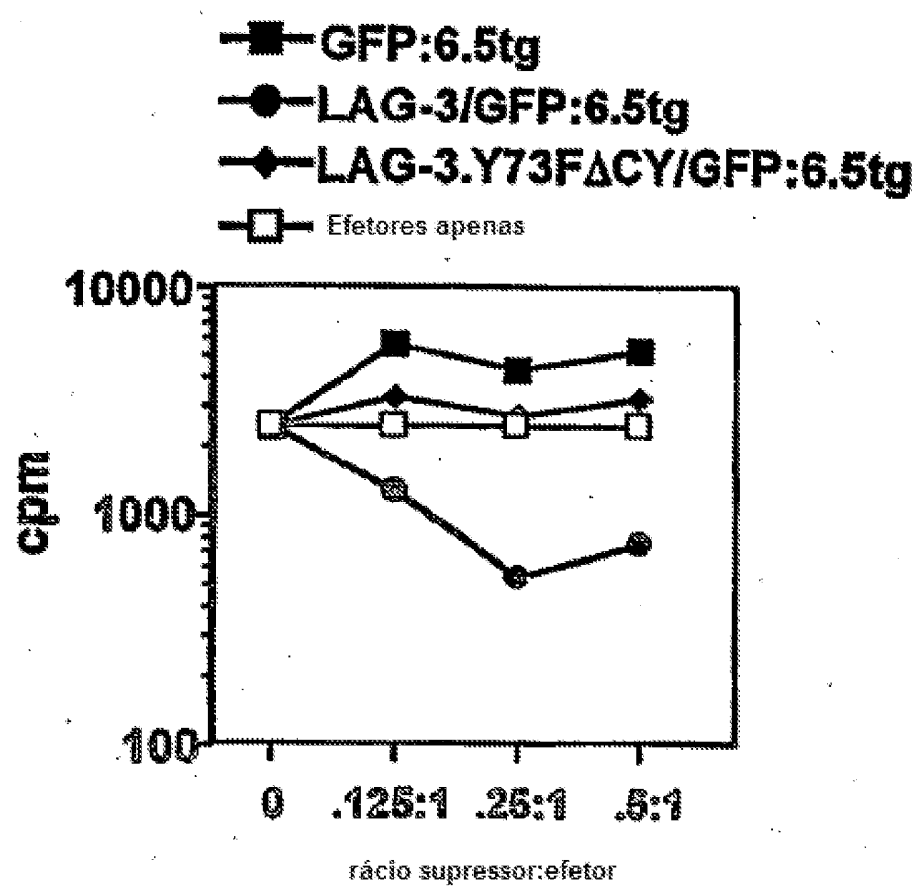


Fig. 8

