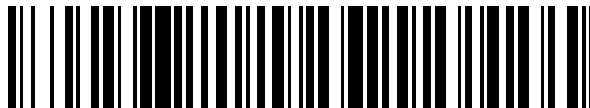


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 426**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2015 PCT/FR2015/051498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2015 E 15732846 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3152234**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores**

30 Prioridad:

06.06.2014 FR 1455177

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

04.05.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LILLE (20.0%)
42, rue Paul Duez
59800 Lille, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%);
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (20.0%);
CELLVAX (20.0%) y
UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (20.0%)**

72 Inventor/es:

**DELHEM, NADIRA;
BUSSON, PIERRE;
MORALES, OLIVIER;
BARJON, CLÉMENT;
MRIZAK, DHAFFER;
LHULLIER, CLAIRE y
MUSTAPHA, RAMI**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 822 426 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso en el tratamiento de cánceres.

10 **Estado de la técnica**

Los linfocitos T humanos se caracterizan por la expresión de un marcador de membrana llamado CD3 y un receptor específico, el TCR (T cell receptor), que está directamente implicado en el reconocimiento específico de un antígeno. Este reconocimiento antigénico por el linfocito T indiferenciado induce la activación de la respuesta inmunitaria primaria dando como resultado una modificación del fenotipo y de la actividad de los linfocitos T.

Se desarrollarán diferentes tipos de poblaciones de linfocitos T, por ejemplo, células "efectoras" o linfocitos T efectores, que realizarán funciones especializadas para defender el organismo. De esta manera, los linfocitos T CD4+, también llamados linfocitos T auxiliares, secretan citocinas principales, en concreto, los linfocitos B que ayudan en su función humoral (producción de anticuerpos específicos) y los linfocitos T CD8+ en su actividad citotóxica.

Otra población de linfocitos T CD4+ consiste en linfocitos T reguladores naturales, en lo sucesivo denominados más brevemente como "linfocitos T reguladores". Estos sobreexpresan constitutivamente la molécula CD25 (de esta manera, los linfocitos T reguladores también pueden denominarse "CD4+CD25+") y el factor de transcripción Foxp3. Este bajo porcentaje de linfocitos T CD4+CD25+ tiene la particularidad de regular negativamente a los actores de la respuesta inmunitaria que habrían reconocido diversos autoantígenos por sus TCR. De esta manera, los linfocitos T reguladores desempeñan un papel fundamental en la fisiología del sistema inmunitario, en particular para proteger al organismo contra la aparición de enfermedades autoinmunes.

No obstante, se ha planteado que, en una situación patológica, los linfocitos T reguladores pueden inducir una inmunosupresión inadecuada, que promueve a continuación el crecimiento tumoral o la persistencia de patógenos infecciosos (virus, bacterias, parásitos, etc.). Numerosos estudios han demostrado de esta manera que los linfocitos T reguladores disminuyen las respuestas inmunitarias antitumorales o antivirales, en concreto inhibiendo de manera inadecuada la actividad de los linfocitos T efectores, promoviendo de esta manera la persistencia de virus y la progresión tumoral en una gran mayoría de los cánceres.

Los mecanismos por los cuales los linfocitos T reguladores ejercen sus efectos supresores sobre los linfocitos T efectores todavía se conocen poco. No obstante, diversos estudios han demostrado diferentes mecanismos por los cuales los linfocitos T reguladores pueden suprimir la respuesta inmunitaria. Entre las posibles explicaciones, los estudios han demostrado, por ejemplo, que los linfocitos T reguladores Foxp3+ pueden lisar linfocitos T efectores mediante la producción de granzimas/perforinas (1) o privando a los linfocitos T efectores de IL-2 o inhibiendo la proliferación de linfocitos T efectores, en concreto mediante la expresión de moléculas de superficie como la galectina 1 que interactúa con receptores expresados en los linfocitos T efectores e induce la detención del ciclo celular de los linfocitos T efectores (2).

El papel fisiopatológico de los Treg en los cánceres, ha fomentado de esta manera la aparición de una nueva estrategia terapéutica antitumoral. Esta consiste en neutralizar los factores que inhiben la respuesta inmunitaria, y en particular los linfocitos T reguladores, o en otras palabras, en romper la tolerancia frente a los antígenos tumorales.

En efecto, con el objetivo de revertir el equilibrio entre los linfocitos T reguladores y los linfocitos T efectores en el control de la inmunidad antitumoral, muchos equipos han buscado desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir los linfocitos T reguladores CD4+CD25+, en concreto dirigiéndose a, con anticuerpos monoclonales, moléculas de superficie expresadas por estos linfocitos T reguladores, y en particular aquellas implicadas en la actividad supresora de estos linfocitos T reguladores.

Los análisis realizados en roedores han demostrado, por ejemplo, que la inhibición de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor alfa de IL-2 (CD25) promovía la activación y expansión de las células T efector inhibiendo de esta manera el crecimiento tumoral (3). No obstante, CD25 también es expresado por las células T efectoras activadas. De esta manera, esta estrategia debe tomarse con precaución en la medida en que también puede promover la eliminación de los linfocitos T efectores.

También se ha documentado que la activación de la señalización por GITR a través de un anticuerpo anti-GITR puede inhibir la actividad supresora de los linfocitos T reguladores (4). En este contexto, el uso de un anticuerpo anti-GITR en el tratamiento de tumores murinos ha permitido aumentar la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD4+ y CD8+, y esto de forma más eficaz cuando el tumor ya está instalado. No obstante, los linfocitos T efectores activados también expresan GITR. Por consiguiente, también existe un riesgo de supresión de linfocitos T efectores durante el uso de un

anticuerpo anti-GITR.

La estrategia que tiene como objetivo inhibir los linfocitos T reguladores también se ha considerado mediante el uso de un anticuerpo anti-CTLA4, marcador expresado por los linfocitos T reguladores. De esta manera, en un modelo de ratón que presenta un KO (KnockOut) de CTLA-4 en linfocitos T reguladores, o durante el uso de anticuerpos anti-CTLA-4, se demostró un aumento de la actividad de los linfocitos T efectores y una disminución de la supresión mediada por células T reguladoras, lo que conduce a la inhibición del crecimiento tumoral (5). No obstante, los linfocitos T efectores activados también expresan el marcador CTLA-4. Por consiguiente, existe, de nuevo, un riesgo de supresión de los linfocitos T efectores mediante el uso de un anticuerpo anti-GITR.

De esta manera, a pesar del efecto prometedor de estas diferentes moléculas, uno de los obstáculos para el agotamiento específico de los linfocitos T reguladores es la falta de especificidad de sus marcadores de superficie. En efecto, las proteínas de superficie CD25, CTLA-4 o GITR, expresadas por los linfocitos T reguladores también son marcadores de activación de los linfocitos T efectores. El uso de estas proteínas como dianas para el agotamiento de los linfocitos T reguladores tiene, de esta manera, como efecto indeseable la eliminación de numerosos linfocitos T efectores CD4+ y CD8+, indispensables para la regresión tumoral. En este contexto, sigue siendo muy difícil dirigirse específicamente a los linfocitos T reguladores en protocolos terapéuticos.

Por consiguiente, todavía existe una necesidad de compuestos que puedan inhibir de forma selectiva y eficaz la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

Objeto de la invención

Uno de los objetivos de la invención es, de esta manera, proporcionar un anticuerpo para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, estando dicho anticuerpo dirigido contra un marcador específico de linfocitos T reguladores y permitiendo la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, sin alterar la función de los linfocitos T efectores.

Los inventores tienen el mérito de haber demostrado que una molécula, la galectina 9, es expresada de manera específica por los linfocitos T reguladores durante la activación y que un anticuerpo dirigido contra esta molécula permite inhibir la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, y esto de forma específica, es decir sin inhibir a los linfocitos T efectores. Por otro lado, también se ha demostrado que dicho anticuerpo es capaz de neutralizar la conversión de linfocitos T CD4+ convencionales en linfocitos T CD4+ inmunosupresores inducida por la galectina 9, promoviendo de esta manera el mantenimiento de una respuesta inmunitaria antitumoral en el paciente tratado según la invención.

De esta manera, se descubrió que dicho anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores podría usarse en el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, es decir de enfermedades (no autoinmunes) en las que juega un papel la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, en concreto promoviendo el desarrollo o la persistencia de la enfermedad. En particular, se ha demostrado que la actividad supresora de los linfocitos T reguladores promueve el desarrollo de tumores. Por lo tanto, la invención está dirigida a cánceres en los que juega un papel la actividad supresora de los linfocitos T.

La galectina 9, que puede denominarse de manera más concisa "gal9", forma parte de la familia de las galectinas. Las galectinas, o lectinas de tipo S, constituyen una familia formada por quince miembros en vertebrados, diez de los cuales en el ser humano. La galectina 9 interactúa preferentemente con los residuos de beta-galactósidos de glucoproteínas y glucolípidos. En el ser humano, la galectina 9 existe en tres isoformas, larga, media y corta.

Se han realizado varios estudios para determinar el vínculo existente entre el desarrollo de cánceres y las galectinas, en concreto la galectina 9. No obstante, en la mayoría de estos estudios se cree que la galectina 9 tiene actividad citotóxica contra los linfocitos T activados (ya sean CD4+ o CD8+) y no tiene actividad citotóxica contra los linfocitos T inactivados.

Por ejemplo, la solicitud de patente EP1586325 parte del postulado de que, *in vitro*, la galectina 9 induce la apoptosis en células tumorales, en concreto en células malignas o metastásicas, pero no en células normales. La solicitud EP1586325 se refiere, de esta manera, a un medicamento que comprende galectina 9 o moléculas que inducen la producción y/o liberación de galectina 9, etc.

Por lo tanto, el objetivo era usar la galectina 9 o factores que permitieran aumentar la galectina 9, mientras que la presente invención tiende, por el contrario, a inhibirla.

El documento Clément Barjon *et al.* ("A novel monoclonal antibody for detection of galectin-9 in tissue sections: application to human tissues infected by oncogenic viruses"; *Infectious Agents and Cancer*, 2012, 7, 16-) describe la producción de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos contra la galectina 9 con el fin de mejorar la detección de la galectina 9 en muestras clínicas, en particular secciones de tejido analizadas por

inmunohistoquímica. Entre los anticuerpos monoclonales identificados, 1G3, se describe como el más adecuado para inmunohistoquímica. La caracterización del anticuerpo monoclonal 1G3 no va más allá de la identificación de la secuencia de su epítipo (TPAIPPMYPHPA).

5 La solicitud internacional WO 2010/084999 describe agentes inmunosupresores que comprenden una sustancia activa que bloquea la ruta de señalización del ligando galectina 9 con el receptor Tim3, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. El documento Jihène Klibi *et al.* ("Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cell"; Blood, 2009, 113 (9), 1957-1966) muestra que los tumores de carcinoma nasofaríngeo (NPC) producen exosomas que portan galectina 9, siendo liberados dichos exosomas en el torrente sanguíneo e induciendo la apoptosis *in vitro* de los clones. Linfocitos T CD4 +citotóxicos específicos del EBV (Resumen). Esta apoptosis es inhibida por un anticuerpo anti-Gal9 (9M1-3) que se une al epítipo FSTPAIPP (posiciones 208 a 215 de la isoforma L de Gal9) y bloquea la interacción Gal9-Tim3 (figura 6; párrafo "Anticuerpos", página 1958; Resumen).

15 La invención es tal como se ha definido en las reivindicaciones.

De esta manera, la presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso en el tratamiento de cánceres.

20 En otras palabras, la invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 para su uso en el tratamiento de cánceres, caracterizándose dicho anticuerpo por que es un inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

25 En efecto, la invención se basa en las constataciones inesperadas realizadas por los inventores, que observaron (i) por un lado, que la galectina 9 es expresada directamente por los linfocitos T reguladores y que su expresión aumenta durante su activación y (ii) por otro lado, que la galectina 9 es expresada muy débilmente por los linfocitos T efectores y que esta expresión desaparece durante la activación. Por otro lado, los inventores han observado que la inhibición de la galectina 9 por un anticuerpo permite la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

30 Por "*linfocitos T reguladores*", se entiende la subpoblación de linfocitos T reguladores naturales, también denominada Treg, caracterizada por una expresión constitutiva de CD25, de CTLA-4 y de GITR y por una expresión específica del factor de transcripción Foxp3. Los linfocitos T reguladores a los que se refiere más particularmente la presente invención son, por lo tanto, linfocitos T reguladores naturales, o nTreg.

35 Se entiende por "*actividad supresora de los linfocitos T reguladores*" la actividad inmunosupresora que ejercen los linfocitos T reguladores sobre los linfocitos T efectores, una vez activados, en situación patológica y que promueve, en particular, el crecimiento tumoral. Preferentemente, la actividad supresora de los linfocitos T reguladores puede entenderse como la actividad que disminuye las respuestas inmunitarias antitumorales por inhibición de la actividad de los linfocitos T efectores. La actividad supresora de los linfocitos T reguladores puede analizarse según diferentes técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un método MLR (Mixed Leucocyte Reaction), que implementa un cocultivo de linfocitos Treg y células inmunitarias (PBMC totales o T CD4+) autólogas o heterólogas. Esto se puede realizar mediante ensayos de proliferación basadas en (i) la incorporación de radioelementos como la Timidina Triaada o (ii) la incorporación de EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) que se incorpora durante la síntesis de ADN y que, tras una reacción enzimática, permitirá la emisión de fluorescencia (ensayo de proliferación Click-it EdU) o (iii) citometría de flujo (CSFE).

De esta manera, el efecto inhibidor de un anticuerpo para su uso según la invención puede analizarse, por ejemplo, mediante dicho método MLR, realizado en presencia del anticuerpo ensayado.

50 Se puede hacer referencia, en este caso, a la parte "Ejemplos", "Materiales y métodos" para obtener más detalles sobre la implementación de dicho método de análisis.

Los términos "*anticuerpo*" e "*inmunoglobulina*" se usan indistintamente y se refieren a moléculas de inmunoglobulina o porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que comprenden los sitios de unión específicos de un antígeno dado. El término anticuerpo cubre no solo moléculas de anticuerpos completas, sino también fragmentos de anticuerpos y variantes (incluidos derivados tales como anticuerpos humanizados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

60 Las inmunoglobulinas son bien conocidas por el experto en la materia y consisten en dos cadenas pesadas unidas entre sí por puentes disulfuro, estando cada cadena pesada unida a una cadena ligera por un puente disulfuro. Hay dos tipos de cadenas ligeras, cadenas lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas que determinan la actividad funcional del anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

65 Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera comprende dos dominios, un dominio (o región) variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada comprende cuatro o cinco dominios según las clases de anticuerpo, un dominio variable (VH) y tres, o incluso cuatro, dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y

posiblemente CH4). Las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan la especificidad para el antígeno y el sitio de unión en ese antígeno.

5 Los dominios constantes de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren al anticuerpo importantes propiedades biológicas como la asociación de cadenas de anticuerpos entre sí, la movilidad a través de la placenta, la fijación del complemento y/o la fijación a los receptores Fc (FcR). El fragmento Fv corresponde a la parte V-terminal del fragmento Fab, descrito a continuación, de la inmunoglobulina, y comprende las porciones variables de una cadena ligera y de una cadena pesada (VL y VH). La especificidad del anticuerpo radica en la complementariedad estructural entre el sitio de reconocimiento del anticuerpo y el determinante antigénico. El sitio de reconocimiento del anticuerpo consiste esencialmente en residuos que se originan en regiones que son hipervariables o que determinan la complementariedad ("Complementary Determining Regions" o CDR). Ocasionalmente, los residuos que se originan en regiones no hipervariables o en regiones marco o armazón ("framework" o FR) influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en los sitios de reconocimiento. La expresión "regiones de complementariedad" (CDR) se refiere a secuencias de aminoácidos que, juntas, definen la afinidad de la fijación y la especificidad de la región Fv natural del sitio de fijación de una inmunoglobulina nativa. Cada una de las cadenas ligeras y cada una de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina posee tres regiones CDR denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por consiguiente, un sitio de unión de un antígeno comprende seis CDR. Las regiones marco (FR) se refieren a las secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR, es decir porciones de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas de la misma especie.

Un anticuerpo para su uso según la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Preferentemente, un anticuerpo para su uso según la invención es un anticuerpo monoclonal.

25 La expresión "*anticuerpo monoclonal*" o "*mAb*" (para "monoclonal Antibody") designa un anticuerpo de composición de aminoácidos única, que está dirigido contra un antígeno específico y que puede ser producido por un solo clon de células B, o hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser recombinantes, es decir, producidos mediante técnicas de ingeniería de proteínas.

30 El término "*Fab*" designa un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 Dalton y que tiene actividad de unión a antígeno. Comprende aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena pesada y toda la cadena ligera unidas por un puente disulfuro. El Fab se puede obtener en concreto mediante el tratamiento de la inmunoglobulina con una proteasa, la papaína.

35 El término "*F(ab')₂*" designa un fragmento de aproximadamente 100.000 Dalton y una actividad de unión al antígeno. Este fragmento es ligeramente más grande que dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra. Estos fragmentos se obtienen por tratamiento de una inmunoglobulina con una proteasa, la pepsina. El fragmento Fab se puede obtener a partir del fragmento F(ab')₂ por escisión del puente disulfuro de la región bisagra.

40 Una cadena Fv única "*scFv*" corresponde a un polipéptido VH: VL sintetizado usando los genes que codifican los dominios VL y VH y una secuencia que codifica un péptido destinado a unir estos dominios. Un scFv incluye CDR mantenidas en una conformación apropiada, por ejemplo usando técnicas de recombinación genética.

45 Los dímeros de "ScFv" corresponden a dos moléculas de scFv unidas entre sí por un enlace peptídico. Esta cadena Fv es frecuentemente el resultado de la expresión de un gen de fusión que incluye los genes que codifican VH y VL unidos por una secuencia de unión (linker) que codifica un péptido. El fragmento scFv humano puede incluir regiones CDR que se mantienen en una conformación apropiada, preferentemente mediante el uso de técnicas de recombinación genética. El fragmento "dsFv" es un heterodímero VH-VL estabilizado por un puente disulfuro; puede ser divalente (dsFv₂). Los fragmentos de anticuerpos divalentes Sc(Fv)₂ o multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFv monovalentes o producirse uniendo fragmentos scFv mediante secuencias de unión peptídica.

55 El fragmento Fc es el soporte de las propiedades biológicas del anticuerpo, en particular su capacidad para ser reconocido por efectores de la inmunidad o para activar el complemento. Consiste en fragmentos constantes de las cadenas pesadas más allá de la región bisagra.

60 El término "diacuerpos" significa pequeños fragmentos de anticuerpos que tienen dos sitios de fijación del antígeno. Estos fragmentos comprenden en la misma cadena polipeptídica VH-VL un dominio variable de cadena pesada VH conectado a un dominio variable de cadena ligera VL. Utilizando una secuencia de unión que es demasiado corta para permitir el emparejamiento de dos dominios de la misma cadena, se produce necesariamente el emparejamiento con dos dominios complementarios de otra cadena y, de esta manera, se crean dos sitios de fijación de antígeno.

65 De esta manera, un anticuerpo para su uso según la invención puede ser una inmunoglobulina que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras completas, o puede ser un fragmento de inmunoglobulina como se definió anteriormente, por ejemplo F(ab')₂, Fab, Fv, scFv o Fc. De manera preferente, dicho fragmento de anticuerpo para su uso según la invención es la región Fab de una inmunoglobulina, en particular la región Fv de un anticuerpo IgG1.

Los anticuerpos para su uso según la invención están aislados y purificados y son diferentes de los anticuerpos naturales. Los términos "aislado" y "purificado" usados en relación con un anticuerpo o una secuencia de nucleótidos indican que la molécula está presente en ausencia mayoritaria de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo.

5 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que la secuencia de cada cadena ligera y/o de cada cadena pesada que lo constituye comprende o consiste en una secuencia híbrida obtenida de al menos dos animales distintos. Preferentemente, los anticuerpos quiméricos para su uso según la invención son híbridos ser humano/ratón. En concreto, un anticuerpo quimérico para su uso según la invención puede comprender un dominio
10 VH y un dominio VL de un anticuerpo procedente de un animal no humano, en concreto murino, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano. De esta manera, preferentemente, un anticuerpo para su uso según la invención comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado del anticuerpo 1G3, definido a continuación, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

15 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de un animal no humano en el que las secuencias de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras distintas de las CDR se han reemplazado por secuencias correspondientes de uno o más anticuerpos de origen humano. Preferentemente, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo cuyas secuencias de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras son de origen humano, y cuyas CDR se derivan del anticuerpo 1G3.

20 Los anticuerpos para su uso según la invención son, preferentemente, anticuerpos monoclonales, es decir, solamente reconocen un único determinante antigénico en la galectina 9, a diferencia de los anticuerpos policlonales que corresponden a una mezcla de anticuerpos monoclonales, que por lo tanto reconocen varios determinantes antigénicos en una misma molécula.

25 Los anticuerpos monoclonales para su uso según la invención se pueden obtener según técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, es posible usar la técnica de fusión celular, la técnica de clonación de secuencias de cadenas pesadas y ligeras, la técnica de presentación en fagos o ribosomas, la inmunización de ratones que tienen el repertorio de inmunoglobulinas humanas y expresión en una célula ad hoc o animal transgénico. Estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia.

30 La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra galectina 9 e inhibidores de la actividad supresora de linfocitos T reguladores para su uso según la invención. En particular, los inventores han desarrollado un híbrido que produce un anticuerpo murino IGg1 Kappa, 1G3, dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores. Los inventores caracterizaron los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de este anticuerpo monoclonal mAb 1G3 y determinaron de esta manera las CDR de este anticuerpo, presentados en la tabla 1.

Tabla 1

Dominios de mAb 1G3	Secuencia
VH	MKCSWGIFLLSVTAGVHSHKVLQSGAELVKPGASVKLSCKAS GYTFTDYTIHWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSHSIKYNEQFKDRAT LTADKSSSTVYMELSRLLTSEDSAVYFCTRHHGGYDGFYWGQGT LTVSSAKTTPPSVYPL (SEQ ID NO:1)
H-CDR1	GYTFTDYTIH (SEQ ID NO:2)
H-CDR2	WFYPGSHSIKYNEQFKDR (SEQ ID NO:3)
H-CDR3	HGGYDGFY (SEQ ID NO:4)
VL	LDGGKMSDQAQVLMMLLLWVSGTCGDIVMSQSPSSLAVSVGEKI TMSCKSSQSLFYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYYFPYTFGGGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSS (SEQ ID NO:5)
L-CDR 1	KSSQSLFYSTNQKNYLA (SEQ ID NO:6)
L-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:7)
L-CDR3	QQYYYFPYT (SEQ ID NO:8)

40 Por lo tanto, un modo de realización particular de la invención se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, que tiene la misma zona de fijación que el anticuerpo 1G3 que tiene como CDR la seis CDR definidas por:

- 45
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3,

- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3.

En particular, un objeto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores que tiene como CDR las seis CDR definidas por:

- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3.

En un modo de realización particular, la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

Por lo tanto, un anticuerpo para su uso según la invención se une específicamente a la galectina 9 y es un inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

Según otro modo de realización particular de la invención, un anticuerpo para su uso según la invención puede unirse específicamente a un epítipo de la galectina 9. De manera ventajosa, un anticuerpo para su uso según la invención es susceptible de unirse específicamente a la galectina 9 membranaria o intracelular

Más particularmente aún, un anticuerpo para su uso según la invención puede unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo 1G3, definido anteriormente.

De esta manera, según un modo particular de la invención, un anticuerpo para su uso según la invención puede unirse específicamente al epítipo de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9, presentada en la tabla 2. Este epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 corresponde al péptido P4 y cubre el final del péptido de unión y el comienzo de la parte C-terminal de la galectina 9. Esta secuencia existe en las tres isoformas de la galectina 9 (aminoácidos 166 a 178 de la isoforma S, aminoácidos 178 a 190 de la isoforma M, aminoácidos 210 a 222 de la isoforma L). Por lo tanto, dicho anticuerpo puede reaccionar con todas las isoformas de la galectina 9.

Tabla 2

Secuencia de la galectina 9 (epítipo)
TPAIPPMYPPHA (SEQ ID NO:9)

Según otro modo de realización particular, el anticuerpo para su uso según la invención es un anticuerpo quimérico, preferentemente un anticuerpo quimérico murino/humano. En particular, este anticuerpo quimérico murino/humano puede comprender los dominios variables del anticuerpo 1G3 como se definió anteriormente.

Según otro modo de realización particular, el anticuerpo para su uso según la invención es un anticuerpo humanizado. En particular, el dominio variable de este anticuerpo humanizado puede comprender regiones marco del aceptor humano, y opcionalmente dominios constantes humanos, y las CDR del donante no humano, en concreto las CDR definidas anteriormente.

Los inventores también han desarrollado un hibridoma que produce un anticuerpo murino IGgI Kappa, 2E12, dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores. Los inventores caracterizaron los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de este anticuerpo monoclonal mAb 2E12 y determinaron de esta manera las CDR de este anticuerpo, presentados en la tabla 3.

Tabla 3

Dominios de mAb 2E12	Secuencia
VH	MGWSFIILLSVTAGVHSKVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGY TFTEYTIHWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSGSMEYNEKFDKATLTA DNSSSTVYMEISRLTSEDSAVYFCERHGGYDGFDFYWGQGTTLTV SSAKTTPPSVYPLIFLEDLLQYSQLPWKIDVLLLSQDFQAVY* (SEQ ID NO:10)
H-CDR1	GYTFEYTIH (SEQ ID NO:11)
H-CDR2	WFYPGSGSMEYNEKFD (SEQ ID NO:12)
H-CDR3	HGGYDGFDFY (SEQ ID NO:13)
VL	LDGGKMSDQAQVLMLLLLWVSGTCGDIVMSQSPSSLAIVSVGEK VTMSCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRGS GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAIYCCQQYSSYPFTFGGGT KFEIKRADAAPTVISIFPPSS (SEQ ID NO:14)
L-CDR 1	KSSQSLLYSNNQKNYLA (SEQ ID NO:15)
L-CDR2	WASTRGS (SEQ ID NO:16)
L-CDR3	QQYSSYPFT (SEQ ID NO:17)

Por lo tanto, un modo de realización particular de la invención se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, que tiene la misma zona de fijación que el anticuerpo 2E12 que tiene como CDR la seis CDR definidas por:

5

- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región H-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 en la región H-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en la región H-CDR3,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 en la región L-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 en la región L-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 en la región L-CDR3.

10

En particular, un objeto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores que tiene como CDR las seis CDR definidas por:

15

- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región H-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 en la región H-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en la región H-CDR3,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 en la región L-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 en la región L-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 en la región L-CDR3.

20

En un modo de realización particular, la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14.

25

Como se mencionó anteriormente, según otro modo de realización particular de la invención, un anticuerpo para su uso según la invención puede unirse específicamente a un epítipo de la galectina 9. De manera ventajosa, un anticuerpo para su uso según la invención es susceptible de unirse específicamente a la galectina 9 membranaria o intracelular

30

Más particularmente aún, un anticuerpo para su uso según la invención puede unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo 2E12, definido anteriormente.

35

Según otro modo de realización particular, el anticuerpo para su uso según la invención es un anticuerpo quimérico, preferentemente un anticuerpo quimérico murino/humano. En particular, este anticuerpo quimérico murino/humano puede comprender los dominios variables del anticuerpo 2E12 como se definió anteriormente.

40

Según otro modo de realización particular, el anticuerpo para su uso según la invención es un anticuerpo humanizado. En particular, el dominio variable de este anticuerpo humanizado puede comprender regiones marco del aceptor humano, y opcionalmente dominios constantes humanos, y las CDR del donante no humano, en concreto las CDR definidas anteriormente.

45

Los anticuerpos para su uso según la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática tomada sola o en combinación.

Por ejemplo, es posible usar la técnica descrita a continuación relativa a la fabricación del hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal dirigido contra la galectina 9, 1G3 o 2E12.

5 La unión específica de los anticuerpos, dirigidos contra la galectina 9 para su uso según la invención, puede analizarse según cualquier método conocido en el estado de la técnica. Como inmunoensayos que se pueden utilizar, se pueden citar, por ejemplo, las técnicas de transferencia de Western, ensayos radioinmunológicos, ELISA, inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos con precipitina, ensayos de difusión en gel con precipitina, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos por fluorescencia o ensayos de fijación del complemento. Dichos ensayos son bien conocidos por el experto en la materia.

10 La acción inhibitoria de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores de un anticuerpo generado de esta manera para su uso según la invención, puede analizarse según diversas técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de proliferación celular. De esta manera, se puede hacer referencia a la técnica utilizada a continuación relativa al ensayo de proliferación celular realizado con el anticuerpo dirigido contra galectina 9, 1G3 o 2E12.

15 Cuando se conoce la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, el experto en la materia puede reproducir fácilmente el anticuerpo mediante técnicas estándar de producción de polipéptidos.

20 Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden sintetizarse mediante un método bien conocido en fase sólida, preferentemente usando un dispositivo de síntesis de péptidos disponible en el mercado y siguiendo las recomendaciones del proveedor.

25 De manera alternativa, los anticuerpos para su uso según la invención pueden obtenerse mediante técnicas, bien conocidas por el experto en la materia, de ADN recombinante en un sistema de expresión adecuado. La expresión "*sistema de expresión*" significa un huésped celular y un vector compatible en condiciones apropiadas, es decir, condiciones que permitan la expresión de la proteína codificada por el ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula huésped. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo se puede insertar en un vector de expresión apropiado que a continuación se introducirá en un huésped procarionta o eucariota adecuado que producirá el anticuerpo deseado.

30 Los términos "*vector*", "*vector de clonación*" y "*vector de expresión*" se refieren a vehículos mediante los cuales las secuencias de ADN o ARN que codifican el anticuerpo pueden introducirse en una célula huésped para transformarla y permitir la expresión (es decir, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Un vector de expresión es normalmente un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector vírico.

35 Como vectores víricos, se pueden citar los adenovirus, los retrovirus, el virus del herpes y los vectores derivados del virus adenoasociado (AAV). Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas bien conocidas, como la transfección de líneas celulares que permitan su encapsidación o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus complementarios que expresan las funciones faltantes necesarias. Las líneas celulares que permiten la encapsidación son, por ejemplo, PA317, PsiCRIP, GPenv+, 293, etc. Los protocolos detallados que permiten producir dichos virus recombinantes de replicación defectuosa están disponibles en las solicitudes de patente WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, etc.

40 Por lo tanto, las células huésped se transfectan, infectan o transforman con un ácido nucleico o un vector apropiado como se describió anteriormente.

45 El término "*transformación*" se refiere en el presente documento a la introducción de un gen extraño (extrínseco o extracelular), de una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped de tal manera que esa célula huésped expresa el gen o la secuencia introducida para producir la sustancia deseada, normalmente una proteína codificada por el gen o la secuencia introducida.

50 Los sistemas de expresión habituales incluyen, sin limitación, células huésped y vectores plasmídicos de *E. coli*, células huésped de insectos y vectores de tipo baculovirus, y células y vectores de mamíferos.

55 Un método de producción a partir de una célula huésped que expresa un anticuerpo para su uso según la invención puede comprender las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se describió anteriormente en la célula huésped competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida de esta manera, (iii) seleccionar opcionalmente las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo o polipéptido. Dichas células huésped pueden usarse para la producción de anticuerpos para su uso según la invención.

60 Un método de producción de un anticuerpo para su uso según la invención puede comprender las etapas de: (i) cultivar la célula transformada descrita anteriormente en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado de esta manera.

Los anticuerpos pueden separarse del medio de cultivo mediante métodos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, purificación en proteína A-Sepharose, mediante cromatografía en hidroxipatita, mediante electroforesis en gel, mediante diálisis o mediante cromatografía de afinidad.

5 En un modo de realización particular de la invención, se puede producir un anticuerpo quimérico humano para su uso según la invención obteniendo las secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se mencionó anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano por inserción de las secuencias de ácido nucleico en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican los dominios CH y CL, y expresando las secuencias codificadas por introducción del vector de expresión en la célula animal.

10 El dominio CH del anticuerpo quimérico humano puede ser de cualquier región perteneciente a la inmunoglobulina humana. Preferentemente, se trata de la clase IgG y más preferentemente IgG1. De la misma forma, el dominio CL del anticuerpo quimérico humano puede ser de cualquier región perteneciente a la inmunoglobulina humana. Preferentemente, se trata de la clase Kappa.

15 Los anticuerpos quiméricos o humanizados para su uso según la invención pueden obtenerse en particular mediante ingeniería genética de los anticuerpos.

20 La construcción de un anticuerpo quimérico puede efectuarse, por ejemplo, mediante una técnica de transfección de genes o mediante una técnica de ADN recombinante.

25 Se puede producir un anticuerpo humanizado para su uso según la invención obteniendo los dominios CDR como se mencionó anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humano mediante la inserción de las secuencias nucleicas en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando las secuencias codificadas mediante la introducción del vector de expresión en la célula animal.

30 En lo que respecta al vector de expresión de anticuerpo humanizado, puede tratarse de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existen en vectores separados, o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Se prefieren los vectores de tipo tándem con respecto a la facilidad de construcción del vector de expresión, la facilidad de introducción en las células animales, etc. Como ejemplo de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem, se pueden citar pKANTEX93 o pEE18.

35 Los métodos de producción de anticuerpos humanizados basados en las técnicas de transfección de genes o de ADN recombinante son bien conocidos en el estado de la técnica. Los anticuerpos pueden humanizarse según diversas técnicas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo mediante injerto de CDR ("CDR-grafting"), "veneering" o "resurfacing", o incluso mediante transposición de cadenas (chain shuffling). También se conoce la técnica basada en ADN recombinante para la preparación de dichos anticuerpos.

45 Puede obtenerse un fragmento Fab mediante tratamiento de un anticuerpo, en concreto un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, con una proteasa, la papaína. Este fragmento Fab también se puede producir mediante inserción de un ADN que codifica el fragmento Fab del anticuerpo en un vector utilizable en un sistema de expresión procariota o eucariota y la introducción de este vector en el procariota o eucariota apropiado para expresar el fragmento Fab.

50 Puede obtenerse un fragmento F(ab')₂ mediante tratamiento de un anticuerpo, en concreto un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, con una proteasa, la pepsina. El fragmento F(ab')₂ también se puede obtener uniendo fragmentos Fab' tales como se describen a continuación, mediante un enlace tioéter o un puente disulfuro.

55 Puede obtenerse un fragmento Fab' mediante tratamiento del complejo F(ab')₂ de un anticuerpo, en concreto un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, con un agente reductor, el ditiotreitól. El fragmento Fab' también se puede producir mediante inserción de un ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector utilizable en un sistema de expresión procariota o eucariota y la introducción de este vector en el procariota o eucariota adecuado para expresar el fragmento Fab'.

60 Se puede producir un fragmento ScFv mediante la obtención de una secuencia de ADNc que codifica los dominios VH y VL descritos anteriormente, seguida de la inserción de este ADN en un vector utilizable en un sistema de expresión eucariota o procariota y de la introducción de este vector en el eucariota o procariota adecuado para expresar el fragmento ScFv. Para obtener un fragmento ScFv humanizado, es posible usar la técnica de injerto de CDR ("CDR grafting"). Esta técnica implica la selección de regiones de complementariedad (CDR) de un fragmento ScFv donante y su injerto en la estructura de un fragmento ScFv humano de estructura tridimensional conocida (véase, por ejemplo, WO 98/45322; EP0173494).

65

Se pueden efectuar modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos para su uso según la invención. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o las propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que, cuando se produce un anticuerpo humanizado mediante el simple injerto de solo las CDR de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en los marcos (FR) de un anticuerpo humano, el poder de unión al antígeno disminuye en comparación con el de un anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que ciertos residuos de aminoácidos VH y VL de un anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en las FR, están directa o indirectamente asociados con el poder de fijación antigénica. La sustitución de estos residuos de aminoácidos por diferentes residuos de aminoácidos derivados de las FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría, por lo tanto, el poder de unión. Por consiguiente, para resolver este problema, se deben efectuar ensayos sobre los anticuerpos injertados de CDR humanas para identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de VH y VL de anticuerpos humanos, un residuo de aminoácido que ya esté directamente asociado con la unión al antígeno, o que interactúe con un residuo de aminoácido de CDR o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado con la unión al antígeno. El poder de unión podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con los residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un anticuerpo no humano. Se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos para su uso según la presente invención y en las secuencias de ADN que los codifican, al tiempo que se obtiene nuevamente una molécula funcional que codifica un anticuerpo con las características deseadas.

Las "*variantes conservadoras de función*" son aquellas en las que un determinado residuo de aminoácido en una proteína se ha modificado sin alterar no obstante la conformación general y la función de inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores. De esta manera, es posible reemplazar un aminoácido por otro que tenga propiedades similares (por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, etc.), siempre que se conserve la función de inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

De esta manera, según un modo realización particular de la invención, un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso según la invención, comprende:

- una H-CDR1 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 2,
- una H-CDR2 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 3,
- una H-CDR3 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 4,
- una L-CDR1 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 6,
- una L-CDR2 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 7,
- una L-CDR3 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 8.

Según otro modo de realización particular de la invención, un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso según la invención, tiene 1, 2 o 3 aminoácidos de diferencia con el conjunto de las seis CDR de secuencias tales como se definieron anteriormente, es decir, las CDR de secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

Según otro modo de realización particular de la invención, un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso según la invención, comprende:

- una H-CDR1 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 11,
- una H-CDR2 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 12,
- una H-CDR3 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 13,
- una L-CDR1 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 15,
- una L-CDR2 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 16,
- una L-CDR3 que tiene 1 o 2 aminoácidos de diferencia con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 17.

Según otro modo de realización particular de la invención, un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso según la invención, tiene 1, 2 o 3 aminoácidos de diferencia con el conjunto de las seis CDR de secuencias tales como se definieron anteriormente, es decir, las CDR de secuencias SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que, en una situación patológica, los linfocitos T reguladores pueden inducir una inmunosupresión inadecuada, que a continuación promueve el crecimiento tumoral. Numerosos estudios han demostrado de esta manera que los linfocitos T reguladores disminuyen las respuestas inmunitarias antitumorales, en concreto inhibiendo de manera inadecuada la actividad de los linfocitos T efectores, promoviendo de esta manera el desarrollo de patologías de tipo cánceres.

Se ha demostrado en el presente documento que, por un lado, durante la activación, la galectina 9 es expresada directamente por los linfocitos T reguladores, mientras que solamente es expresada muy débilmente, o no lo es en absoluto, por los linfocitos T efectores, permitiendo el direccionamiento a la galectina 9 inhibir específicamente los linfocitos T reguladores sin el riesgo de causar un agotamiento de los linfocitos T efectores. Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de la galectina 9 por un anticuerpo permite la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores. Los anticuerpos, dirigidos contra la galectina 9 e inhibidores de la actividad supresora de los

linfocitos T reguladores, pueden por lo tanto usarse en el tratamiento de cánceres asociados con la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

5 Se entiende por "*tratamiento del cáncer*" cualquier tratamiento capaz, por ejemplo, de suprimir un tumor o metástasis, reducir el riesgo de recidiva, ralentizar el desarrollo de un tumor o de metástasis y/o tratar los síntomas de la enfermedad.

10 Los cánceres a los que se refiere la presente invención son aquellos en los que los linfocitos T reguladores ejercen su actividad supresora. De manera ventajosa, los cánceres a los que se refiere la presente invención son aquellos en los que los linfocitos T reguladores están presentes en grandes cantidades en el tejido tumoral o en la circulación, correlacionándose generalmente la expansión de los linfocitos T reguladores con el aumento de su activación (6). La frecuencia de los linfocitos T reguladores puede evaluarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo mediante un análisis por citometría de flujo (FACS) de los linfocitos intratumorales o de los linfocitos circulantes o mediante marcado inmunohistológico del tejido tumoral.

15 De manera general, un anticuerpo tal como se definió anteriormente se puede usar, por lo tanto, en el tratamiento de todos los tipos de cáncer en los que los linfocitos T reguladores ejercen su actividad supresora. Muchos tipos de cáncer en los que los linfocitos T reguladores ejercen su actividad supresora han sido objeto de estudios y son conocidos por el experto en la materia.

20 De esta manera, se sabe que los niveles elevados de linfocitos T reguladores dentro de los tumores están claramente asociados con un mal pronóstico en las leucemias mieloides crónicas (7), el cáncer de colon (8), el melanoma (9), el cáncer de útero (10), el cáncer de mama (11), el cáncer de páncreas (12), los cánceres gástricos (13), el cáncer de ovario (14), el linfoma primario del sistema nervioso central (15), los mielomas múltiples (16), el cáncer de próstata (17), el linfoma de Hodgkin o el carcinoma hepatocelular (18, 19).

25 Por lo tanto, un anticuerpo tal como se definió anteriormente puede usarse en particular en el tratamiento del cáncer, eligiéndose el cáncer del grupo que consiste en leucemias mieloides crónicas, cáncer de colon, melanoma, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cánceres gástricos, cáncer de ovario, linfoma primario del sistema nervioso central, mielomas múltiples, cáncer de próstata, linfoma de Hodgkin y carcinoma hepatocelular.

30 Los estudios también han demostrado que ciertos cánceres producen grandes cantidades de exosomas portadores de galectina 9 que juegan un papel inmunosupresor, es decir, que inhiben la respuesta inmune y potencialmente la respuesta antitumoral. Se pueden citar como ejemplos, no limitativos, cánceres que producen grandes cantidades de exosomas portadores de la galectina 9, cánceres inducidos por virus, por ejemplo carcinomas de nasofaringe asociados con el virus EBV (virus de Epstein-Barr) o carcinomas hepatocelulares (CHC) vinculados al VHC (virus de la hepatitis C) o al VHB (virus de la hepatitis B) (20,21).

35 Por lo tanto, un anticuerpo tal como se definió anteriormente puede usarse en particular en el tratamiento del cáncer, siendo el cáncer un cáncer inducido por virus, preferentemente elegido del grupo que consiste en carcinomas de nasofaringe asociados al virus de Epstein-Barr, carcinomas hepatocelulares vinculados al virus de la hepatitis C o al virus de la hepatitis B.

40 También se ha demostrado que el aumento de la frecuencia de los linfocitos T reguladores es un factor predictivo de la recidiva de fibrosis después de una hepatitis C (22,23).

45 Por lo tanto, un anticuerpo para su uso según la invención se puede usar en la prevención de una recidiva de una fibrosis después de una hepatitis C.

50 En cada uno de los modos de realización descritos anteriormente, el anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores se administra de una manera apropiada a un paciente que necesita dicho tratamiento.

55 Los anticuerpos para su uso según la invención se pueden usar solos o en combinación con cualquier otro compuesto adecuado.

60 La solicitud describe un método de tratamiento de un cáncer, asociado con la expresión de la galectina 9 y con la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo para su uso según invención a un paciente.

65 El término "*paciente*" se entiende como un ser humano afectado, o que se hace que esté afectado, por una enfermedad asociada a la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, en concreto un cáncer.

La expresión "*cantidad terapéuticamente activa*" de un anticuerpo, significa una cantidad de anticuerpo suficiente para tratar dicho cáncer, que tiene una relación beneficio/riesgo aceptable para un tratamiento con medicamentos. La cantidad de anticuerpos y de composiciones para su uso según la presente invención así como la frecuencia de

administración será determinada por estudios clínicos, por el médico o por el farmacéutico. La cantidad "terapéuticamente activa" específica para cada uno de los pacientes podrá depender de un cierto número de factores como la naturaleza y la gravedad del trastorno a tratar, la actividad del anticuerpo utilizado, la composición utilizada, la edad, el peso, el estado general de salud, el sexo y el régimen del paciente, la vía de administración, la duración del tratamiento (dosis única o en varias dosis), los medicamentos utilizados en combinación y otros factores bien conocidos por los especialistas médicos.

Un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso según la invención se puede usar en combinación con un agente anticanceroso.

De esta manera, el anticuerpo para su uso según la invención se puede usar en combinación con terapias conocidas contra el cáncer como, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, el anticuerpo puede usarse en combinación con inmunoterapia adoptiva, que consiste en una o más inyecciones de linfocitos efectores contra antígenos tumorales, en particular antígenos de EBV. Según determinados aspectos, otros agentes anticancerosos usados en combinación con el anticuerpo dirigido contra la galectina 9 para su uso en la terapia del cáncer según la invención, comprenden agentes antiangiogénicos. Según determinados aspectos, dicho anticuerpo para su uso en la terapia del cáncer según la invención se coadministra con una citocina, por ejemplo una citocina que estimula una respuesta inmunitaria antitumoral.

La solicitud describe un producto de combinación que comprende un anticuerpo, tal como se definió anteriormente, y un agente anticanceroso, para un uso simultáneo, separado o extendido en el tiempo en el tratamiento del cáncer.

Para la administración, el anticuerpo para su uso según la invención, se formula, en general, en forma de composición farmacéutica. La composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para su uso según la invención puede formularse mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, en los que la molécula terapéutica está en combinación con al menos un excipiente.

Un "*portador farmacéuticamente aceptable*" se entiende por cualquier portador farmacéutico estándar, pudiendo ser su administración tolerada por un paciente. Por ejemplo, las soluciones salinas tamponadas con fosfato y estériles son farmacéuticamente aceptables.

Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender habitualmente uno o más compuestos, por ejemplo elegidos entre excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina, etc. Los excipientes conocidos son, por ejemplo, almidón, gelatina, ácido esteárico, estearato de calcio o de magnesio, etc. El experto en la materia sabrá cómo determinar los compuestos adecuados para la presente composición.

La forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosis y la posología pueden depender, por supuesto, entre otros, de la enfermedad a tratar, de sus síntomas, de su gravedad, de la edad, del peso y del sexo del paciente.

De manera no limitativa, la composición farmacéutica para su uso según la invención puede formularse de manera que pueda administrarse por vía tópica, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea/intradérmica, conjuntival, intramuscular o intraocular.

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la invención, pueden contener opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para que puedan inyectarse. En particular, estos pueden ser soluciones salinas isotónicas y estériles, fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, etc., o una mezcla de estas sales. Estas composiciones también pueden ser composiciones secas, en particular composiciones secas y congeladas, liofilizadas o refrigeradas, que tras la adición, según el caso, de agua estéril o agua fisiológica, constituyen soluciones inyectables.

Las dosis utilizadas pueden adaptarse según diferentes parámetros como, en particular, la vía de administración según la patología o alternativamente, la duración del tratamiento previsto.

Para preparar las composiciones farmacéuticas para su uso según la invención, se puede disolver o dispersar una cantidad suficiente de anticuerpo en un vehículo farmacéuticamente aceptable o un medio acuoso.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso por inyección incluyen soluciones acuosas estériles, dispersiones, formulaciones que incluyen aceite de sésamo o propilenglicol acuoso, así como polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma utilizada debe ser estéril y debe ser suficientemente fluida para poder inyectarse fácilmente mediante una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de producción y almacenamiento y estar protegida de la contaminación por microorganismos, tales como bacterias u hongos.

Las soluciones de los compuestos activos, ya sea en forma libre o como sales aceptables desde un punto de vista farmacéutico, se pueden preparar con agua mezclada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las

dispersiones se pueden preparar en glicerol, en polietilenglicoles líquidos, en una mezcla de los dos o en aceites. Estas preparaciones contienen, generalmente, un agente conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos en condiciones normales de almacenamiento y uso.

- 5 Un anticuerpo para su uso según la invención puede formularse en una composición en forma neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las sales de adición de ácido, formadas con los grupos amino libres de la proteína y formadas con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, los ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, mandélico, etc. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas como sodio, potasio, amonio, calcio o los hidróxidos de hierro, y de bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína, etc.

Después de la formulación en forma de medicamento, las soluciones se pueden administrar de una manera compatible con la dosificación de la formulación y en una cantidad terapéuticamente activa. Los medicamentos se pueden administrar como se describió anteriormente pero también en forma de cápsulas que los liberan.

De esta manera, un objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores que tiene como CDR:

- las seis CDR definidas por:

- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2, y
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3; o

- las seis CDR definidas por:

- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región H-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 en la región H-CDR2,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en la región H-CDR3,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 en la región L-CDR1,
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 en la región L-CDR2, y
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 en la región L-CDR3;

y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

Figura 1: análisis fenotípico por citometría de flujo multiparamétrica de linfocitos T reguladores naturales aislados de sangre humana.

Figura 2: análisis de la función supresora de los linfocitos T reguladores naturales aislados *ex vivo*. (A) Análisis de la inhibición de la proliferación de PBMC activadas por linfocitos T reguladores autólogos en cpm. (B) Análisis del porcentaje de citólisis de PBMC activadas por linfocitos T reguladores autólogos.

Figura 3: análisis por Q-PCR de la expresión del gen que codifica la galectina 9 en linfocitos T reguladores humanos (n = 12). 1) 8, D1, D2, A1, A2 representan las bolsas de sangre. CT (Cycle Threshold) representa el umbral de ciclo. Se trata del umbral medio a partir del cual se comienza a detectar la amplificación del gen de la galectina 9. Los resultados se expresan en ΔCT después de la normalización con cuatro genes de mantenimiento (β -actina, GAPDH, HPRT, Ubiquitina)

$$[\Delta CT = CT (\text{la muestra}) - CT (\text{media de genes de mantenimiento})]$$

Figura 4: análisis por transferencia de Western de la expresión de las tres isoformas de la galectina 9 en los linfocitos T reguladores humanos. Las células HeLa se utilizan como control negativo.

Figura 5: análisis por Q-PCR de la expresión del gen que codifica la galectina 9 en los linfocitos T convencionales durante la activación (n = 4).

Figura 6: análisis por Q-PCR de la expresión del gen que codifica la galectina 9 en los linfocitos T reguladores humanos durante la activación (n = 4).

Figura 7: análisis de la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores por el anticuerpo anti-gal9 1G3 mediante el análisis de la proliferación de PBMC en presencia de C15 irradiadas, en presencia o no de

linfocitos T reguladores y en presencia o no de anticuerpo 1G3 a la concentración de 1 µg/ml.

Figura 8: análisis de la inhibición de la apoptosis de Jurkat inducida por galectina 9 con 1 h de preincubación de galectina-9 S a 1 µg/ml y anticuerpos a 5 µg/ml (anticuerpo 9M1 (anti-galectina 9), 9S2-3 (anti-galectina 9), 1G3 (anti-galectina 9), un anticuerpo anti-TIM3, 2E12 (anti-galectina 9)).

Figura 9: análisis de la restauración de la proliferación en células activadas ("A", con anti-CD3 y anti-CD28) y no activadas (NA), después del tratamiento con galectina 9 (anticuerpos ensayados = ECA-42 (anti-galectina 9), 1G3 (anti-galectina 9), 2E2 (anti-TIM3) y 2E12 (anti-galectina 9). El control corresponde al medio de cultivo.

Figura 10: análisis de la expresión de galectina 9 mediante citometría de flujo (FACS).

A: expresión de la galectina 9 a partir de linfocitos T reguladores y de células T CD4+ conv recién aisladas (n = 2 donantes).

B: expresión de la galectina 9 extraída de linfocitos T reguladores y de células T CD4+ conv después de 24 h de activación (n = 5 donantes).

C: expresión de la galectina 9 extraída de linfocitos T reguladores y de células T CD4+ conv después de 48 h de activación (n = 5 donantes).

D: expresión de galectina 9 extraída de linfocitos T reguladores y de células T CD4+ conv después de 72 h de activación (n = 5 donantes).

Figura 11: proliferación relativa de los linfocitos T conv en diferentes condiciones después de 3 días de cultivo (células activadas o no, en presencia de galectina 9 y con 1G3 ("anti-X"), un isotipo de control (IgG1), un inhibidor (lactosa) y un inhibidor de control (sacarosa)).

Figura 12: proliferación de PBMC en diferentes condiciones después de 5 días de cultivo (células activadas o no, en presencia de 1G3 o de un isotipo de control (IgG1)).

Figura 13: viabilidad de PBMC en diferentes condiciones después de 5 días de cultivo (células activadas o no, en presencia de 1G3 o de un isotipo de control (IgG1)).

Figura 14: medida de la secreción de la galectina 9 por los T CD4+ convencionales ("T conv") y los linfocitos T reguladores ("Treg") en condiciones no activadas y activadas (ensayo realizado después de 48 h de cultivo).

Figura 15: proliferación relativa de linfocitos T convencionales en cocultivo con linfocitos T reguladores autólogos en diferentes condiciones (células activadas, en presencia de 1G3 ("anti-X"), un isotipo de control (IgG1), un inhibidor (lactosa) y/o un inhibidor de control (sacarosa)).

Figura 16: proliferación relativa de PBMC en presencia de linfocitos T reguladores y diferentes concentraciones de 1G3 (1 µ/ml, 3 µ/ml, 5 µ/ml).

Figura 17: volumen tumoral con diferentes tratamientos: PBMC solas (control); PBMC + Treg + 1G3 (activados); PBMC + Treg + IgG1 (activados); sin PBMC + 1G3 (activados); sin PBMC + IgG1 (activados)

Figura 18: representación gráfica del peso de los ratones en función de los días.

A y B: experimentos independientes con ratones SCID xenotrasplantados (50x10⁶ PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (20 µg/ratón).

Figura 19: representación gráfica del peso de los ratones en función de los días.

A: ratones SCID xenotrasplantados (20x10⁶ PBMC + 10 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (2 µg/ratón).

B: ratones SCID xenotrasplantados (50x10⁶ PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (20 µg/ratón).

C: ratones SCID xenotrasplantados (50x10⁶ PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (20 µg/ratón).

D: ratones SCID xenotrasplantados (50x10⁶ PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (200 µg/ratón).

Figura 20: medias del volumen tumoral medido manualmente (mm³) de 6 experimentos independientes (20 µg de 1G3 por ratón, 50x10⁶ PBMC + 6 al 8 % de Treg, en comparación con el isotipo de control IgG1) (medida manual). (*p <= 0,05, **p <= 0,001)

Figura 21: medidas del volumen tumoral medido por bioluminiscencia.

A: ratones SCID xenotrasplantados (50×10^6 PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$).

B: ratones SCID xenotrasplantados (50×10^6 PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$).

5 C: ratones SCID xenotrasplantados (40×10^6 PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$).

D: ratones SCID xenotrasplantados (50×10^6 PBMC + 6 % de Treg) y tratados con 1G3 o el isotipo de control IgG1 (200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$).

10 **Figura 22:** medias del volumen tumoral medido por bioluminiscencia de 6 experimentos independientes (20 μg de 1G3 o IgG1 por ratón, 50×10^6 PBMC + 6 al 8 % de Treg) (medida del flujo total). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$)

Figura 23: masas tumorales en gramos promediada en 6 experimentos independientes (20 μg de 1G3 o IgG1 por ratón, 50×10^6 PBMC + 6 al 8 % de Treg). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$)

15 **Figura 24:** análisis citométrico comparativo de la expresión de diferentes marcadores después de 5 días de acondicionamiento. A: expresión de CD4 entre Tconv activados (gris claro), activados con Gal-9 M (gris medio) o Gal-9-S (negro). B: expresión de CD127 entre Tconv activados (gris claro), activados con Gal-9 M (gris medio) o Gal-9-S (negro). C: expresión de CD25 entre Tconv activados (gris claro), activados con Gal-9 M (gris medio) o Gal-9-S (negro).

20 **Figura 25:** proliferación relativa de PBMC en función de diversas condiciones después de 3 días de cultivo con Tconv acondicionados por la forma M o S de la Gal-9 durante 5 días. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$)

25 **Figura 26:** análisis de la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores por el anticuerpo anti-gal9 1G3 y el anticuerpo anti-gal9 2E12 (a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mediante el análisis de la proliferación de PBMC cocultivadas con linfocitos T reguladores.

30 Descripción detallada de la invención

Ejemplos

1. Materiales y métodos

35 Donantes, líneas celulares y condiciones de cultivo

Células de donantes

40 Las células de donantes sanos se aislaron a partir de sangre procedente del Etablissement Français du Sang - Nord de France (EFS), según un acuerdo ético oficial entre este último y el Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) - Delegación Nord Pas-de-Calais y Picardie. El estudio fue aprobado por el Institut de Biologie de Lille (CNRS) y el comité institucional del EFS, y cada uno de los donantes había firmado previamente un consentimiento informado.

Líneas celulares de CNP

45 Las líneas de células tumorales C15 se derivan de un CNP (carcinoma nasofaríngeo) positivo para EBV xenotrasplantado y propagado continuamente en ratones SCID por vía subcutánea cada 6-7 semanas. Todos los experimentos con animales fueron llevados a cabo por personal cualificado, según la normativa francesa y europea, en las instalaciones para animales del Institut Pasteur de Lille (Francia). Las células C15 se recuperaron A PARTIR DE los tumores xenotrasplantados, a continuación se irradiaron (5000 rads) antes de preincubarse con las células inmunitarias simulando un contexto tumoral.

Línea linfocitaria T humana Jurkat

55 La línea Jurkat se estableció a partir de leucemia linfocitaria T humana. Presenta el fenotipo de linfocitos CD4+.

Condiciones de cultivo celular

60 El medio de cultivo estándar utilizado es RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) completado con suero un 10% de suero AB humano (BioWest, Nuaille, Francia), 2 mM de L glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 10 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM de HEPES, 50 U/ml de estreptomina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina y mercaptoetanol β 50 μM . Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada (5 % de CO₂ y 95 % de humedad) en una incubadora Hera Cell 150 (Thermo Electron, Cergy Pontoise, Francia). En su caso, las PBMC y las células T CD4+ se activaron con un anticuerpo anti CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Clinisciences, Montrouge, Francia), que se fija a la placa después de 65 2 horas de incubación a 37 °C antes del cultivo y un anticuerpo soluble anti CD28 (100 ng/ml) (Clinisciences) añadido extemporáneamente.

Aislamiento de las células inmunitarias humanasAislamiento de PBMC

5 Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad estándar utilizando Ficoll Paque PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Aislamiento de células T CD4+

10 Se aislaron células T CD4+ a partir de PBMC usando un protocolo de selección negativa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Berlín, Alemania). Brevemente, las PBMC se incuban durante 10 minutos con un cóctel de anticuerpos biotinilados dirigidos contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ y glicoforina A. A continuación se añaden perlas magnéticas antibiotina durante 15 minutos. Las células a eliminar se retienen magnéticamente en una columna de Magnetic Activated Cell Sorting (MACS®) colocada en un separador MACS®. Las células que a aislar pasan a través de la columna, se recogen y se enriquecen en células no marcadas, agotadas en células no diana. El análisis de citometría de flujo muestra que más del 98 % de las células aisladas son células CD4+.

Aislamiento de linfocitos T reguladores

20 El aislamiento de linfocitos T reguladores humanos a partir de PBMC de donantes adultos, se realizó utilizando un kit de aislamiento de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ (Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fracción de linfocitos T CD4+CD25- se conservó para los experimentos de citometría de flujo y quimioatracción. El análisis de citometría de flujo muestra, constantemente, un enriquecimiento superior al 95 % de la fracción CD4+CD25+.

Ensayo de proliferación celular

30 1×10^5 células (PBMC o células T CD4+) se incubaron con [metil 3H]timidina durante las últimas 18 horas de cultivo y se recogieron en un filtro de fibra de vidrio (Printed Filtermat A, Wallac, Turku, Finlandia) usando un colector Tomtec (Wallac). A continuación, se selló el filtro en una bolsa después de secarlo y añadir el líquido de centelleo (Beckman Coulter, Estados Unidos). La proliferación se midió después de la incubación en presencia de [3H]timidina (1 μ Ci/pocillo) (PerkinElmer, Courtaboeuf, Francia) durante las últimas 18 horas antes de la recogida. La radiactividad se midió usando un contador β (1450 Trilux, Wallac, Finlandia). Cada ensayo de proliferación se realizó en tres ejemplares y se estimó en "recuento por minuto" (cpm). Según los experimentos, los ensayos de proliferación se realizaron en presencia de 1 μ g/ml de la isoforma corta de la galectina 9 recombinante (Gal9S) suministrada por el Dr. Toshiro Niki (Galpharma, Japón), de 1 μ g/ml o de una gama del anticuerpo anti-galectina 9 1G3, de un anticuerpo anti-IGG1 irrelevante que sirve como control negativo (ebiosciences, Reino Unido), de 10 μ g/ml de exosomas de C15, de 5 mM de lactosa o de sacarosa (Sigma Aldrich).

Lisis celular

45 La técnica de medida de la lisis celular se basa en el uso de un kit de medida de citotoxicidad (CytoTox-Glo Assay, Promega, EE. UU.) que mide la actividad luciferasa proporcional a las proteasas celulares liberadas después de la citólisis. Los ensayos se realizan poniendo en cocultivo 6×10^5 CD4+CD25+ y 2×10^5 PBMC autólogas. Las células se cultivan en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Maxisorb Nunc, Dinamarca), en 200 μ l de medio de cultivo (RPMI-1640, L-glutamina 2 mM al 1 %, 0,02 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 10 % de suero humano AB descomplementado) (GIBCO BRLTM, Invitrogen®, GB). Las células se activan con 1 μ g/ml de anti-CD3, previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h 37 °C), y 100 ng/ml de anti-CD28. Después de 48 h de cultivo, se depositan 50 μ l del reactivo (aminoluciferina-Glo) en cada pocillo. Después de una agitación suave, las placas de cultivo se incuban durante 15 minutos, a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se realiza una primera medida de la luminiscencia con un luminómetro (Centro LB960, C Berthold Technologies, Francia), y esta es proporcional a la cantidad de células lisadas por los linfocitos T reguladores. A continuación, se depositan 50 μ l de una solución de digitonina en cada pocillo para inducir la lisis total de las células. A continuación, las placas se agitan y después se incuban durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en la oscuridad, antes de realizar la segunda medida de luminiscencia. Los ensayos se realizan por triplicado y los resultados se expresan como porcentaje de lisis.

$$\text{Porcentaje de lisis} = \text{viabilidad celular} / \text{lisís total media} - \text{ruido de fondo}$$

$$60 \quad \text{Viabilidad celular} = \text{Lisis total media} - \text{citólisis}$$

$$\text{Citólisis} = \text{Lisis media inducida por los linfocitos Treg} - \text{ruido de fondo}$$

65 Ensayo de inducción de la apoptosis en células Jurkat

Las células Jurkat cultivadas en RPMI 5 % de suero de ternero fetal se transfieren a un medio sin suero (Hybridoma SFM - Life Technologies) y después se incuban en presencia de galectina-9 a 30 nM durante 24 h en un pocillo de placa de 96 pocillos (100.000 células/pocillo). El recuento de las células en apoptosis se realiza mediante citometría de flujo después del marcado con anexina V-APC (aloficocianina) y con yoduro de propidio. Para evaluar la acción protectora de los anticuerpos monoclonales, la galectina se preincubó durante 30 minutos en presencia del anticuerpo, cuya concentración final para la incubación de 24 h es de 10 µg/ml.

Transferencia de Western

Los exosomas se lisaron (10 minutos en hielo) en tampón PY compuesto por Tris HCl 20 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X 100 al 1 %, azida sódica al 0,02 % y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Basilea, Suiza). Después de la centrifugación (20.000 g, 15 minutos, +4 °C), se eliminaron los restos celulares y se recogieron los sobrenadantes. Las concentraciones proteicas se midieron usando el ensayo Bio Rad Protein Assay de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioRad, Marnes la Coquette, Francia). A continuación, los exosomas se analizaron mediante transferencia de Western. Brevemente, las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS PAGE usando geles prefabricados en gradiente (gradiente del 4 al 12 %, Bis Tris, Invitrogen) en condiciones estándar. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybon dTM-C Extra, Amersham Biosciences, Reino Unido). Este último se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en un tampón de bloqueo que contenía un 0,2 % de reactivo de bloqueo AuroraTM (MP Biomedicals, Illkirch Graffenstaden, Francia), un 0,1 % de Tween20 (Sigma Aldrich) y PBS (1X), a continuación se incubó durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario dirigido contra la galectina 9: Galectin-9-CT-L1 1:100 (suministrado por Galpharma, Japón). La membrana se lavó con tampón de bloqueo, a continuación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-ratón, 1:10000) (GE Healthcare, Wauwatosa, Estados Unidos) y se lavó de nuevo con el tampón de bloqueo. Las señales específicas de las proteínas se visualizaron gracias al Western Lightning® Plus ECL, un kit que amplifica la quimioluminiscencia del sustrato (Perkin Elmer, Boston, MA, EE. UU.) y un analizador de imágenes luminiscentes LAS3000 (Fujifilm).

Análisis FACS

La inmunofenotipificación de las células por citometría de flujo se realizó usando el aparato "FACSCalibur flow cytometer". Después de recogerlas, las células se lavaron con "solución salina tamponada con fosfato" (PBS) (GIBCO-Life technologies) y se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (1:10). Para cada ensayo, se usaron los isotipos de control apropiados (anticuerpos monoclonales) para los ajustes de los marcadores. Por último, los datos se analizaron con el software FlowJo. Para detectar los antígenos de superficie celular, se usaron anticuerpos antihumanos de ratón: CD4-ficoeritrina(PE)-cianina(Cy)5 (BD Pharmingen, San Diego, Estados Unidos), -CD25-PE (Miltenyi Biotec, Alemania) y -CD127-FITC (1:20) (Clinisciences, Montrouge, Francia) según las instrucciones del fabricante.

PCR cuantitativa en tiempo real:

Los ARN totales de los linfocitos T reguladores se aislaron usando el kit "RNeasy minikit II" (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza de los ARN se midieron mediante el método de espectrofotometría (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotec). El ARN total se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.

La transcripción inversa de los ARNm se realizó de la siguiente manera: 2 µg del ARN total se mezclaron con 5 µl de la mezcla maestra compuesta por 1 µl de oligo dT (Roche Diagnostic, Meylan, Francia) y 0,1 µl de RNAsin (40 U/µl, Promega, Charbonnières, Francia) y después se incubaron a 70 °C durante de 5 a 10 minutos. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 10 µl de una segunda mezcla: 6 µl de tampón 5X (Invitrogen) + 1 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen) + 2 µl de dNTP 10 mM (Amersham) + 0,1 µl de RNAsin a 40 U/µl (Promega) + 1 µl de Superscript (Invitrogen). La reacción fue seguida por una primera incubación de 45 a 60 minutos a 45 °C, una segunda incubación de 5 minutos a 95 °C y después un tratamiento de 20 minutos con RNasa H (Promega). Por último, se añadió agua destilada ultrapura (GIBCO-Life Technologies) para obtener una concentración final de 10 ng de ADN total/µl. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

Los transcritos se cuantificaron usando PCR en tiempo real (RT-PCR) con el sistema de detección de secuencias Mx3005PTM (Agilent Technologies, Francia), en placas ópticas de 96 pocillos (Eurogentec S. A., Bélgica). En cada pocillo, 10 µl de un par específico de cebadores, diseñados para RT-PCR y comprados a MWG-Biotec (Alemania), se depositaron a una concentración final de 10 pg/ml y después se almacenaron a -20 °C. Los genes de mantenimiento β-actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), ubiquitina e hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT) se usaron como controles en cada placa. Las reacciones de PCR se realizaron según las instrucciones del fabricante, a un volumen final de 20 µl y para un µl de ADNc (equivalente a 10 ng de ARN total/µl), usando 2X MESA GREEN qPCR MasterMix Plus para el SYBR® 258 Assay (Eurogentec) que contiene ADN polimerasa Meteor Taq, MgCl₂ (concentración final 4 mM), dNTP (incluyendo dUTP), SYBR® 260 Green I, estabilizadores y referencias pasivas necesarias para la normalización de la señal y el tampón con componentes optimizados

El programa de PCR incluyó una desnaturalización inicial y activación de Meteor Taq durante 5 minutos a 95 °C,

seguido de 40 ciclos estándar de amplificación de la siguiente manera: 15 segundos a 95 °C (desnaturalización), 1 minuto a 60 °C (síntesis y alargamiento). Los productos fluorescentes se detectaron en la última etapa de cada ciclo. El análisis de la curva de fusión se realizó inmediatamente después de la amplificación, según las instrucciones del fabricante.

5 Se usaron reacciones de PCR cuantitativas para cuantificar la expresión del gen de la galectina 9 por los linfocitos T reguladores. Los genes de mantenimiento de β -actina, G3PDH, ubiquitina e hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT) se usaron como controles. Todos los cebadores se diseñaron para RT-PCR y se compraron a MWG-Biotech (Alemania). Se realizó un análisis cuantitativo basado en el valor del "umbral de ciclo" (CT) para cada pocillo y se calculó usando el software MxPro. Cada valor individual se normalizó utilizando la media de los 4 genes de mantenimiento según el método estándar de ΔCT : $\Delta CT = C_T - C_T \text{ genes de mantenimiento}$. Para la comparación entre grupos, la expresión relativa de genes se expresó en $2^{-\Delta\Delta C_T}$ dando un valor arbitrario de 1 para la muestra de referencia.

15 **Fabricación de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la galectina-9, 1G3 y 2E12.**

Se utilizó como inmunógeno una proteína recombinante que representa la porción C-terminal de la galectina 9 humana (residuos 191 a 355 de la isoforma larga de la galectina-9). Esta se produjo en *E. coli* en forma de proteína de fusión GST. Después de la separación de la etiqueta GST, la proteína se purificó mediante cromatografía de exclusión.

20 Las inmunizaciones fueron efectuadas por la compañía PX'Therapeutics (Grenoble, Francia). Cinco ratones BALB-c hembra, de ocho semanas de edad, se inmunizaron con la porción C-terminal de la galectina 9 mencionada anteriormente. Para las inmunizaciones, se inyectaron 40 microgramos de proteína por vía intraperitoneal los días 0, 22, 37 y 54 en combinación con adyuvante completo de Freund para la primera inyección, o con adyuvante incompleto de Freund para las siguientes inyecciones. La calidad de la inmunización se evaluó mediante un ensayo ELISA, descrito a continuación, en muestras de suero de los ratones inmunizados. La misma preparación de galectina 9 C-terminal recombinante se utilizó para las inmunizaciones por un lado y para las pruebas de ELISA por otro lado. Estos ensayos permitieron mostrar una buena inmunización en los cinco ratones tratados.

30 Tres días después del último refuerzo, se sacrificaron los dos ratones que dieron la mejor respuesta y se recogieron sus esplenocitos. Estos esplenocitos se utilizaron para la fusión con células de mieloma murino Sp2/O, ya sea en medio líquido, ya sea en medio semisólido, con relaciones respectivas de 5:1 y 2:1. A continuación, se evaluaron los sobrenadantes de hibridoma mediante un ensayo ELISA, realizado como el anterior y como se describe a continuación, en la preparación de galectina 9 recombinante mencionada anteriormente.

35 La fusión semisólida fue exitosa y se obtuvieron 39 hibridomas que secretaban anticuerpos que reaccionaban con la galectina 9 en ELISA. Siete de ellos fueron seleccionados debido a una secreción particularmente abundante de inmunoglobulinas y una elevada reactividad en ELISA. A continuación, estos siete hibridomas se sometieron a nuevos cribados funcionales para estudiar las propiedades neutralizantes anti-galectina 9 de los anticuerpos producidos.

40 El ensayo ELISA se realizó de la siguiente manera. La proteína recombinante que representa la porción C-terminal de la galectina 9 se adsorbió en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (50 ng/pocillo) (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, Francia) de la siguiente manera: disolución en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M a pH 9,6 e incubación en los pocillos durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavado con PBS que contenía un 0,1 % de Tween-20, los pocillos se saturaron con un 3 % de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se incubaron con los sueros de ratón o los sobrenadantes de hibridomas a ensayar. Los sueros y los sobrenadantes hibridoma se diluyeron en PBS con un 1 % de BSA y después se incubaron en los pocillos a temperatura ambiente durante 2 h. Después de una etapa de lavado con PBS-Tween-20 al 0,1 %, las placas se trataron con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (anti-ratón de cabra). La revelación final tiene lugar después de la adición de sustrato (3,3', 5, 5' tetrametilbencidina o TMB; Thermo Fisher Scientific) y la medida de la absorbancia a 405 y 620 nm en un lector de microplacas Multiskan Ex (Thermo Fisher Scientific).

Ensayos *in vivo* en ratones transgénicos

55 Los ratones inmunodeficientes primero se esplenectomizan y luego se xenotransplantan con una línea celular de C666-1 de CNP modificada para expresar luciferasa, lo que permite seguir el crecimiento tumoral en bioluminiscencia mediante imágenes en un animal consciente. El sistema inmunitario de los ratones se reconstituye y humaniza tras la inyección de PBMC humanas más o menos enriquecidas en linfocitos T reguladores (2 % de linfocitos T reguladores en las PBMC originales y adición del 6 al 10 % de linfocitos T reguladores en PBMC). Ya se ha demostrado que las PBMC, en cierta medida, son capaces de limitar el crecimiento tumoral y que el enriquecimiento en linfocitos T reguladores no obstaculiza este efecto (Morales et al, Activation of a Helper and Not Regulatory Human CD4+ T Cell Response by Oncolytic H-1 Parvovirus; PLoS One. 2012; 7(2): e32197). A continuación, se inyectó el anticuerpo anti-Gal-9 1G3 y se evaluó su efecto sobre el crecimiento tumoral.

65 Se siguió el siguiente protocolo experimental: Los ratones SCID de 6 a 8 semanas de edad se someten a esplenectomía total. Después de 7 días, estos mismos

ratones se xenotransplantan por vía subcutánea con células de una línea tumoral C666-luc (que expresan luciferasa) derivadas de un carcinoma nasofaríngeo (CNP). El mismo día, los ratones reciben por vía intraperitoneal, de 30 a 50 millones de PBMC para la reconstitución del sistema inmunitario, enriquecidas o no a un 10 % en linfocitos T reguladores y, según los animales, 2, 20 o 200 µg de anticuerpos IgG1 o de anticuerpos 1G3 por vía subcutánea según el siguiente esquema (3 ratones/grupo):

- **Gp1:** Isotipo IgG1 (no reconstituidos)
- **Gp2:** 1G3 (no reconstituidos)
- **Gp3:** reconstituidos + 10 % de Treg + isotipo IgG1
- **Gp4:** reconstituidos (sin tratar)
- **Gp5:** reconstituidos + 10 % de Treg + 1G3

Todos los ratones reciben 3 µg de CPG-ODN2216 (comercializado por MILTENYI BIOTECH) para activar la respuesta inmune.

El seguimiento se realiza tres veces por semana durante 4 semanas mediante lecturas de luminiscencia en la plataforma de formación de imágenes de animales pequeños (IVIS® Lumina XRMS, PerkinElmer) y mediante medidas manuales del volumen y la masa tumoral. Los días 7, 14 y 21 posteriores al trasplante, los ratones reciben un refuerzo de CPG-ODN2216 (comercializado por MILTENYI BIOTECH) y, en función de los grupos presentados anteriormente, un refuerzo de anticuerpos 1G3 o IgG1. Antes del primer refuerzo, se toma una muestra de sangre para comprobar la reconstitución mediante citometría de flujo (ver protocolo en la página 58). Después de 28 días de medida, se sacrifican los ratones, se recuperan los tumores y se crioconservan en previsión de la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia y se toma de nuevo una muestra de sangre para su análisis mediante citometría de flujo.

Se evaluó el impacto de diferentes concentraciones de 1G3 y de isotipo IgG1 [2, 20 y 200 µg/ml] sobre (i) el peso de los ratones, (ii) el volumen tumoral y (iii) la masa tumoral en el momento del sacrificio.

(i) Análisis del impacto de la inyección del anticuerpo 1G3 sobre el peso de los ratones

Los ratones entrantes se pesan regularmente [del día 5 al día 28].

(ii) Análisis del impacto de 1G3 sobre el volumen tumoral (medida manual)

Se llevaron a cabo varios experimentos individuales en ratones SCID humanizados siguiendo el protocolo descrito anteriormente y variando la concentración de 1G3 y de IgG1 inyectados. El volumen de los tumores se midió manualmente.

Por otro lado, con el fin de obtener un gráfico representativo del impacto de 1G3 sobre el volumen tumoral, se realizaron resultados promedio agrupando 6 experimentos *in vivo* independientes con el anticuerpo 1G3 o el isotipo de control (20 µg).

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de suma de rangos de Mann Whitney (*p <= 0,05, **p <= 0,001).

El volumen del tumor también se midió mediante el análisis de la bioluminiscencia emitida por las células tumorales que expresan el gen de la luciferasa, después de la inyección de luciferina. La luminiscencia se mide mediante el uso del sistema de medida de bioluminiscencia de ratón (IVIS LUMINA). Se realizaron seis experimentos individuales en ratones SCID humanizados siguiendo el protocolo descrito anteriormente y variando la concentración de 1G3 y IgG1 inyectados.

Por otro lado, con el fin de obtener un gráfico representativo del impacto de 1G3 sobre el volumen tumoral, se llevaron a cabo resultados promedio de 6 experimentos *in vivo* independientes con el anticuerpo 1G3 o el isotipo de control (20 µg).

Por último, los tumores de ratones tratados con 1G3 o el isotipo de control de IgG1 se fotografiaron en papel milimetrado para medir el tamaño del tumor en el momento del sacrificio.

(iii) Análisis del impacto de 1G3 sobre la masa tumoral

Los tumores de ratones tratados con 1G3 o el isotipo de IgG1 de control se pesaron después del sacrificio. La masa se expresa en gramos.

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de suma de rangos de Mann Whitney (*p <= 0,05, **p <= 0,001) (figura 22).

Análisis de la capacidad de 1G3 para inhibir la inducción de linfocitos T reguladores por la galectina 9

Se ha demostrado que la galectina 9 es capaz de inducir la diferenciación de células T CD4 indiferenciadas en linfocitos Treg (Seki, Oomizu *et al.* 2008), lo que refuerza la importancia de esta lectina en los fenómenos de agotamiento de la respuesta inmune antitumoral.

5 En primer lugar, por lo tanto, se verificó si la galectina 9 puede transformar o no las células Tconv en Treg. Las células Tconv se cultivaron durante 3 o 5 días en condiciones de activación o no activación, con o sin una isoforma de la galectina 9 (Gal-9 S o Gal-9 M), con o sin 1G3. Después de estas fases de acondicionamiento, las células se recuperan, se lavan y se analizan por citometría de flujo y se colocan en cocultivo con PBMC o Tconv autólogas.
10 También se recuperó el medio de cultivo para un análisis ELISA.

15 El protocolo es el siguiente: las PBMC se aislaron por purificación en un gradiente de Ficoll y los linfocitos T convencionales se aislaron en columnas magnéticas según el protocolo del proveedor (Miltenyii Biotech, T Cell Isolation kit). Una parte de las PBMC se conserva en una condición de no activación y los Tconv autólogos se cultivan durante 5 días en una condición de activación o no activación. La activación se realiza mediante el anti CD3 (1 µg/ml) (proporcionado por el equipo de Anne Tscopoulos, CIIL) previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h a 37 °C) y anti CD28 (100 ng/ml) (Clinisciences, Francia).

20 Estas células T están acondicionadas o no por las isoformas de Gal-9 S o M a 2 µg/ml en presencia o no del anticuerpo 1G3 a 3 µg/ml. Después de 5 días, los Tconv acondicionados se lavan, la viabilidad se establece contando con azul de Tripano* (ver más adelante), el sobrenadante se recupera para ensayos ELISA y 10⁵ células se analizan mediante citometría de flujo para medir la expresión de los marcadores CD4, CD25 y CD127. El resto de las células convencionales se ponen en contacto con las PBMC autólogas que se habían conservado para el ensayo de MLR.

25 En efecto, los ensayos de supresión se llevan a cabo mediante MLR (Mixed lymphocytes reaction) poniendo en cocultivo, 10⁵ Tconv acondicionados con 10⁵ PBMC autólogas (relación 1:1), en presencia o no del anticuerpo 1G3 o 2E12. Las células se activan con 1 µg/ml de anti CD3, previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h a 37 °C) y anti CD28 (100 ng/ml).

30 Después de 3 días de cocultivo, la proliferación se evalúa mediante la incorporación de 1 µCi/pocillo de timidina tritiada (³H Th) (GE HEALTHCARE, Francia), 18 h antes del final del cultivo. Después de 3 días, las placas se filtran a través de filtros de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Francia). El filtro se incuba en un líquido de centelleo líquido (Beckman Instruments Inc, Ready safe, EE. UU.) y se lee en el contador de centelleo (1450 Trilux, Wallac, Finlandia). Los resultados se expresan finalmente en recuentos por minuto (cpm). El análisis estadístico se realizó mediante una
35 prueba de suma de rangos de Mann Whitney (*p <= 0,05, **p <= 0,001)

Recuento con azul de tripano

40 El colorante azoico vital (azul de tripano) para teñir las células muertas. El recuento se evalúa por incorporación de 1 volumen de solución de azul de tripano al 0,4 % (Sigma, EE. UU.) Para un volumen de suspensión celular. Después de 3 minutos, la mezcla se deposita sobre un portaobjetos Thomas. Se cuentan las células muertas que parecen azules y las células vivas refringentes. Las medidas se realizan por triplicado y los resultados se expresan como porcentaje de células vivas.

45 Medida de la secreción de la galectina 9 mediante ELISA

50 50 µl de una solución de 0,2 µg/ml de anticuerpo anti-Gal9 (Clon: SEA309Hu-Uscn Life Science Inc, EE. UU.) se fijan en placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca), durante 1 noche a 4 °C. Después de 4 lavados con 1X PBS (Euromedex, Francia)-Tween (Sigma Aldrich, EE. UU.) al 0,05 %, las placas se saturan con PBS-BSA al 3 % (Sigma-Aldrich®, EE. UU.) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, se lavan 3 veces con PBS-Tween al 0,05 %. Se depositan 100 µl/pocillo de sobrenadante de cultivo de Treg activados o no por duplicado, y se incuban durante 2 h a temperatura ambiente. Los Treg se activan convencionalmente con anti CD3 (1 µg/ml) (proporcionado por el equipo de Anne Tscopoulos, CIIL) previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h a 37 °C) y anti CD28 (100 ng/ml) (Clinisciences, Francia).

55 En cada placa, se prepara una gama de galectina 9 recombinante (Uscn Life Science Inc, EE. UU.) con una concentración de 2,5 ng/ml a 2,5 µg/ml, en PBS-BSA al 1 %.

60 Después de 3 lavados con PBS-Tween, 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario biotinilado, a 1 µg/ml, se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar la placa 3 veces y se amplifica la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de estreptavidina-peroxidasa 1/10000, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 4 lavados, las placas se revelan con 100 µl/pocillo de solución de revelación de OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina) (Sigma-Aldrich®, EE. UU.) A 1 mg/ml durante 10 minutos en la oscuridad. Esta reacción se detiene añadiendo 50 µl/pocillo de HCl (VWR, EE. UU.) 2 N.

65 A continuación, se leen las placas con un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 492 nm (Multiskan Ex,

ThermoLabsystems, Francia).

Medida de la viabilidad de las PBMC

- 5 Los ensayos de viabilidad se realizaron directamente mediante el método CellTiter-Glo, que permite medir el metabolismo mitocondrial. El mismo protocolo se utiliza para evaluar la viabilidad de los Tconv.

10 2×10^5 de PBMC autólogas se depositan en cocultivo. Las células son activadas [activación por el anti CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) (proporcionado por el equipo de Anne Tsicopoulos, CIIL) previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h a 37 °C) y anti CD28 (100 ng/ml) (Clinisciences, Francia)] o no dependiendo de las condiciones y se incuban con el anticuerpo 1G3 o el isotipo de control 1G1 a una concentración de 3, 6 o 12 $\mu\text{g/ml}$. El cultivo se realiza en placas de 96 pocillos de fondo plano con "paredes" opacas (Corning3610, Corning Incorporated, EE. UU.) en 100 μl de medio de cultivo (DMEM + 4,5 g/l de glucosa + L-glutamina, 100 U/mM de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, 10 % de suero AB humano descomplementado) (GibcoBRLTM, life technologies, GB).

15 El ensayo usa el Kit Promega CellTiter-Glo luminescent Cell Viability Assay (Promega corporation, EE. UU.), que utiliza la actividad luciferasa, en presencia de oxígeno, para medir el metabolismo celular (ATP) como indicador de la viabilidad celular. Después de 48 h de cultivo, 100 μl del reactivo (luciferina, luciferasa y tampón que contiene magnesio) se añaden a cada pocillo; agitación de la placa durante 2 minutos y después incubación durante 15 minutos, a temperatura ambiente, protegida de la luz. Los ensayos se realizan por triplicado y la lectura de las placas se efectúa con un luminómetro (Centro LB960, C Berthold Technologies, Francia). Lectura 1 s/pocillo.

Marcados membranarios de Tconv por citometría de flujo (Facs)

25 Anticuerpos utilizados (Ac)

Anticuerpos primarios monoclonales anti-humanos acoplados a fluorocromos, anti-CD4-PE (ficoeritrina)-C (cianina)5 (BD PharmingenTM, EE. UU.), anti-CD25-PE (Miltenyi Biotec, Francia), anti-CD127-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (Clinisciences, Francia).

30 Para la compensación, se utilizó el isotipo de control de los diferentes anticuerpos monoclonales.

Protocolo de marcado directo

35 Las células (2×10^5) se recogen en un volumen de 100 μl de PBS estéril (GIBCO BRLTM, Invitrogen®, GB) y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad con 10 μl de anti-CD4-PC, 10 μl de anti-CD25-PE y 4 μl de anti-CD127-FITC. A continuación, las células marcadas se recogen con 400 μl de PBS y la fluorescencia se analiza mediante citometría de flujo en el Facscalibur (FACS Flow Supply System, Becton Dickinson, EE. UU.).

40 Los resultados de la citometría se analizan mediante el software Flow Jo (Tree Star Incorporation, EE. UU.). Para determinados experimentos, después de la adición de los anticuerpos marcados, las células se fijan por adición de 100 μl de PFA al 4 % (Sigma Aldrich, EE. UU.) durante 10 minutos y después se recogen en 200 μl de PBS antes del análisis con un citómetro.

45 **Proliferación y supresión (MLR) (2E12)**

Control de proliferación

50 Los ensayos de proliferación se realizan en 10^5 PBMC cultivadas durante 48 h. Las células se cultivan en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc, Dinamarca) en 200 μl de medio de cultivo (RPMI-1640, L-glutamina 2 mM al 1 %, 0,02 mM de piruvato de sodio, 100 U/mM de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, 10 % de suero humano AB descomplementado) (GibcoBRL™, Invitrogen, GB). Son activadas por el anti CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) (proporcionado por el equipo de Anne Tsicopoulos, CIIL) previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h a 37 °C) y anti CD28 (100 ng/ml) (Clinisciences, Francia), en presencia o no de anticuerpos 1G3 o 2E12.

55 Supresión

60 Los ensayos de supresión se llevan a cabo mediante MLR (Mixed lymphocytes reaction) poniendo en cocultivo, 6×10^4 Treg con 10^5 PBMC autólogas, en presencia o no del anticuerpo 1G3 o 2E12. Las células se activan con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti CD3, previamente aplicado como recubrimiento en las placas (2 h a 37 °C) y anti CD28 (100 ng/ml).

65 La proliferación se evalúa mediante la incorporación de luCi/pocillo de timidina tritiada ($^3\text{H Th}$) (GE HEALTHCARE, Francia), 18 h antes del final del cultivo. Después de 48 h, las placas se filtran a través de filtros de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Francia). El filtro se incuba en un líquido de centelleo líquido (Beckman Instruments Inc, Ready safe, EE. UU.) y se lee en el contador de centelleo (1450 Trilux, Wallac, Finlandia). Los resultados se expresan finalmente en recuentos por minuto (cpm).

Resultados**Análisis fenotípico de las PBMC y de los linfocitos T reguladores**

5 El análisis por citometría de flujo (FACS) de las PBMC muestra que los linfocitos T reguladores CD4+CD25+CD127- representan el 1 % de las PBMC totales (resultados no mostrados).

10 Por otro lado, Por otro lado, el análisis FACS de los marcadores fenotípicos de linfocitos T reguladores autólogos aislados *ex vivo* indica que el 95 % de los linfocitos T reguladores son CD4+CD25+ y que entre estas células, el 90 % son CD127- o CD127low y más del 86 % FoxP3+ (figura 1).

Los linfocitos T reguladores activados tienen una actividad supresora

15 La actividad supresora de los linfocitos T reguladores humanos, aislados *ex vivo* a partir de la sangre de donantes sanos, se caracterizó por dos análisis funcionales complementarios: un ensayo de supresión de la proliferación de PBMC activadas por los linfocitos T reguladores autólogos y un ensayo de citólisis de PBMC activadas por linfocitos T reguladores autólogos (figura 2).

20 La figura 2A muestra que las PBMC activadas solas proliferan bien *in vitro* mientras que los linfocitos T reguladores aislados *ex vivo* son anérgicos, incluso después de su activación. No obstante, la proliferación de PBMC activadas disminuye en más del 24 % en presencia de linfocitos T reguladores autólogos activados para una proporción de 4:2 (ver la figura 2A). Por lo tanto, el ensayo de proliferación (MLR) demuestra claramente que los linfocitos T reguladores aislados *ex vivo* y en condición de activación poseen una actividad inmunosupresora.

25 Los resultados obtenidos por el ensayo de proliferación están respaldados por los resultados del ensayo de citólisis. En efecto, se demuestra en la figura 2B que, cuanto menor es la proporción de PBMC:linfocitos T reguladores, mayor es el porcentaje de lisis de las PBMC activadas. Por lo tanto, los linfocitos T reguladores inducen la lisis de las PBMC autólogas, en diferentes proporciones y de una manera dependiente de la dosis.

La galectina 9 está presente en, y es expresada por, los linfocitos T reguladores

30 Los análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (figura 3) y transferencia de Western (figura 4) muestran que la galectina 9 está presente en los linfocitos T reguladores humanos aislados *ex vivo* y que estos últimos expresan la galectina 9, lo que sugiere que los linfocitos T reguladores utilizan la vía de la galectina 9 para inhibir la proliferación de los linfocitos T efectores.

La expresión de la galectina 9 por los linfocitos T efectores disminuye durante la activación; la expresión de la galectina 9 por los linfocitos T reguladores aumenta durante la activación

40 La figura 14 demuestra que mientras que los linfocitos T conv y los linfocitos T reguladores inactivados producen cantidades muy bajas de galectina 9 (<10 pg/ml: es decir, por debajo del umbral de detección de un ensayo ELISA), los linfocitos T reguladores humanos activados son capaces de sintetizar y secretar galectina 9 en el medio extracelular. Por otro lado, esta secreción de la galectina 9 es significativamente mayor cuando los linfocitos T reguladores están activados, vinculando esta secreción a su función supresora.

La figura 5 demuestra que la relación de linfocitos T CD4+ convencionales: linfocitos T reguladores disminuye considerablemente durante la activación.

50 Los linfocitos T CD4+ convencionales activados expresan poco el gen que codifica la galectina 9 y esta expresión disminuye significativamente durante su activación.

Por el contrario, la expresión del gen que codifica la galectina 9 por los linfocitos T reguladores aumenta durante su activación (ver figuras 5 y 6)

55 De esta manera, los linfocitos T efectores activados constitutivamente, que tienen una acción antitumoral, no serán la diana del anticuerpo anti-gal9. Por el contrario, los linfocitos T reguladores activados y por lo tanto funcionales, serán una diana predilecta del anticuerpo anti-gal9.

60 El análisis de la expresión proteica diferencial de la galectina 9 en linfocitos T reguladores y las células T CD4+, fue reafirmada por citometría de flujo. Como se observa en la figura 10, la expresión basal es baja y casi idéntica entre los linfocitos T reguladores y las células T CD4+ recién aisladas. A pesar de ello, se observa que tras la activación del TCR (anti-CD3/anti-CD28), el perfil de expresión cambia con la aparición de una población en los linfocitos T reguladores que expresa muy fuertemente la galectina 9. Esta sobreexpresión persiste y aumenta proporcionalmente al tiempo, mientras que la expresión basal de la galectina 9 permanece baja en las células T CD4+ conv, incluso después de la activación (figura 10).

65

De esta manera se demuestra que la sobreexpresión de la galectina 9 es específica de los linfocitos T reguladores activados y que existe una expresión muy débil de la galectina 9 en células T CD4+ conv en condiciones basales y después de la activación. De esta manera se elimina el riesgo de dirigirse a linfocitos T CD4+ efectores, lo que permite que el paciente tratado según la invención conserve sus defensas inmunitarias.

La actividad supresora de los linfocitos T reguladores es inhibida por el anticuerpo anti-galectina 9 1G3

Para evaluar *in vitro* el impacto del anticuerpo 1G3 sobre la actividad de los linfocitos T reguladores, se utilizó un ensayo de proliferación celular basado en la incorporación de timidina tritiada.

La figura 7 muestra los resultados del ensayo de proliferación de PBMC en presencia de C15 irradiadas en presencia o no de linfocitos T reguladores y en presencia o no de anticuerpo 1G3 a la concentración de 1 µg/ml.

En primer lugar, los controles positivos de la prueba confirman que la activación de las PBMC sí conduce a un aumento de su proliferación y que la presencia de linfocitos T reguladores induce efectivamente una disminución de la proliferación celular de las PBMC.

También se demuestra que la irradiación de las células tumorales C15 induce efectivamente una detención de su proliferación. Las células C15 son anérgicas.

De hecho, la presencia de células tumorales C15 induce una disminución de la proliferación celular de PBMC humanas.

A continuación se demuestra que la presencia de linfocitos T reguladores en el cocultivo de PBMC y de C15 induce una disminución suplementaria significativa en la proliferación, de aproximadamente el 56 %.

La figura 7 muestra claramente que, de forma inesperada, la presencia del anticuerpo 1G3 permite restaurar la proliferación de PBMC. De esta manera, se sugiere que el anticuerpo 1G3 neutraliza la galectina 9 presente en, y expresada por, los linfocitos T reguladores. Por consiguiente, se pone de manifiesto que el anticuerpo 1G3 inhibe la actividad supresora de los linfocitos T reguladores.

El anticuerpo anti-galectina 9 1G3 tiene una eficacia superior a otros anticuerpos anti-galectina 9

Para comparar el efecto del anticuerpo 1G3 con otros anticuerpos anti-galectina 9, o incluso con un anticuerpo anti-Tim 3, sobre la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, se efectuaron varios ensayos.

De esta manera, el efecto de diferentes anticuerpos anti-galectina 9 sobre la inhibición de la apoptosis inducida por galectina 9, así como el efecto de anticuerpos anti-galectina 9 sobre la restauración de la proliferación después del tratamiento de PBMC humanas con la galectina 9 se analizaron. Los anticuerpos anti-galectina 9 ensayados en comparación con 1G3 no reconocen el mismo epítipo de la galectina 9 que el anticuerpo 1G3.

También se ensayó un anticuerpo anti-Tim 3. En efecto, se han planteado ciertas teorías en relación con un vínculo entre el receptor Tim-3, que estaría presente en los linfocitos T, y el efecto proapoptótico de la galectina 9.

Inhibición de la apoptosis inducida por la galectina 9

La figura 8 presenta los resultados del ensayo sobre el efecto de los anticuerpos ensayados sobre la apoptosis de las Jurkat inducida por la galectina 9 recombinante.

Los anticuerpos ensayados corresponden al anticuerpo 9M1 (anti-galectina 9), 9S2-3 (anti-galectina 9), 1G3 (anti-galectina 9), un anticuerpo anti-TIM3, 2E12 (anti-galectina 9).

Como se observa en la figura 8, la protección contra la apoptosis de las Jurkat es mejor con el anticuerpo 1G3 que con los otros anticuerpos anti-galectina 9 9S2-3 y 9M1 o el anticuerpo anti-TIM3.

Restauración de la proliferación después del tratamiento con galectina 9

La figura 9 presenta los resultados del ensayo sobre el efecto de los anticuerpos ensayados sobre la proliferación de PBMC humanas previamente tratadas con galectina 9.

Los anticuerpos ensayados corresponden al anticuerpo ECA-42 (anti-galectina 9), 1G3 (anti-galectina 9), 2E2 (anti-TIM3) y 2E12 (anti-galectina 9).

Como se observa en la figura 9, la proliferación de PBMC humanas se restaura de manera más eficaz con el anticuerpo 1G3 que con los otros anticuerpos anti-galectina 9 ECA-42 y 2E12 o el anticuerpo anti-TIM3 (2E2).

Efecto sobre los linfocitos T conv (T CD4+)

La figura 11 presenta los resultados del ensayo sobre el efecto de la galectina 9 y del 1G3 sobre los linfocitos T conv (T CD4+) mediante medida de la proliferación en células recién aisladas, mediante la incorporación de timidina tritiada durante las últimas 18 horas de cultivo. Los resultados también se expresan en recuentos por minuto (CPM).

Al igual que las PBMC (figura 9), los Tconv aislados *ex vivo* proliferan en condiciones de activación. También se demuestra que la galectina 9 inhibe significativamente la proliferación de los Tconv, de la misma manera que las PBMC.

Finalmente, cabe destacar en esta figura 11 que el anticuerpo anti-galectina 9 (1G3) no tiene efecto sobre la proliferación de los Tconv.

Análisis del efecto citotóxico del anticuerpo 1G3 y de su isotipo de control sobre la proliferación de las PBMC

El efecto de dosis crecientes de anticuerpo 1G3 o su isotipo de control (IgG1) se analizó en las PBMC midiendo la proliferación en células recién aisladas extraídas de la sangre de 3 donantes mediante la incorporación de timidina tritiada durante las últimas 18 horas del cultivo. Los resultados se obtuvieron en CPM.

Se observa en la figura 12 que las PBMC aisladas *ex vivo* proliferan *in vitro* en condiciones de activación. También cabe destacar que el anticuerpo 1G3 y su isotipo IgG1 de control no afectan a la proliferación de PBMC, incluso con grandes dosis de anticuerpo monoclonal (de 3 a 12 µg/ml).

Análisis del efecto citotóxico del anticuerpo 1G3 y de su isotipo de control sobre la viabilidad de las PBMC

El aumento en la dosis de mAb 1G3 y su isotipo de control (1G1) se analizaron midiendo la viabilidad de PBMC recién aisladas a partir de 3 donantes mediante análisis luminométrico. Se midió el metabolismo mitocondrial durante 5 días de activación. Los resultados se obtuvieron en RLU.

La figura 13 muestra que las PBMC aisladas *in vivo* mantienen y aumentan su viabilidad *in vitro* en condiciones de activación. Esto también demuestra que el 1G3 y el isotipo 1G1 no modifican la viabilidad de las PBMC, incluso a altas dosis de anticuerpos (de 3 a 12 µg/ml).

De esta manera, se ha demostrado que el anticuerpo 1G3 no afecta ni a la proliferación, ni la viabilidad de las PBMC humanas y de los T CD4+. De esta manera, el riesgo de efectos secundarios, tales como la inducción de inmunosupresión que sería favorable a la progresión tumoral, se reduce. Esto permite un mejor mantenimiento de las defensas inmunitarias, en concreto antitumorales, en el paciente tratado según la invención.

Análisis del efecto neutralizante de 1G3 sobre la actividad supresora de los linfocitos T reguladores

El potencial de inhibición de la función de los linfocitos T reguladores por el anticuerpo 1G3 se analizó mediante ensayos de proliferación de una reacción leucocitaria mixta de linfocitos T reguladores y T convencionales.

Como se esperaba, los resultados demostraron que los linfocitos T reguladores inhiben la proliferación de estas células en cocultivo (figura 15). Además, un precultivo de 2 horas con 1G3 fue suficiente para revertir este efecto inhibitorio. El uso del isotipo de control de 1G3, que no tiene ningún efecto sobre los Treg, permite concluir que esta reversión de la inhibición inducida de los linfocitos T reguladores es específica y pasa por la galectina 9.

Para determinar si 1G3 inhibe los linfocitos T reguladores actuando sobre la galectina 9 soluble o directamente sobre los linfocitos T reguladores, se realizó un ensayo con un inhibidor que bloquea la galectina 9 soluble, y se comparó con los resultados obtenidos con el anticuerpo 1G3.

Los resultados muestran claramente que el inhibidor químico no tuvo ningún efecto significativo sobre la actividad supresora de los linfocitos T reguladores. El uso con el anticuerpo 1G3, de nuevo, provocó una reversión de la supresión inducida por los linfocitos T reguladores. De esta manera, estos resultados confirman que la galectina 9 interviene en la supresión inducida por los linfocitos T reguladores y que 1G3 es capaz de revertir esta inhibición.

Neutralización *in vivo* de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores

Se evaluó el impacto de diferentes concentraciones de 1G3 y de isotipo IgG1 [2, 20 y 200 µg/ml] sobre (i) el peso de los ratones, (ii) el volumen tumoral y (iii) la masa tumoral en el momento del sacrificio.

(i) Análisis del impacto de la inyección del anticuerpo 1G3 sobre el peso de los ratones

Como se observa en la figura 18 A y B, los ratones tratados con 1G3 son más ligeros en comparación con los tratados con el isotipo de control. Estos resultados sugieren que la reducción de peso en el ratón tratado puede estar

relacionada con la reducción del tumor.

(ii) Análisis del impacto de 1G3 sobre el volumen tumoral (medida manual)

5 Los resultados obtenidos representados en la Figura 19 A-D indican un efecto positivo del 1G3, que induce una limitación significativa del crecimiento tumoral en comparación con el isotipo de control.

Por otro lado, los resultados presentados en la figura 20 indican claramente una diferencia significativa entre la inmunización con 1G3 o su isotipo de control, estando el crecimiento tumoral por 1G3 muy limitado.

10 Estos resultados también se confirman mediante las medidas por bioluminiscencia (figura 21 A-D, figura 22), induciendo 1G3 una limitación del crecimiento tumoral en comparación con su isotipo de control.

15 Por último, las fotografías de los tumores (no representadas) también demuestran el efecto positivo de 1G3 que induce una limitación del crecimiento tumoral en comparación con su isotipo de control.

(iii) Análisis del impacto de 1G3 sobre el tamaño del tumor

20 Los resultados referentes a la masa del tumor (figura 23) confirman, a su vez, el efecto beneficioso del 1G3 frente a su isotipo control.

Análisis de la capacidad del 1G3 para inhibir la inducción de linfocitos T reguladores por la galectina 9

25 Se ha demostrado que la galectina 9 es capaz de inducir la diferenciación de los T CD4 indiferenciados en Treg (Seki et al, Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis; Clin Immunol. Abril de 2008; 127 (1): 78-88. Doi: 10.1016/j.clim.2008.01.006. Publicación electrónica 20 de febrero de 2008), lo que refuerza la importancia de esta lectina en los fenómenos de agotamiento de la respuesta inmune antitumoral.

30 Los resultados presentados en la figura 25 indican claramente que los T CD4+ conv acondicionados con cada isoforma de la galectina 9 adquieren un fenotipo supresor e inhiben la proliferación de las PBMC. Esta inhibición es más fuerte con la forma S (corta) de la galectina 9 que con la forma M (media). También se ha constatado que la adición de 1G3 durante el acondicionamiento inhibe el establecimiento de este fenotipo supresor y restaura significativamente la proliferación neutralizando la galectina 9.

35 Por otro lado, como se muestra en la figura 24, los análisis FACS de las células al final del ensayo indican que cada isoforma de la galectina 9 genera un aumento en la expresión de CD25. Ahora bien, como se muestra en la figura 24, las células activadas sobreexpresan en tiempo normal CD25.

40 Los resultados indican claramente que la adición a los Tconv de galectina 9 (i) genera un ligero aumento en la expresión de CD4 con la forma S o la forma M de la galectina 9, en comparación con los Tconv activados; (ii) no tiene ningún efecto sobre la expresión de CD127 durante la fase de acondicionamiento con la forma M o S de la galectina 9; (iii) conlleva un aumento significativo en la expresión de CD25 con la forma M y la forma S de galectina 9 con respecto a los Tconv activados.

45 Por lo tanto, la figura 24 indica que la preincubación de los Tconv con la forma M o S de la galectina 9 aumenta la expresión de los marcadores CD4 y CD25 en favor de un fenotipo posiblemente más supresor. A pesar de ello, esta hipótesis sólo es admisible si se correlaciona con una actividad supresora de estos Tconv acondicionados, lo que permite validar el fenotipo supresor, el cual es el caso (ver la figura 25).

50 Para concluir, se demuestra que la galectina 9 induce una conversión de linfocitos T CD4+ convencionales en T CD4+ inmunosupresores. El anticuerpo 1G3 es capaz de neutralizar la inducción de esta conversión y, por tanto, de promover el mantenimiento de una respuesta inmunitaria antitumoral en el paciente tratado según la invención.

55 **Análisis del efecto neutralizante de 2E12 sobre la actividad supresora de los Treg**

El potencial de inhibición de la función supresora de los linfocitos T reguladores por el anticuerpo 2E12 se analizó mediante ensayos de proliferación de una reacción leucocitaria mixta de linfocitos T reguladores con PBMC autólogas (2 donantes independientes).

60 Los resultados, visibles en la figura 26, demuestran que un precultivo de 2 horas de los linfocitos T reguladores con 2E12 fue suficiente para revertir el efecto inhibitorio de la proliferación de células por los linfocitos T reguladores. El uso del isotipo de control del 2E12, que no tiene ningún efecto sobre los T reguladores, permite nuevamente concluir que esta reversión de la inhibición inducida de los linfocitos T reguladores es específica y pasa por la galectina 9.

65 Por otro lado, se observa que el anticuerpo 2E12, al igual que 1G3, es capaz de revertir esta inhibición. No obstante,

la eficacia de 2E12 es significativamente menor que la de 1G3, ya que se observa una ligera disminución en la proliferación de PBMC, a diferencia de 1G3.

REFERENCIAS

- 5 (1) Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death". *Immunity*. Octubre de 2004; 21(4): 589-601.
- (2) Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells". *Blood*. 1 de marzo de 2007; 109(5): 2058-65
- 10 (3) Johnson BD, Jing W, Orentas RJ. "CD25+ regulatory T cell inhibition enhances vaccine-induced immunity to neuroblastoma". *J Immunother*. Febrero-marzo de 2007; 30(2): 203-14.
- (4) McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor". *Immunity*. Febrero de 2002; 16(2): 311-23.
- 15 (5) Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function". *Science*. 10 de octubre de 2008; 322(5899): 271-5. (5) Zahran AM et al, *Int J Clin Oncol*. 26 de septiembre de 2013.
- (6) Fisson S1, Darrasse-Jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*. 1 de septiembre de 2003; 198(5): 737-46. Publicación electrónica, 25 de agosto de 2003.
- 20 (7) Xu W et al, *J Cancer Res Clin Oncol*. Noviembre de 2013; 139(11): 1845-52
- (8) Ladanyi A, Magy Onkol. Junio de 2013; 57(2): 85-95
- (9) Zhang W et al, *Gynecol Oncol*. 2 de enero de 2014. pii: S0090-8258(13)01427-3.
- (10) Faghih Z et al, *Immunol Lett*. 8 de diciembre de 2013; 158(1-2): 57-65.
- 25 (11) Aida K et al, *Cancer Sci*. 30 de noviembre de 2013
- (12) Huang XM et al, *Cancer Sci*. Noviembre de 2013
- (13) Preston CC et al, *PLoS One*. 14 de noviembre de 2013; 8(11): e80063
- (14) He M et al, *Neuro Oncol*. Junio de 2013; 15(6): 727-34
- (15) Muthu Raja KR et al, *PLoS One*. 2012; 7(10): e47077
- 30 (16) Davidson S et al, *Mod Pathol*. Marzo de 2013; 26(3): 448-55
- (17) Huang Yet al, *Digestion*. 2012; 86(4): 329-37
- (18) Memarian A, *Tumour Biol*. Febrero de 2013; 34(1): 531-42
- (19) Delhem et al, *Expert Opin Biol Ther*. 2010; 10(11): 1563-1572
- (20) Ouaguia *et al*. *ISRN Hepatology*. Volume 2013 (2013), Artículo ID 928485
- 35 (21) Carpentier et al, *Am J Transplant*. 2009; 9(9): 2102-2112.
- (22) Moralès et al, *BRMI*, Volume 2014 (2014), Artículo ID 290878
- (23) Baumforth et al, *Am J Pathol*. Julio de 2008; 173(1): 195-204
- (24) Moralès et al, *PlosOne*, En prensa 2014
- (25) Krausz LT et al, *Ideggyogy Sz*. 30 de septiembre de 2013; 66(9-10): 343-8.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Université sciences et Technologie de Lille Université Droit et Santé de Lille Centre National de la Recherche Scientifique Institut Gustave Roussy Société Cellvax Pharma
- <120> Anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores
- <130> BCT150175QT
- 50 <150> FR 1455177
- <151> 06-06-2014
- <160> 17
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 148
- <212> PRT
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> fragmento de anticuerpo
- 65 <400> 1

ES 2 822 426 T3

Met Lys Cys Ser Trp Gly Ile Phe Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Lys Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser His Ser Ile Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Gln Phe Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Thr Arg His Gly Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

130

135

140

Val Tyr Pro Leu
 145

5 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fragmento de anticuerpo
 <400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Ile His
 1 5 10

15 <210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fragmento de anticuerpo

ES 2 822 426 T3

<400> 3

Trp Phe Tyr Pro Gly Ser His Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Gln Phe Lys
1 5 10 15

Asp Arg

5 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> fragmento de anticuerpo

<400> 4

His Gly Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 5
<211> 153
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento de anticuerpo

25 <400> 5

ES 2 822 426 T3

Leu Asp Gly Gly Lys Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser
 20 25 30

Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Ile Thr Met Ser Cys
 35 40 45

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu
 100 105 110

Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Tyr Phe Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 130 135 140

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 145 150

5 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fragmento de anticuerpo
 <400> 6

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fragmento de anticuerpo

ES 2 822 426 T3

<400> 7

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> anticuerpo

<400> 8

15

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> fragmento de galectina 9

25

<400> 9

Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala
1 5 10

30

<210> 10
<211> 175
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> VH 2E12

<400> 10

Met Gly Trp Ser Phe Ile Ile Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly Val His
1 5 10 15

Ser Lys Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
20 25 30

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu
35 40 45

Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp
50 55 60

40

ES 2 822 426 T3

Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Met Glu Tyr Asn Glu Lys
65 70 75 80

Phe Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Asn Ser Ser Ser Thr Val Tyr
85 90 95

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Glu Arg His Gly Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
130 135 140

Leu Ile Phe Leu Glu Asp Leu Leu Gln Tyr Ser Gln Leu Pro Trp Lys
145 150 155 160

Ile Asp Val Leu Leu Leu Phe Ser Gln Asp Phe Gln Ala Val Tyr
165 170 175

5 <210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> H-CDR1 2E12
<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His
1 5 10

15 <210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> H-CDR2 2E12
<400> 12

25 Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Met Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Asp
1 5 10 15

30 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H-CDR3 2E12

ES 2 822 426 T3

<400> 13

His Gly Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr
 1 5

5 <210> 14
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VL 2E12

<400> 14

Leu Asp Gly Gly Lys Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser
 20 25 30

Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
 35 40 45

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

Trp Ala Ser Thr Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu
 100 105 110

Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 130 135 140

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 145 150

15 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> L-CDR1 2E12

ES 2 822 426 T3

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> LCDR2 2E12

15

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg Gly Ser
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> L-CDR3 2E12

25

<400> 17

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, que se une específicamente a un epítipo de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.
- 10 3. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, que se une al epítipo reconocido por el anticuerpo que tiene como CDR las seis CDR definidas por:
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3,
 - 15 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3,
- teniendo la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y teniendo la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.
- 20 4. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que tiene como CDR las seis CDR definidas por:
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1,
 - 25 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3.
- 30 5. Anticuerpo para su uso según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y **por que** la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.
- 35 6. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, que se une al epítipo reconocido por el anticuerpo que tiene como CDR las seis CDR definidas por:
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región H-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 en la región H-CDR2,
 - 40 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en la región H-CDR3,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 en la región L-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 en la región L-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 en la región L-CDR3,
- teniendo la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 y teniendo la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14.
- 45 7. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, que tiene como CDR las seis CDR definidas por:
- la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región H-CDR1,
 - 50 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 en la región H-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en la región H-CDR3,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 en la región L-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 en la región L-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 en la región L-CDR3.
- 55 8. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 o 7, **caracterizado por que** la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 y **por que** la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14.
- 60 9. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** el cáncer se elige del grupo formado por leucemias mieloides crónicas, cáncer de colon, melanoma, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cánceres gástricos, cáncer de ovario, linfoma primario del sistema nervioso central, mielomas múltiples, cáncer de próstata, linfoma de Hodgkin y carcinoma hepatocelular.
- 65 10. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** el cáncer es un cáncer inducido por virus, preferentemente elegido del grupo que consiste en carcinomas de nasofaringe asociados

al virus de Epstein-Barr, carcinomas hepatocelulares vinculados al virus de la hepatitis C o al virus de la hepatitis B.

11. Composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo dirigido contra la galectina 9 e inhibidor de la actividad supresora de los linfocitos T reguladores, que tiene como CDR:

- 5
- las seis CDR definidas por:
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2,
 - 10 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2, y
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3, o
- 15
- las seis CDR definidas por:
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 en la región H-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 en la región H-CDR2,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en la región H-CDR3,
 - 20 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 en la región L-CDR1,
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 en la región L-CDR2, y
 - la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 en la región L-CDR3, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

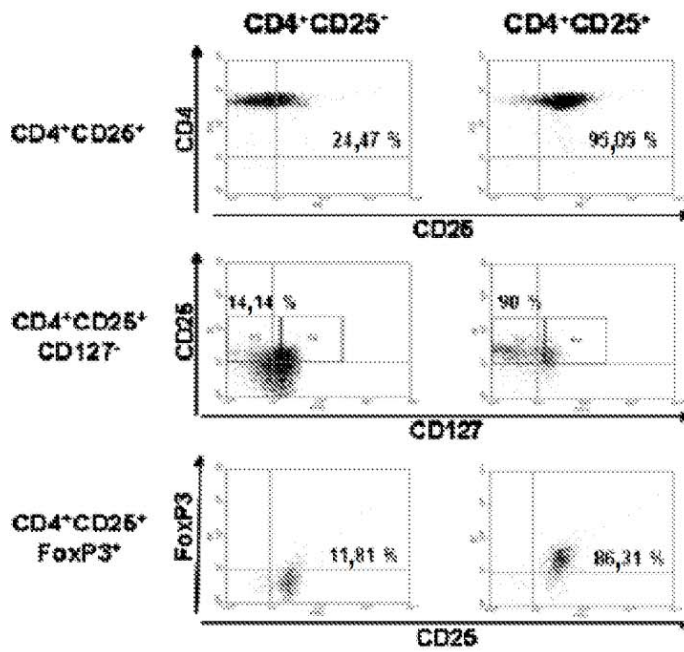


Fig. 1

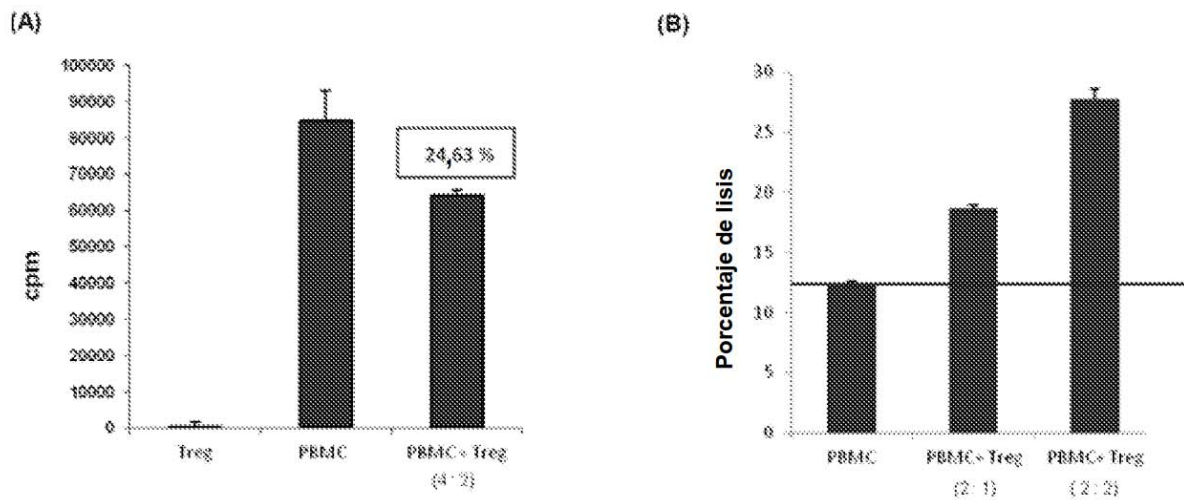


Fig. 2

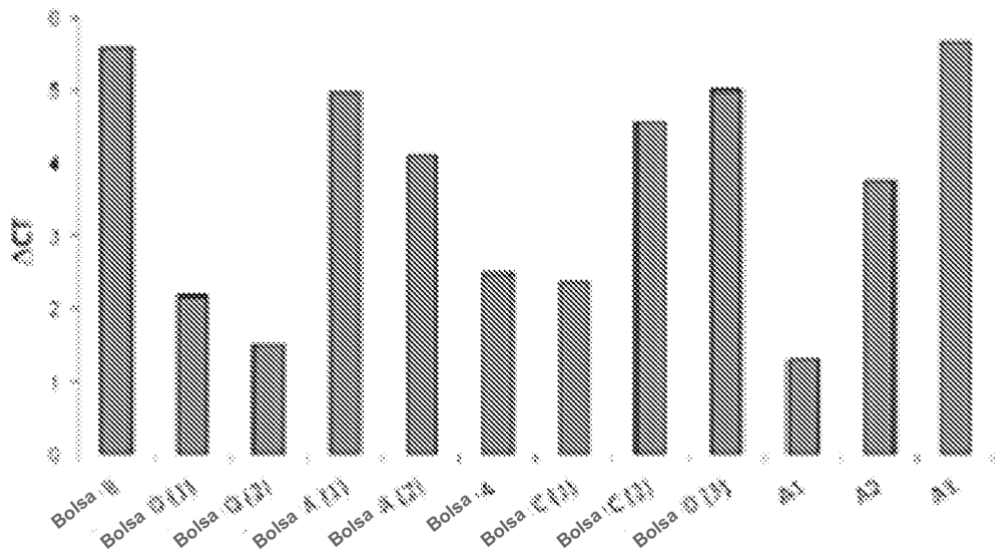


Fig. 3

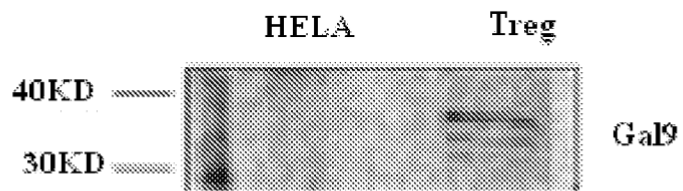


Fig. 4

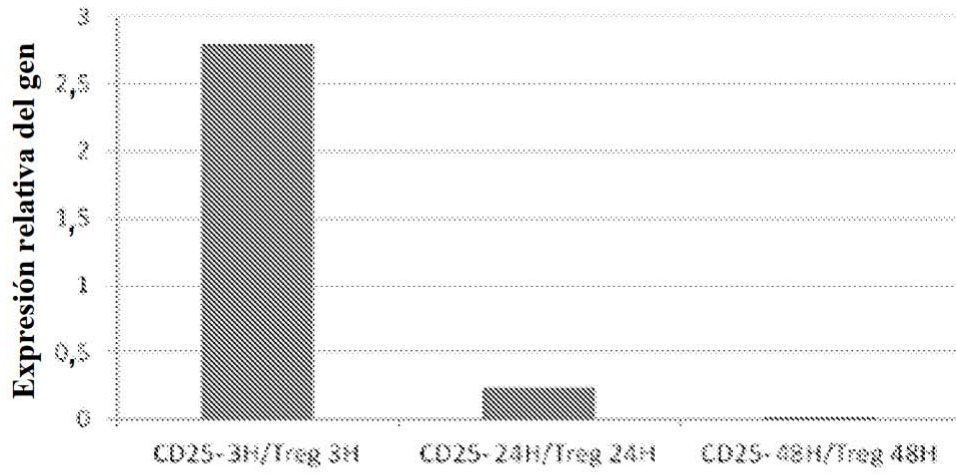


Fig. 5

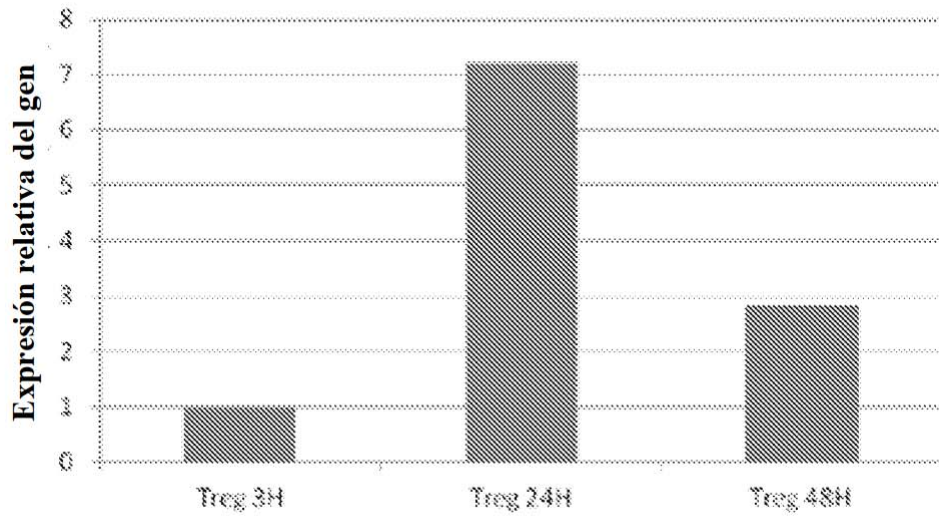


Fig. 6

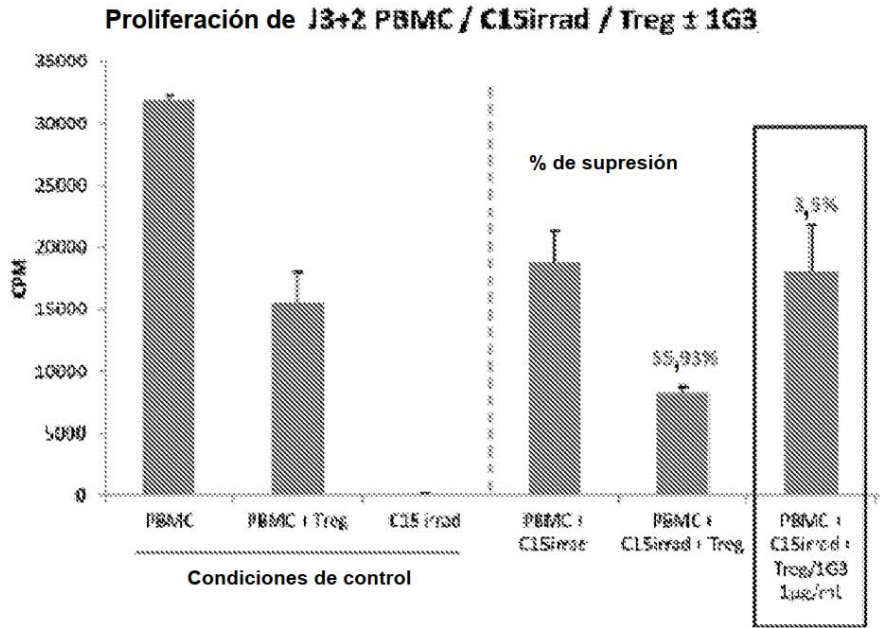


Fig. 7

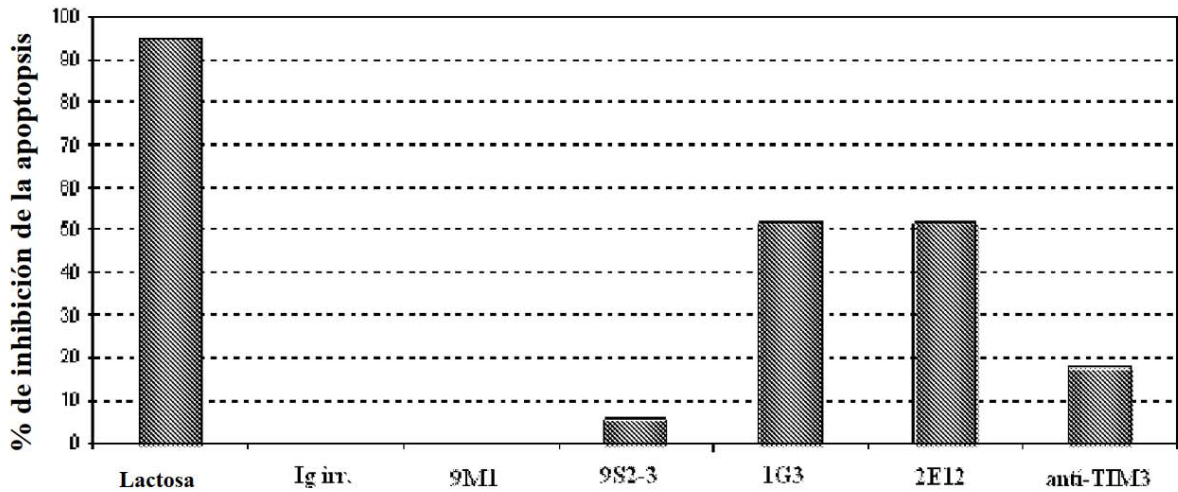


Fig. 8

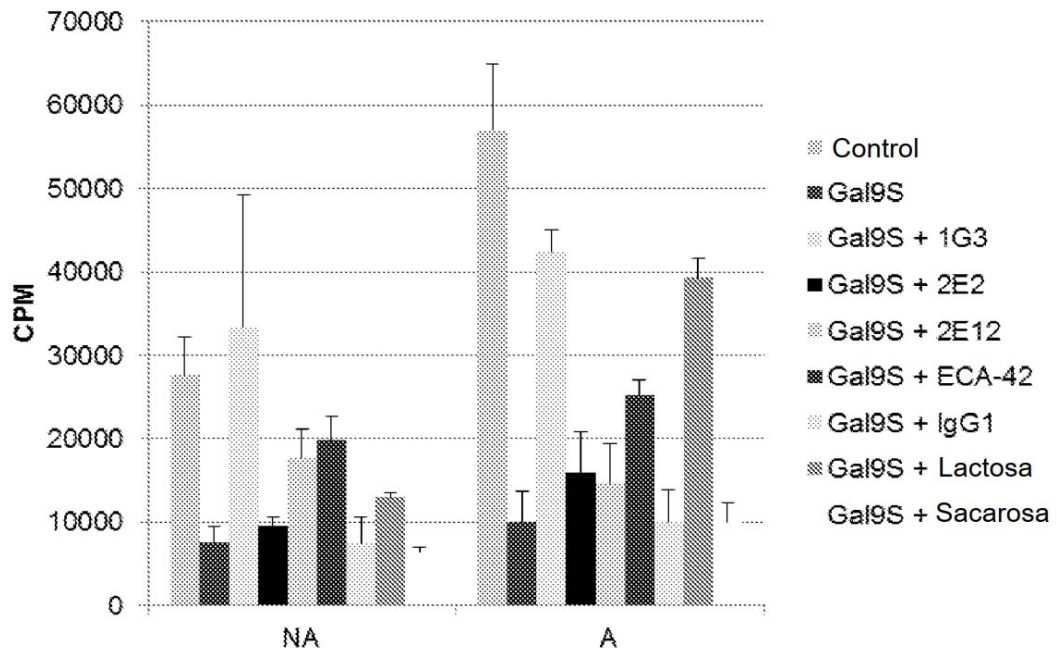


Fig. 9

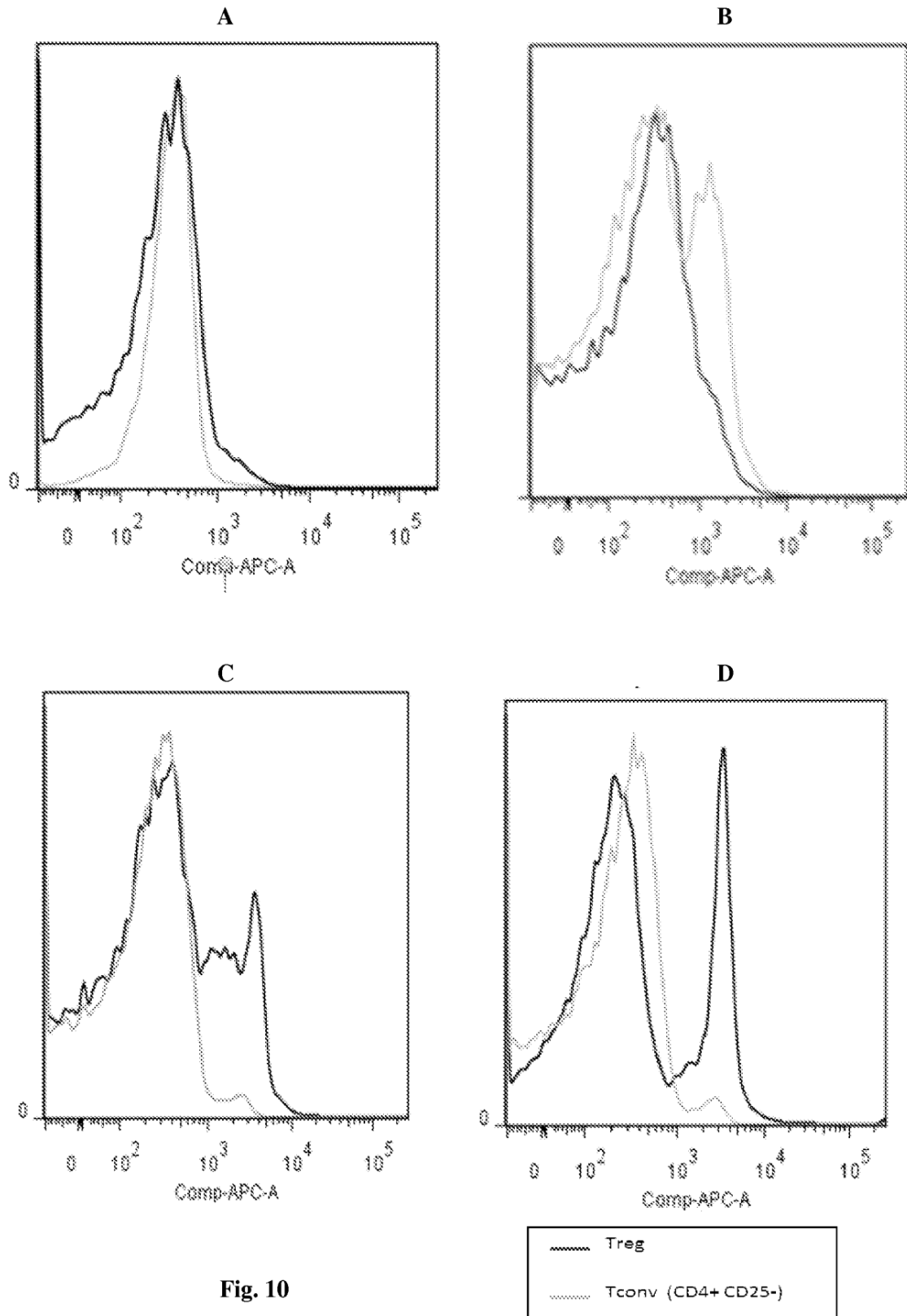
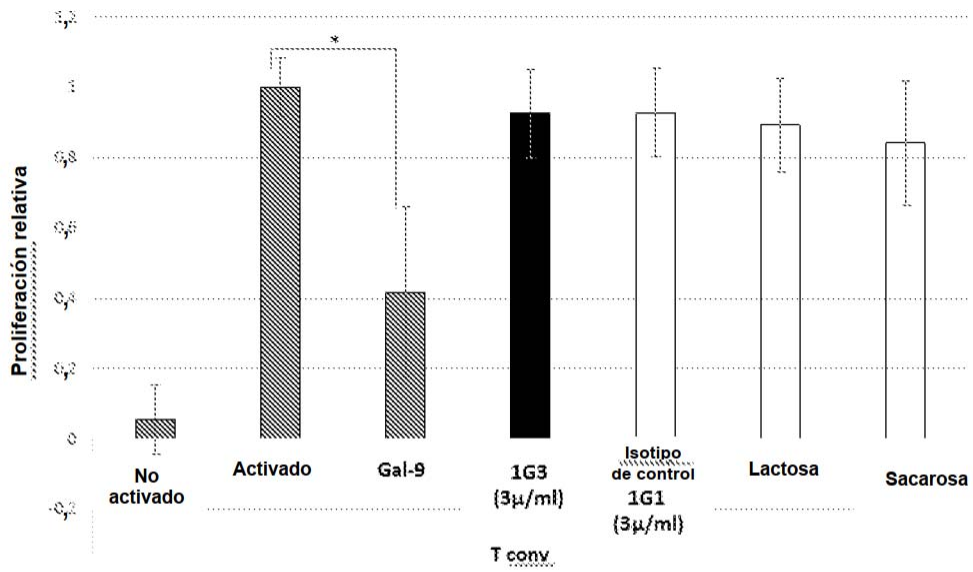
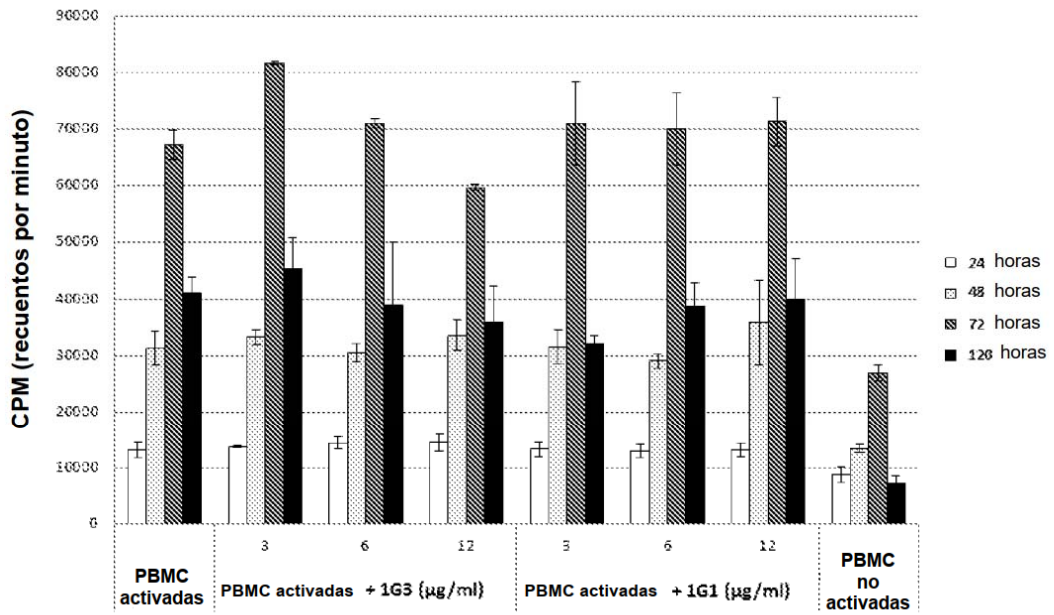


Fig. 10



Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

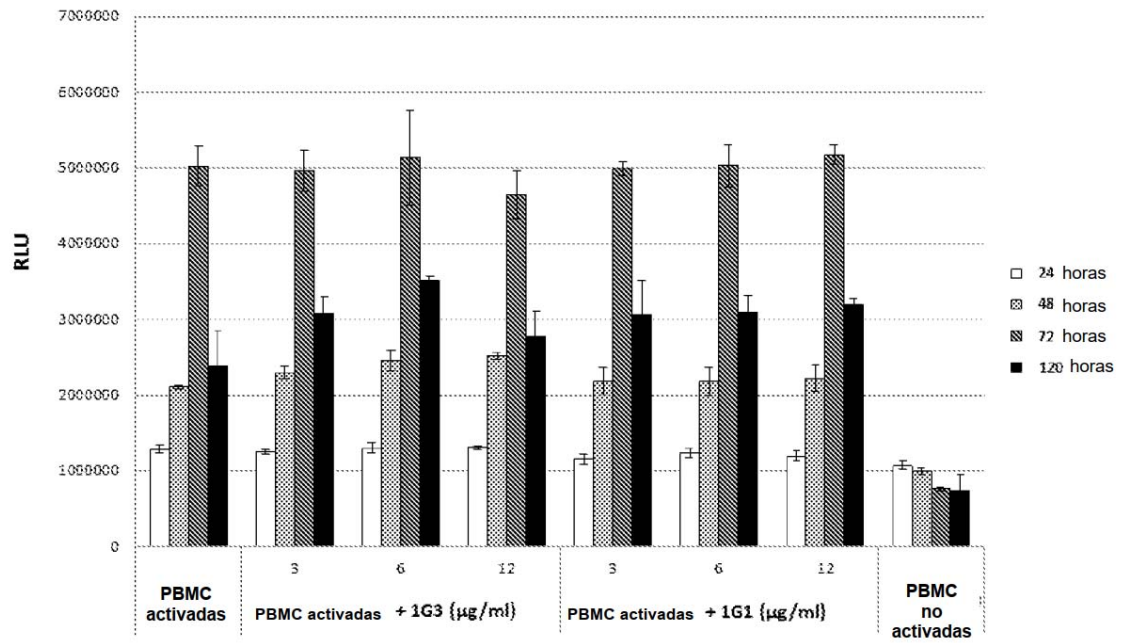
Fig. 11



Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney

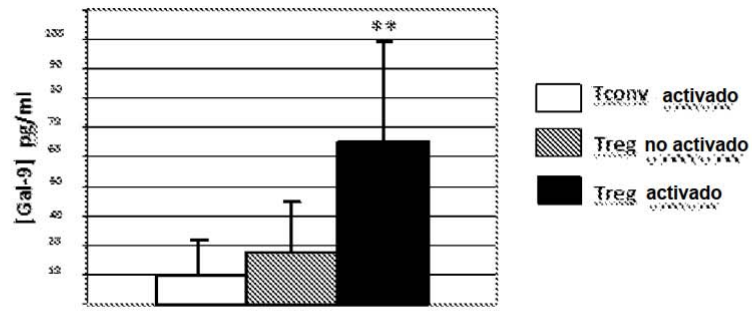
* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$

Fig.12



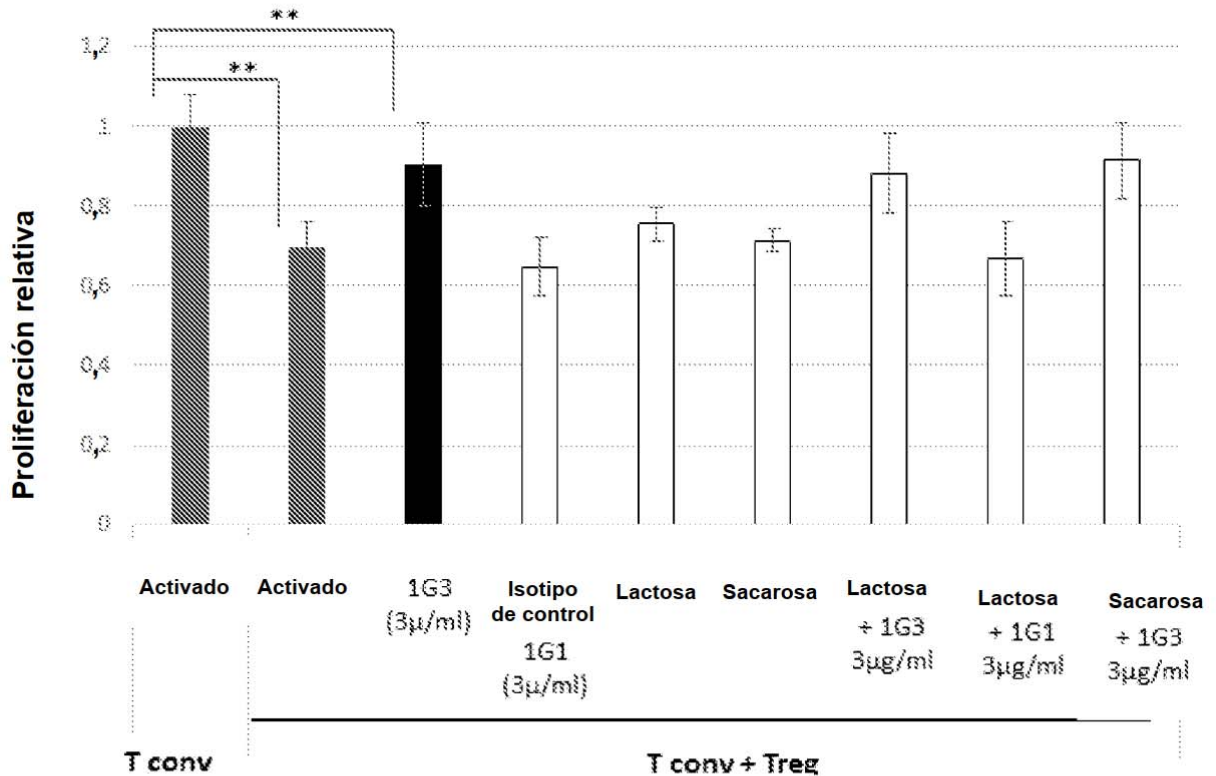
Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Fig. 13



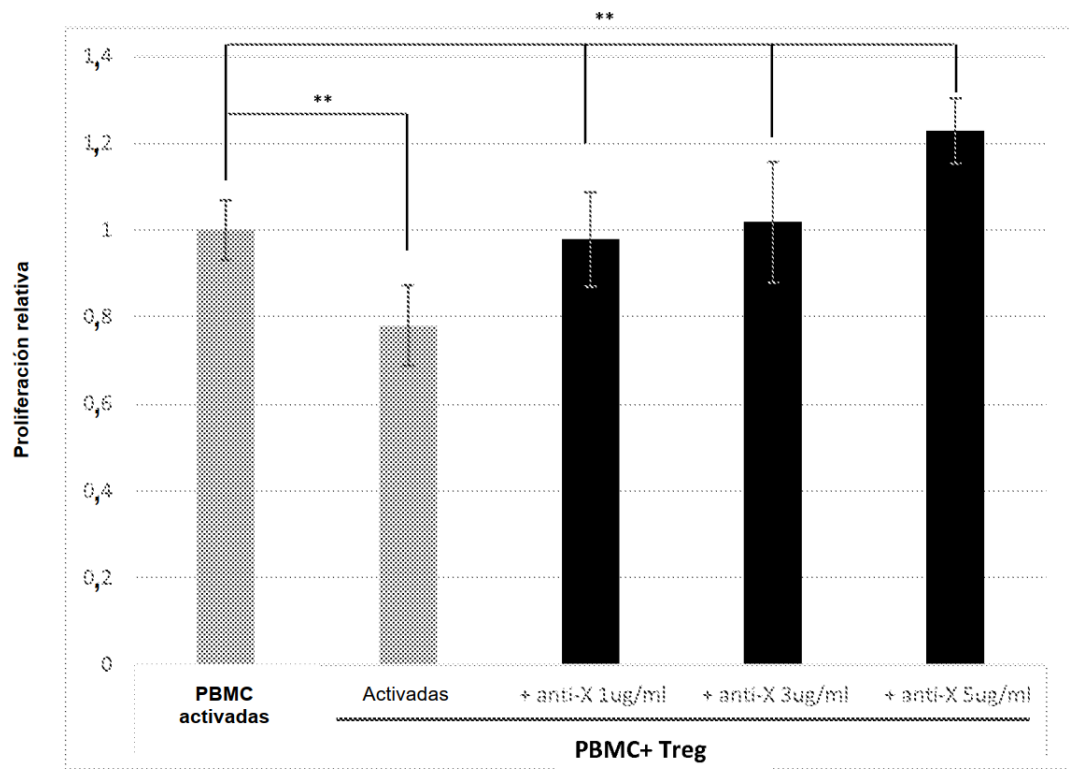
Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Fig. 14



Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

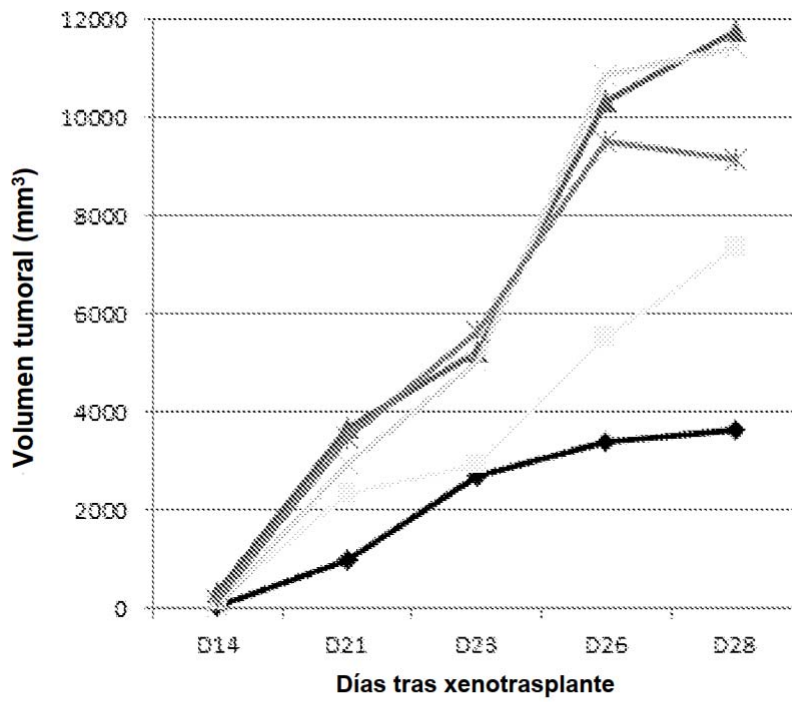
Fig. 15



Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$

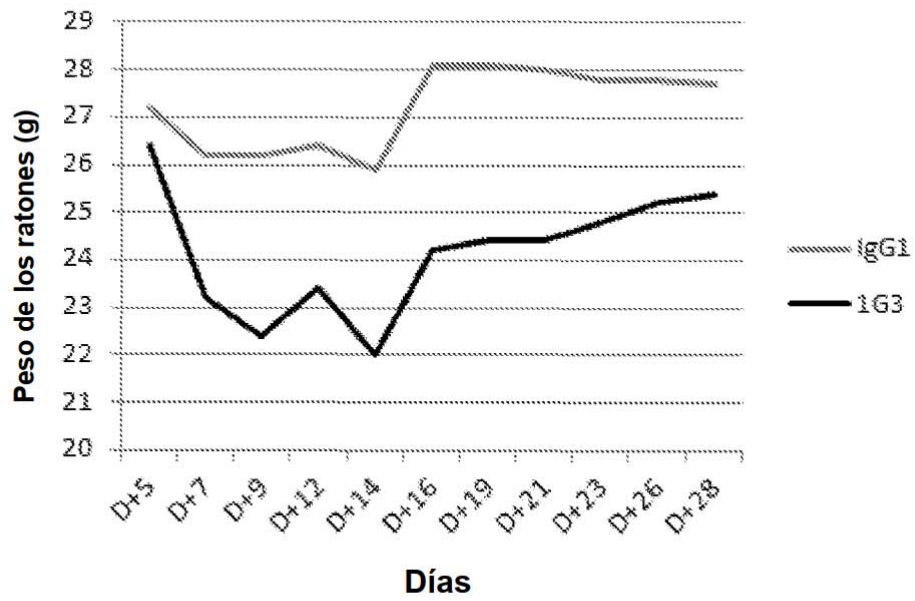
Fig. 16



Grupo 1: PBMC, Control
Grupo 2: PBMC + Treg + Gal-Nab1 / CPG-ODN
Grupo 3: PBMC + Treg + IgG1 / CPG-ODN
Grupo 4: Sin PBMC + Gal-Nab1 / CPG-ODN

Fig. 17

A



B

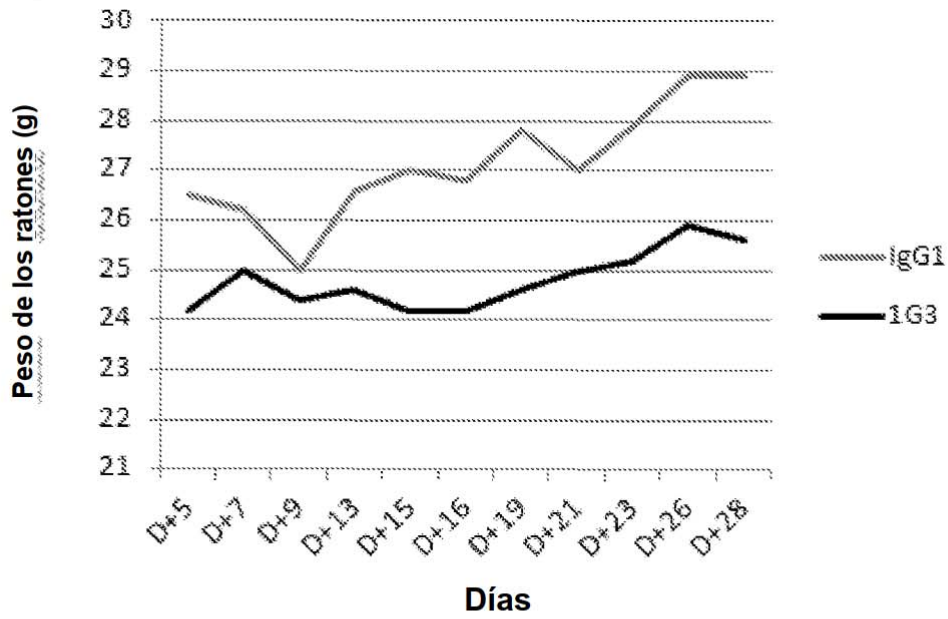


Fig. 18

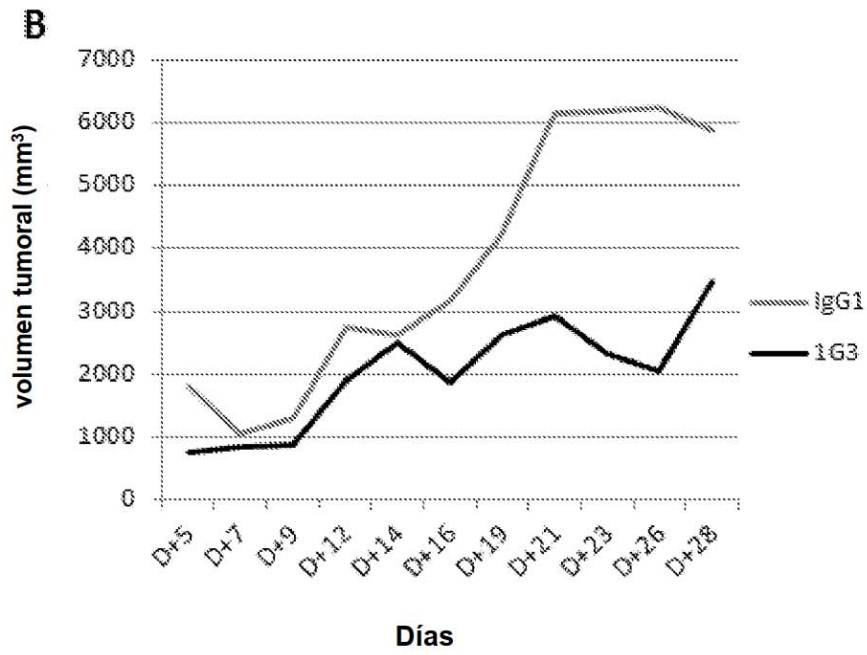
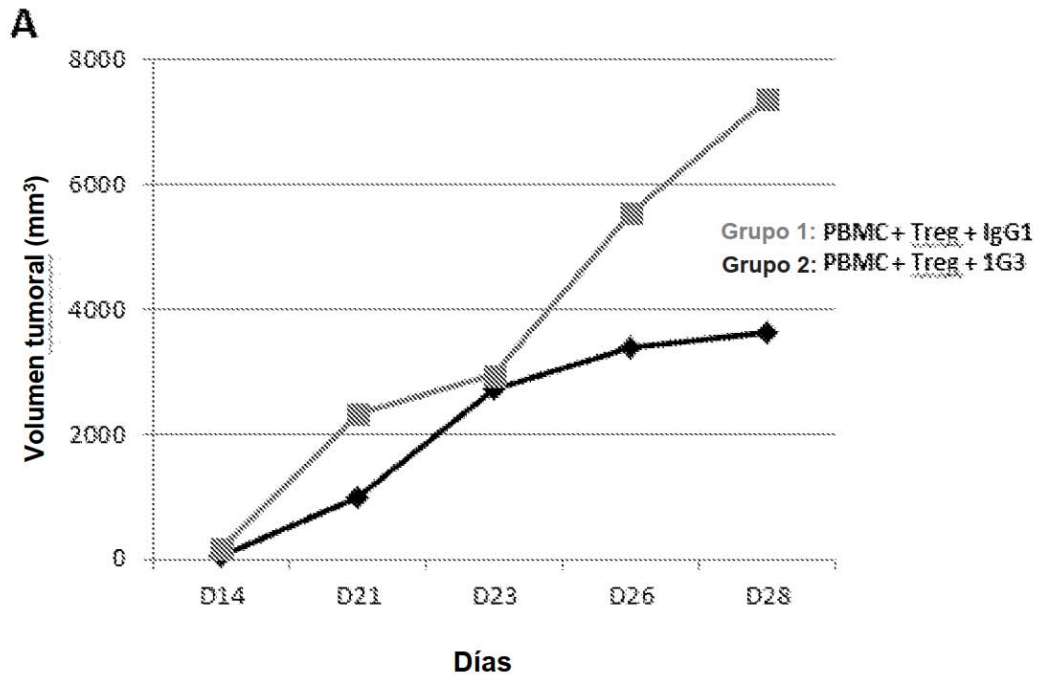


Fig. 19

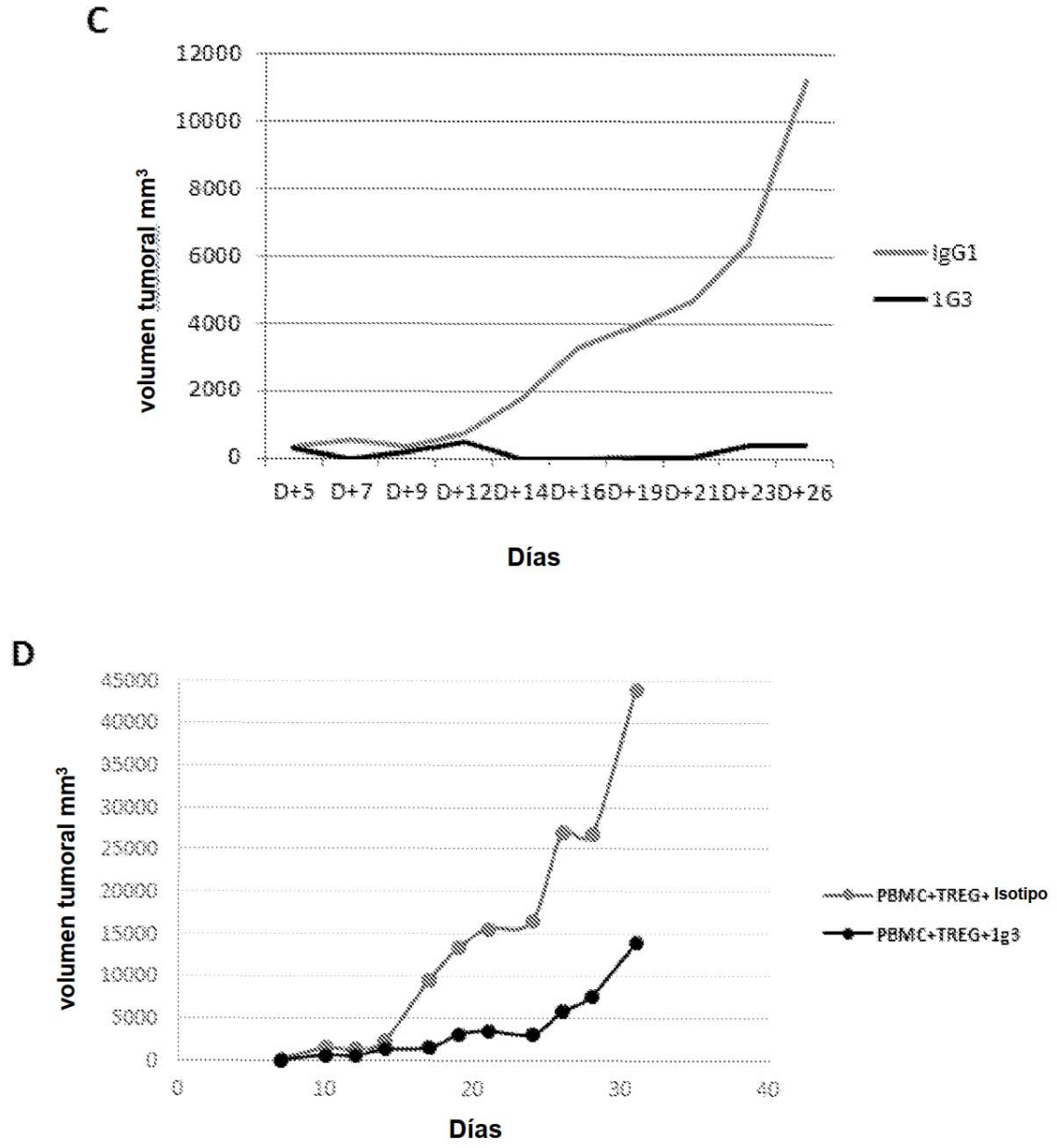
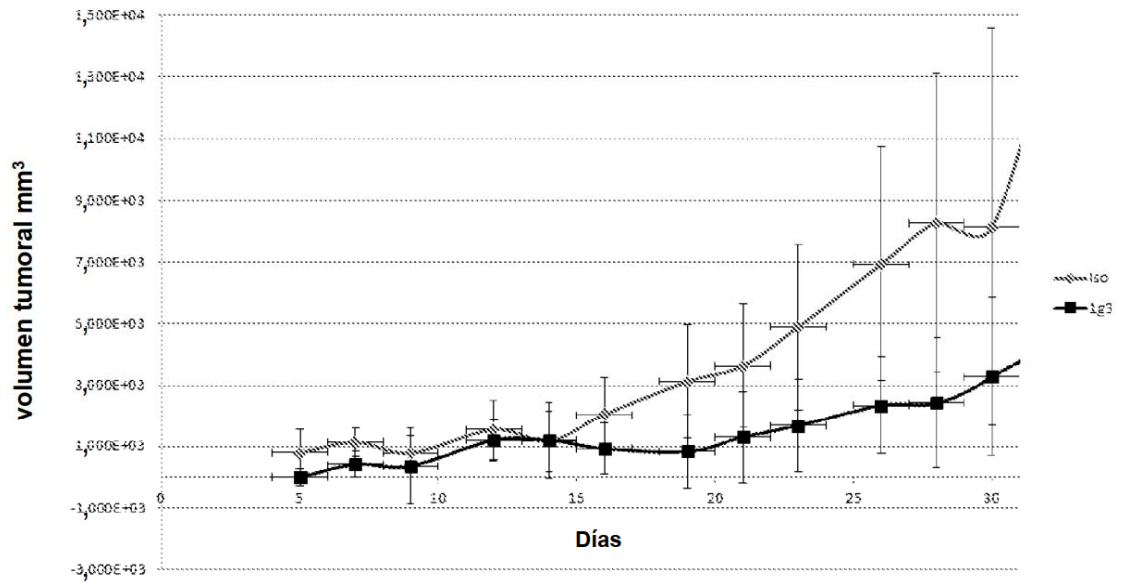


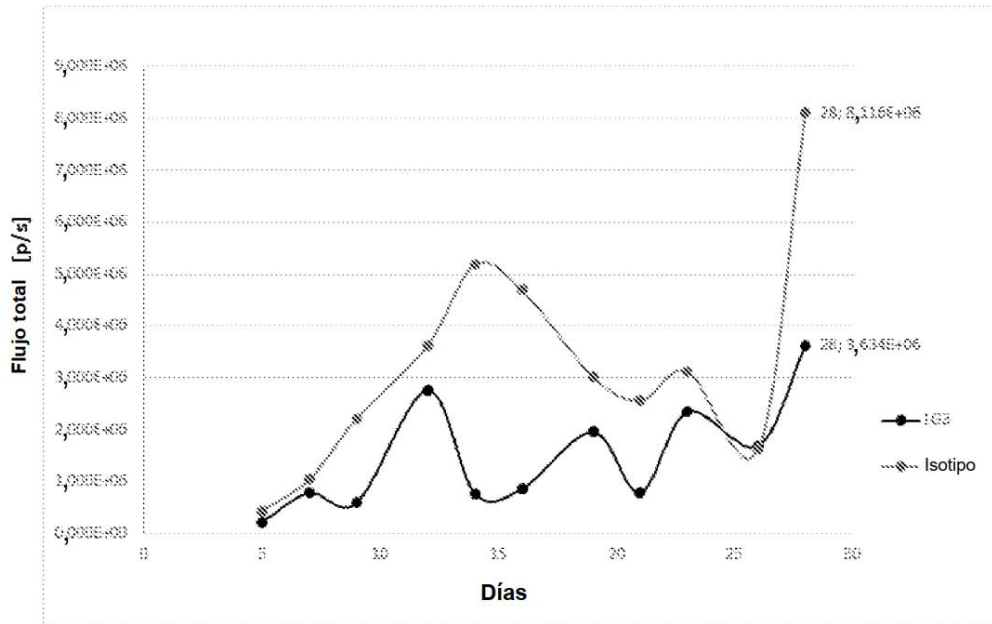
Fig. 19



Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney
 * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$

Fig. 20

A



B

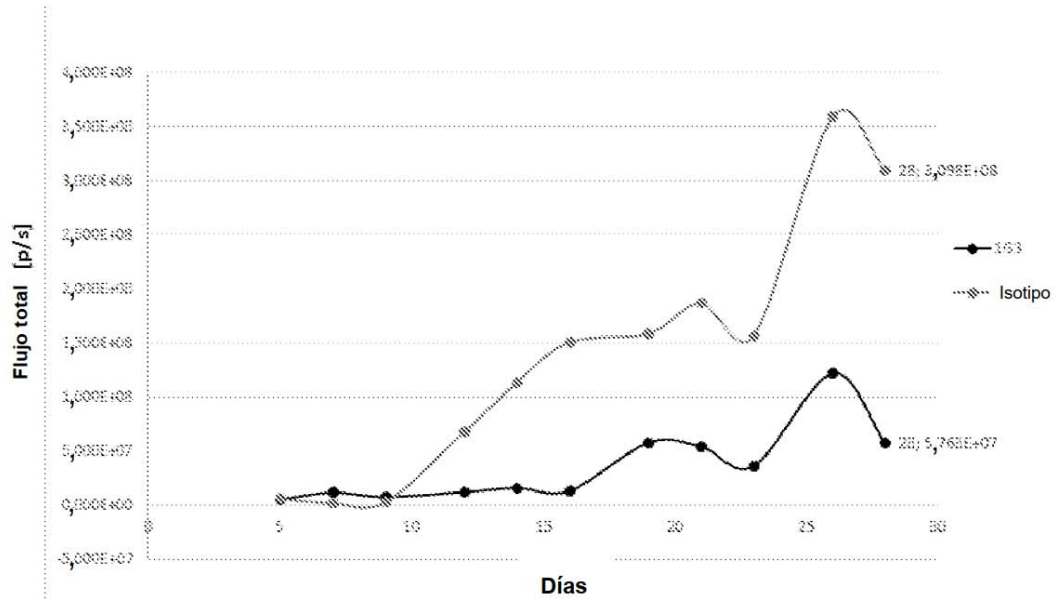
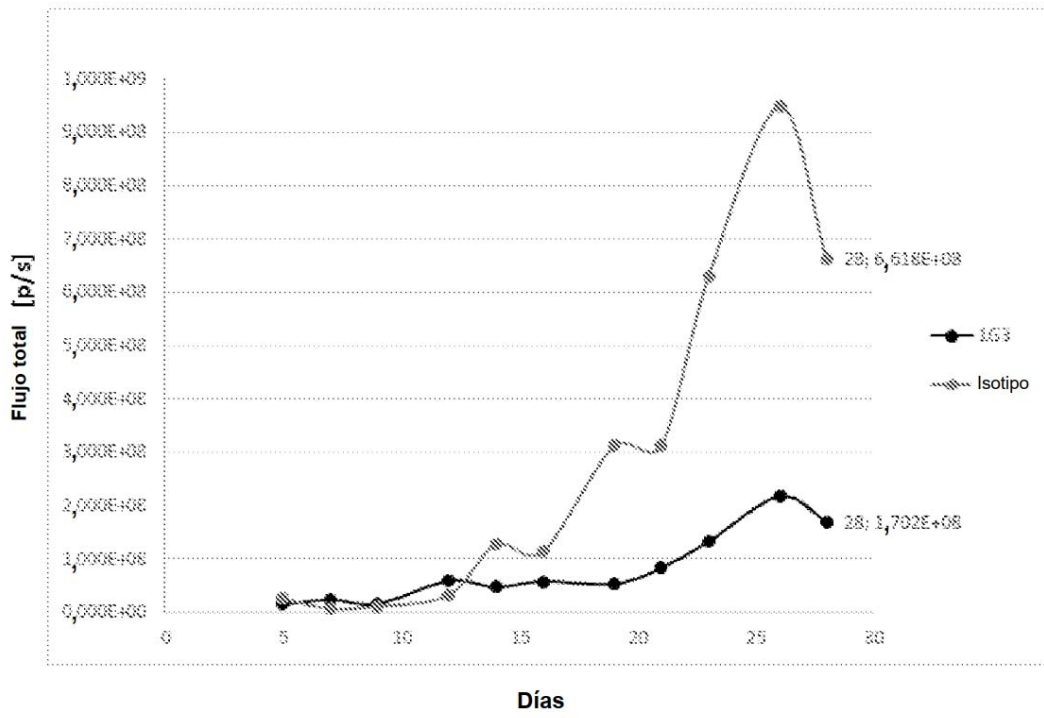


Fig. 21

C



D

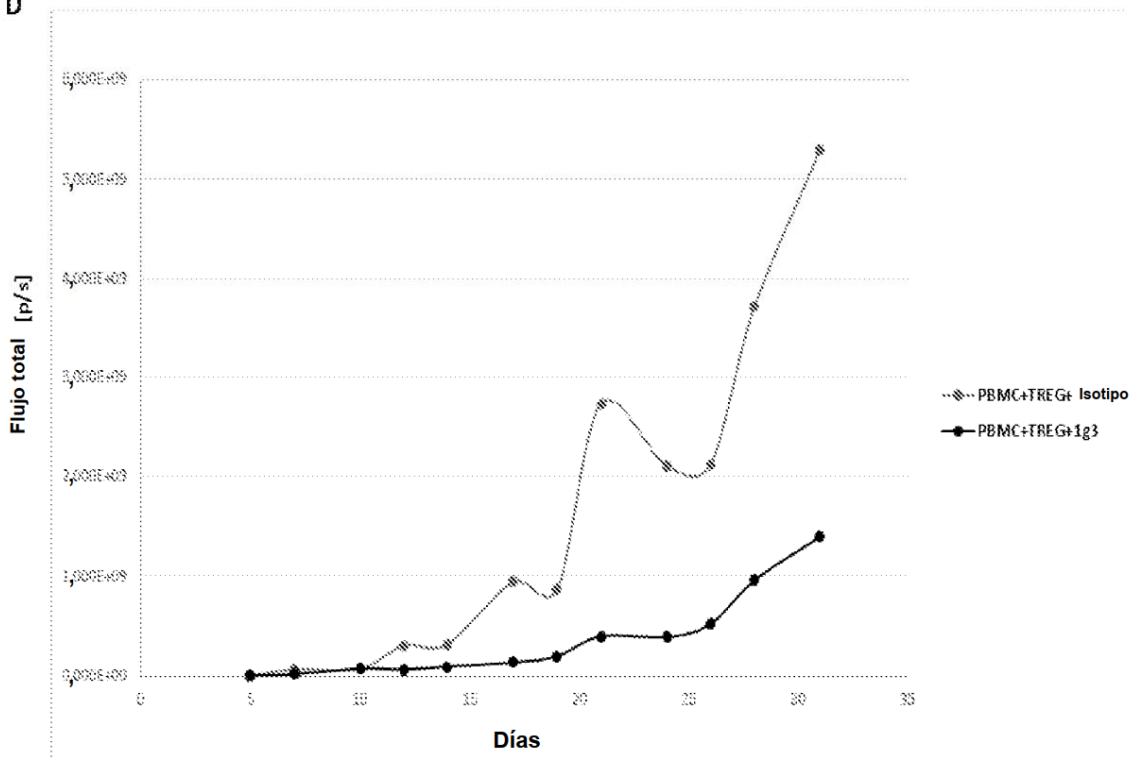
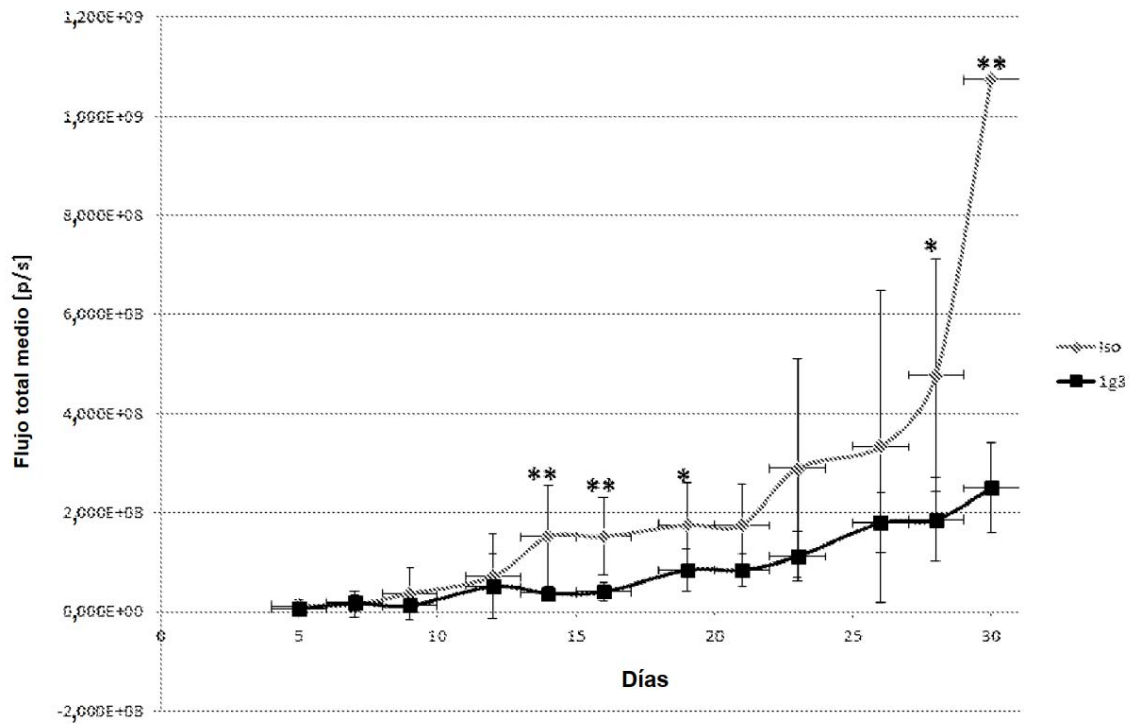


Fig. 21



Prueba estadística de suma de rangos de Mann Whitney
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Fig. 22

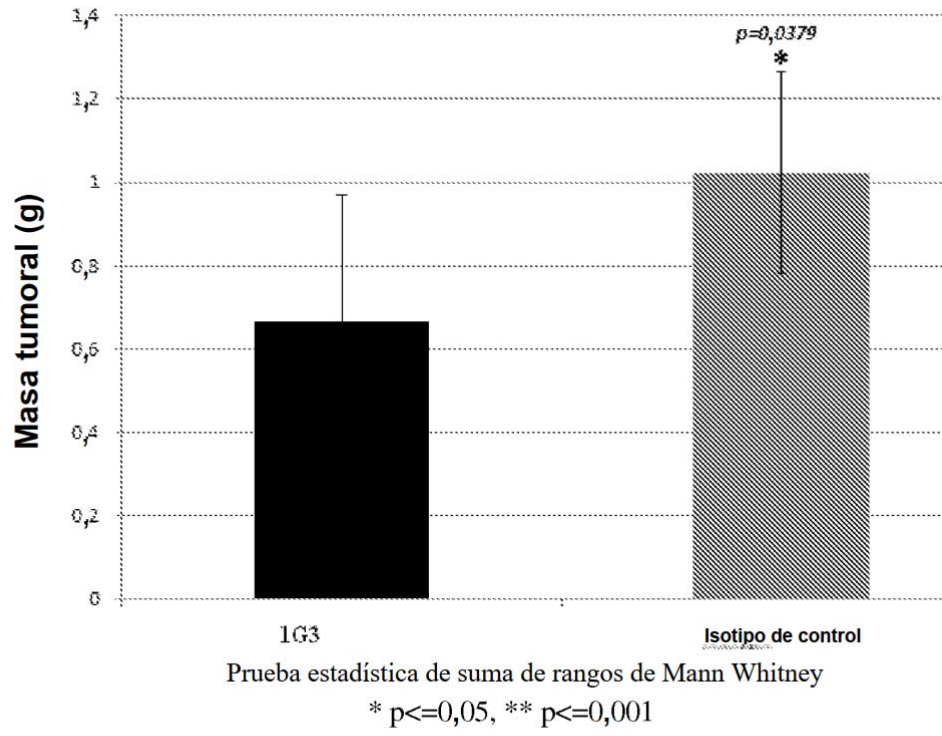


Fig. 23

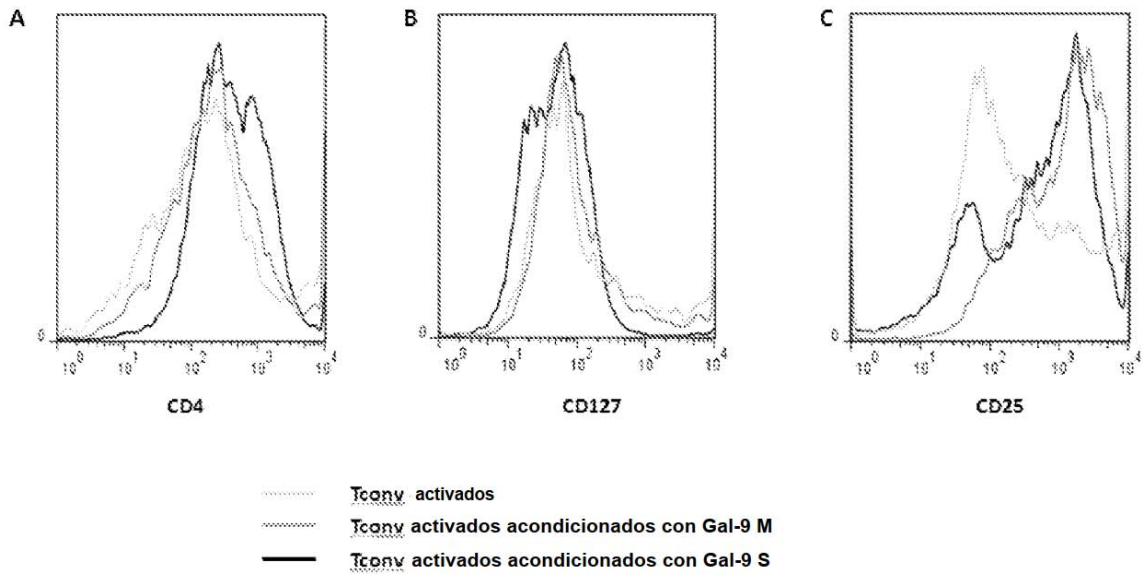


Fig. 24

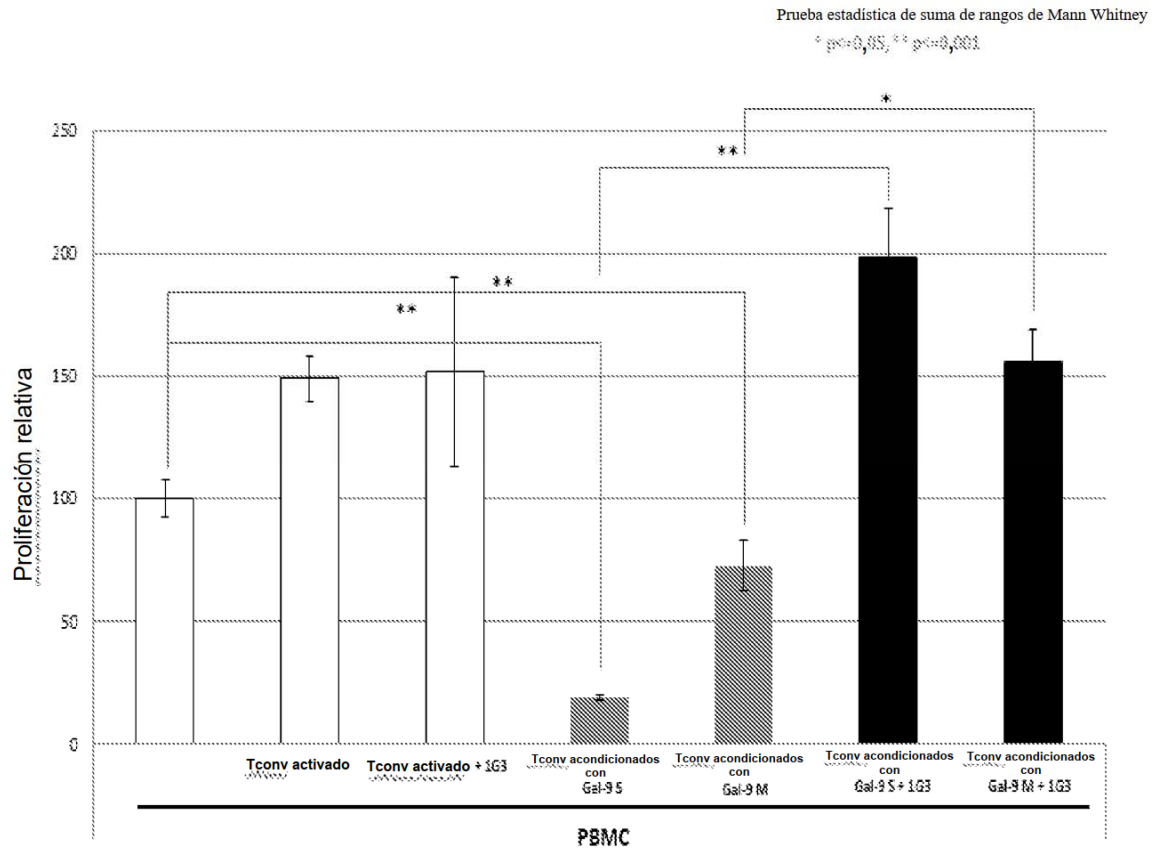


Fig. 25

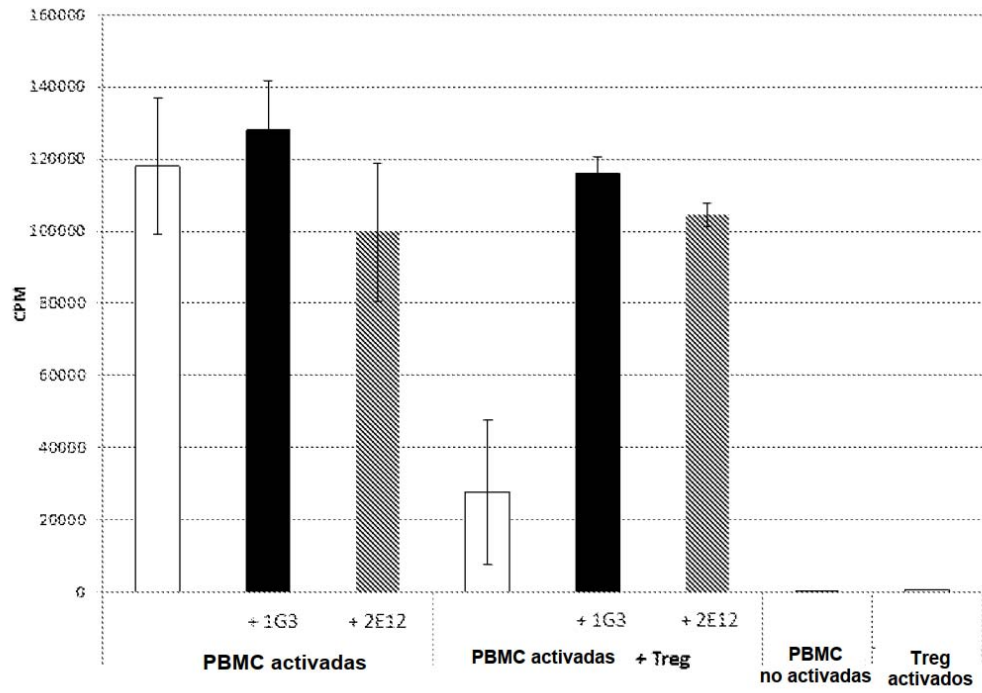


Fig. 26