



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 782**

51 Int. Cl.:
G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03730020 .9**

96 Fecha de presentación : **13.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1504261**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Subpoblación de células T que regula la inmunidad del intestino.**

30 Prioridad: **14.05.2002 US 143822**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR
Institut Curie**

72 Inventor/es: **Lantz, Olivier y
Treiner, Emmanuel**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Subpoblación de células T que regula la inmunidad del intestino.

5 La invención se refiere a procedimientos para modular una respuesta inmune en un mamífero, modulando la actividad *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de las células T que transportan la cadena Va7.2/19-Ja33 TCR α . La invención se refiere asimismo a procedimientos para regular la actividad de las células inmunes, particularmente de los linfocitos T y/o de los linfocitos B, regulando la actividad de MR1 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende células T que transportan la cadena Va7.2/19-Ja33 TCR α o un compuesto
10 que modula la actividad de las células T que transportan la cadena Va7.2/19-Ja33 TCR α y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable. La invención comprende además procedimientos de cribado de compuestos activos utilizando MR1 o sus fragmentos, o el ácido nucleico que codifica dichos compuestos, o células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido. La invención se refiere además a procedimientos de diagnóstico de enfermedades intestinales relacionadas con un defecto en la actividad de dichas células T que transportan la cadena Va7.2/19-Ja33
15 TCR α .

Las mucosas constituyen el área de contacto más extensa entre el organismo y el entorno. Uno de los procedimientos principales de defensa contra patógenos del intestino es la secreción de grandes cantidades de IgA en los fluidos intestinales. Existen muchas células secretoras de IgA (ISA) en ambas placas de Peyer (PP) y en la Lámina Propia
20 intestinal (LP), que dependen de la presencia de flora microbiana (no se encuentran en ratones libres de gérmenes) y dependen de T en una amplia proporción. Las células T asociadas al intestino comprenden los linfocitos intraepiteliales (IEL) y los linfocitos PP y LP. IEL expresan ambos TCR, el $\alpha\beta$ y el $\gamma\delta$ (receptores de células T) y entre los últimos la mayoría son CD8 $\alpha\beta$, mientras que los primeros son en su mayoría CD8 $\alpha\alpha$ o DN (negativos dobles). Los linfocitos LP expresan en su mayor parte $\alpha\beta$ TCR, muestran un fenotipo CD44⁺ de memoria, considerándose habitualmente que derivan de células T que no han sido previamente expuestas y que han sido cebadas en el interior (del grupo) PP por antígenos intestinales y que vuelven a circular antes de localizarse en los LP. El análisis del repertorio de los linfocitos intestinales se ha centrado en su mayor parte en las cadenas TCR β que han mostrado expansiones oligoclonales que no fueron recurrentes de un ratón a otro, indicando probablemente que eran gobernadas por los
25 antígenos.

Los linfocitos B y T muestran un amplio repertorio de receptores antigénicos, obtenidos mediante recombinación al azar de los segmentos V, (D) y J y el adorno/adición de nucleótidos en las uniones entre estos segmentos reorganizados. Se han descrito dos subconjuntos de linfocitos T que muestran un repertorio con diversidad limitada que se conservan entre las especies: las células NK-T que utilizan en su mayor parte Va14-Ja18 (pero también Va3.2-Ja9 y Va8) en
35 ratones y los segmentos homólogos Va24-Ja18 en el hombre (Bendelac A *et al.* 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 535-62) y el subconjunto que se denominará en adelante células mucosas T Invariantes Asociadas (células MAIT) por las razones expuestas, que utiliza Va7.2-Ja33 en el hombre y los segmentos homólogos Va19-Ja33 en ratones y en el ganado (Tiloy *et al.*, J. Exp. Med., 1999, 190:7-1921). Aún cuando la función (o funciones) de las células NK T no se aprecien todavía completamente, se ha acumulado una gran riqueza de datos que las implican en la regulación de tipo inmune, en la autoinmunidad y en la inmunidad antitumoral. Mucho menos se conoce sobre las células MAIT, aunque la estricta conservación de la especificidad entre especies, sugiere una función importante.

Ambas poblaciones comparten características comunes, pero también parecen ser complementarias con respecto a la localización tisular y a la abundancia de la especie. Muestran un CDR3 de longitud constante emparejado con un
45 número limitado de segmentos V β junto con un fenotipo activado (CD44), pareciendo ser el resultado de expansiones oligoclonales (Lantz y Bendelac. 1994. J. Exp. Med. 180:1097-106; Tilloy *et al.*, J. Exp. Med., 1999, 190:7-1921). Son CD4⁺ o CD4⁻/CD8⁻ (DN) o CD8 $\alpha\alpha$ en el hombre, no pareciendo requerir las moléculas accesorias CD4 o CD8 para ser seleccionadas. Ambas poblaciones necesitan la expresión de su elemento exclusivo en las células hematopoyéticas derivadas y no en el epitelio tímico, contrariamente a las células establecidas $\alpha\beta$ TCR T (Bendelac A, 1995, J. Exp. Med. 182:2091-6, véase a continuación). Ambas están limitadas por moléculas de tipo Ib (no clásicas, que dependen de la β 2-microglobulina (β 2m), pero independientes de TAP), que es CD1 para NK-T. Las células NK-T son abundantes en el timo, hígado, bazo y médula ósea, pero casi no se encuentran en los nódulos linfáticos periféricos (PLN) y el tracto linfoide asociado al intestino (GALT).

55 Los inventores han descubierto que la molécula exclusiva de tipo Ib es MR1 para las células humanas Va7.2-Ja33 y para las células Va19-Ja33 en ratones y en el ganado, y que dichas células T invariantes asociadas con las mucosas (MAIT) están ausentes del timo, hígado, bazo y médula ósea, pero abundan en la lámina propia (LP) intestinal y en los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN).

60 Las moléculas MR1 son codificadas por el gen relacionado con el tipo I de MHC. La genómica, isoformas, expresión y filogenia del gen MR1 relacionado con el tipo I de MHC son descritos por Hashimoto *et al.* (Science 269 (1995) 693) y por Patricia Riegert *et al.* (The Journal of Immunology, 1998, 4066-4077). MR1 se expresa en muchos tejidos, pero muestra muchas formas alternativas de corte y empalme tanto en el hombre como en ratones.

65 También se ha descubierto que las células NK T son abundantes en los ratones, pero no en el hombre, mientras que las células MAIT se encuentran en grandes cantidades en éste, pero son mucho menos numerosas en los ratones.

Además, se ha establecido por los inventores que esta subpoblación de células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α que se conserva entre las especies, se localiza en la lámina propia (LP) intestinal y en otros tejidos mucosos, tal como en los pulmones, y requiere las células B para su acumulación. La sobreexpresión transgénica de estas células induce en algún antecedente genético la activación de las células LP B asociada con niveles más altos de IgA en los fluidos intestinales. Los inventores han descubierto que la forma de corte y empalme más abundante de MR1 que se expresa en el intestino, es la longitud total MR1A. Este hallazgo explica probablemente la localización de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α . Dichas células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α parecen estar también implicadas en la regulación de las funciones de las células B de la lámina propia, mediante el reconocimiento de la molécula MR1 no clásica de tipo I de MHC (mediante la secreción de linfoquinas tales como IFN- γ y TGFB1). Así, puede establecerse que estas células T invariantes asociadas a la mucosa (células MAIT) regulan la inmunidad de las mucosas.

En vista de lo mencionado anteriormente, un objeto de la presente invención es un procedimiento para modular una respuesta inmune en un individuo, en particular en un mamífero y más específicamente en el hombre, que comprende la administración al individuo de un compuesto que modula la actividad de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α .

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para regular la actividad de las células inmunes, particularmente de las células T y/o de las células B, regulando la actividad de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α .

La invención se refiere asimismo a procedimientos para cribar compuestos, que comprende determinar la capacidad de un compuesto de prueba para regular la actividad de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α , utilizando en particular MR1 o sus fragmentos, o el ácido nucleico que lo codifica, o células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido.

La invención se refiere asimismo a procedimientos para cribar compuestos, que comprende determinar la capacidad de un compuesto de prueba para regular la actividad de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α , o del polipéptido MR1, en particular mediante la unión a MR1 o sus fragmentos, o el ácido nucleico que lo codifica, o células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto que modula la actividad de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α o del polipéptido MR1 y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable. La invención se refiere también a procedimientos para diagnosticar una disfunción en un individuo, preferentemente un mamífero, que comprende determinar la presencia de un defecto de la actividad o del número (aumento o disminución) de las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2/19-J\alpha 33$ TCR α o la presencia de una mutación o alteración en un gen o ARN de MR1, o determinar la presencia o cantidad de un polipéptido MR1 o de un ligando que se una a MR1. En particular, se refiere a procedimientos para diagnosticar una disfunción intestinal en un individuo.

Por razones de simplicidad, las células T que transportan la cadena $V\alpha 7.2-J\alpha 33$ TCR α y las células T que transportan la cadena $V\alpha 19-J\alpha 33$ TCR α se denominarán en adelante células $J\alpha 33$ T.

La invención resulta particularmente adecuada para tratar o diagnosticar patologías en las que esté implicada la actividad de las células inmunes, particularmente de las células T y/o B. La invención resulta particularmente adecuada para tratar o diagnosticar patologías en las que esté implicada la actividad de las células T, tal como infecciones virales, enfermedades tumorales u otras proliferativas, enfermedades autoinmunes, etc, que se relacionen particularmente con una enfermedad de la mucosa. La invención puede utilizarse, por ejemplo, para tratar a pacientes con la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa u otras enfermedades intestinales inflamatorias.

Polipéptido MR1

En el contexto de la presente solicitud, el término polipéptido MR1 indica preferentemente un polipéptido MR1 de mamífero, todavía más preferentemente, un polipéptido MR1 de roedor o humano. Un polipéptido MR1 preferido de la presente invención comprende la totalidad o parte de SEC ID n°:1, que se identifica en Genbank como ID n°:U22963 o un derivado funcional suyo. SEC ID n°:1 es:

MGELMAFLLPLIIVLMVKHSDSRTHSLRYFRLGVSDPIHGVPEFISVGYVDSHP
 ITTYDSVTRQKEPRAPWMAENLAPDHWERYTQLLRGWQQMFKVELKRLQRHY
 5 NHSGSHTYQRMIGCELLEDGSTTGFLQYAYDGQDFLIFNKDTLSWLAVDNVAHT
 IKQAWEANQHELLYQKNWLEEECIAWLKRFLEYGKDTLQRTEPPLVRVNRKETF
 10 PGVTALFCKAHGFYPPEIYMTWMKNGEEIVQEIDYGDILPSGDGTYQAWASIELD
 PQSSNLYSCHVEHCGVHMLVLPQSEETIPLVMKAVSGSIVLVIVLAGVGVLVW
 RRRPREQNGAIYLPDR

Los fragmentos o sus partes se refieren a cualquier porción de, por lo menos, 5 aminoácidos consecutivos, típicamente, de 5 a 100. Los fragmentos preferidos contienen dominios funcionales, tales como sitios de unión a ligandos. Los derivados funcionales incluyen variantes que se presentan de forma natural, por ejemplo, polimorfismos, formas de corte y empalme, homólogos de otras especies, etc. Asimismo, incluyen derivados sintéticos, es decir, polipéptidos MR1 creados artificialmente con secuencias aminoácidas modificadas, comparadas con la SEC ID n°:1 (U22963).

La modificación de la secuencia aminoácida incluye cualquier mutación, delección o adición suya. Derivado funcional significa que el polipéptido MR1 conserva la capacidad para unirse a las células J α 33 T o a un receptor específico suyo, o unirse a un ligando de MR1. El polipéptido MR1 de la invención se encuentra preferentemente en forma aislada o purificada (es decir, no en su entorno natural). Puede también unirse a o inmovilizarse en soportes sólidos, tales como columnas, perlas, etc. Puede combinarse con otras moléculas activas o adyuvantes o disolventes. El polipéptido MR1 puede expresarse a partir de células huésped recombinantes. El polipéptido MR1 puede ser cualquier polipéptido o un fragmento suyo codificado por el gen relacionado de tipo I de MHC. Más preferentemente, el polipéptido MR1 es seleccionado de entre el grupo constituido por hMR1-A, -B, -C y -D o mMR1-A, -B, -C, -D, -E y -F, tal como se describe en Riegert *et al*, the Journal of Immunology, 1998, 4066-4077. El polipéptido MR1 preferido corresponde a la SEC ID n°:1. El polipéptido MR1 de la presente invención puede unirse a cualquier secuencia heteróloga o mitad, tal como un agente estabilizador, un marcador, una etiqueta, una mitad diana, un medicamento, una citoquina, una toxina, etc.

El polipéptido MR1 puede utilizarse para producir anticuerpos, o sus multímeros, modular una respuesta inmune, regular la actividad de las células J α 33-T *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, cribar compuestos que modulen la actividad de las células J α 33 T, etc.

Gen MR1

El gen MR1 de la presente invención hace referencia a cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido MR1 tal como se ha definido anteriormente. Incluye cualquier ADN (por ejemplo, gADN, cADN, etc) o secuencia de ARN. En una forma de realización más preferida, la secuencia del ácido nucleico MR1 corresponde a una secuencia que codifica la secuencia SEC ID n°:1 de MR1 o un derivado funcional suyo.

Vectores

El gen MR1 puede incluirse en cualquier vector. El vector puede ser cualquier plásmido, fago, episoma, cromosoma artificial, virus, etc. Los ejemplos típicos incluyen vectores plasmídicos, tales como los derivados de plásmidos disponibles comercialmente (pUC, pBR322, pcADN, etc). Otros vectores preferidos son virus, particularmente, virus recombinantes (defectuosos en la replicación), tal como los derivados de los retrovirus, baculovirus, lentivirus, AAVs, adenovirus, herpesvirus, etc. Los vectores pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, uniendo la molécula ácido nucleica MR1 al sitio apropiado de clonación del vector. El vector puede incluir además secuencias regulatorias tales como promotores, finalizadores, potenciadores, silenciadores, etc, origen u orígenes de replicación, genes marcadores, etc. Los ejemplos típicos de promotores incluyen promotores que permiten la expresión constitutiva, o regulada, o selectiva tisular, promotores débiles o fuertes, de origen celular, viral o sintético, tales como los promotores RVS-LTR, SV40-IE, o CMV-IE, promotores de genes domésticos (PGK, etc), promotores bacterianos o fágicos (T7, Lac, Trp, etc).

Los vectores pueden utilizarse para expresar un ácido nucleico de la presente invención *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. En particular, los vectores pueden utilizarse para producir un polipéptido MR1 en una célula, *in vitro* o *ex vivo*, así como directamente *in vivo*, en un programa de terapia génica.

Células huésped

La presente invención se refiere también a células huésped que comprenden una molécula de ácido nucleico o un vector que codifica los polipéptidos MR1 tal como se ha definido anteriormente. El polipéptido puede expresarse en el interior del citoplasma celular, o liberarse de las células mediante cualquier medio. El polipéptido puede, en particular, expresarse como una molécula soluble o secretada.

La célula recombinante puede ser cualquier célula cultivable, tal como células procarióticas o eucarióticas, que incluyen bacterias, levaduras, células de insectos, células vegetales, células de mamífero, etc. La célula puede ser una progenie celular o un cultivo primario. Ejemplos típicos incluyen *E.coli*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, células de insectos, fibroblastos de mamíferos o células embrionales, HEK, CHO, COS, 3T3, 293, etc. Se entenderá que la invención no esté limitada a ningún tipo específico de célula huésped.

En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula que no expresa de forma natural un polipéptido MR1 humano o murino. Dicha célula huésped puede utilizarse ventajosamente en ensayos de cribado, con un aumento en la selectividad.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar células que expresen un polipéptido MR1, comprendiendo dicho procedimiento la introducción *in vitro* en las células una molécula ácido nucleica o un vector, tal como se ha definido anteriormente, y seleccionando las células o su progenie que expresa el polipéptido. La introducción del ácido nucleico o del vector puede llevarse a cabo mediante varios medios conocidos, tales como mediante la transferencia directa del ADN, la transfección mediada por lípidos, la precipitación mediante fosfato cálcico, la electroporación, etc. Las células pueden cultivarse en cualquier medio apropiado y almacenarse bajo cualquier procedimiento convencional.

Anticuerpos

La presente invención se refiere también a un anticuerpo que se une a un polipéptido MR1 o a una célula J α 33 T, tal como se ha definido anteriormente. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo que se obtiene inmunizando a un animal con un polipéptido tal como se ha definido anteriormente, con una célula huésped tal como se ha definido anteriormente o una célula J α 33 T. A este respecto, un objeto de la invención incluye asimismo un procedimiento para preparar un anticuerpo, comprendiendo dicho procedimiento la inyección a un mamífero no humano de un polipéptido o de una célula J α 33 T tal como se ha definido anteriormente, y recuperando el anticuerpo, suero o células productoras de anticuerpos en dicho mamífero.

El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, así como fragmentos y derivados suyos, en particular fragmentos y derivados de dichos anticuerpos que tienen substancialmente la misma especificidad antigénica. Estos incluyen fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab'2, CDRs, etc), anticuerpos humanizados, anticuerpos polifuncionales, anticuerpos de Cadena Unica (ScFv), etc. Pueden obtenerse según procedimientos convencionales, que incluyen la inmunización de un animal y la recuperación de células séricas (policlonales) o células del bazo (para producir hibridomas mediante fusión con progenies celulares apropiadas).

Los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales a partir de varias especies, que incluyen ratones, roedores, primates, caballos, cerdos, conejos, aves de corral, etc, pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow *et al* (Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988), o en Kohler *et al* (Nature 256 (1975)495). Brevemente, estos procedimientos comprenden inmunizar a un animal con el antígeno, seguido por una recuperación de células del bazo que se fusionan entonces con células inmortalizadas, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes producen los anticuerpos monoclonales y pueden seleccionarse mediante diluciones limitadas para aislar clones individuales.

Los anticuerpos pueden producirse también seleccionando bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, tal como se da a conocer, por ejemplo, en Ward *et al* (Nature 341 (1989) 544).

Pueden encontrarse procedimientos para obtener anticuerpos policlonales a partir de varias especies, tal como se han mencionado anteriormente, por ejemplo, en Vaitukaitis *et al* , 1971. Brevemente, se combina el antígeno con un adyuvante (por ejemplo, el adyuvante de Freund's) y se administra a un animal, típicamente, mediante inyección subcutánea. Se recogen muestras sanguíneas y las inmunoglobulinas o el suero se separan.

Los fragmentos Fab o F(ab')₂ pueden producirse mediante digestión proteásica, según técnicas convencionales. Pueden prepararse anticuerpos humanizados tal como se ha descrito previamente (Jones, 1986).

La mayoría de los anticuerpos preferidos de la presente invención son anticuerpos funcionales, es decir, anticuerpos que regulan la actividad de MR1, más particularmente, anticuerpos que pueden activar o bloquear la interacción de MR1 con una célula T que transporte una cadena J α 33 TCR α . Dichos anticuerpos pueden a continuación seleccionarse poniendo en contacto un anticuerpo, tal como se da a conocer anteriormente, con una célula T que transporta una cadena J α 33 TCR α y un polipéptido MR1, y determinando la capacidad de dicho anticuerpo para bloquear o inactivar las células J α 33 T. La presente invención muestra que dichos anticuerpos funcionales (por ejemplo, bloqueantes) pueden obtenerse y utilizarse para regular la actividad de las células inmunes.

Los anticuerpos pueden unirse, covalentemente o no, directamente o mediante la utilización de agentes de acoplamiento o engarces, a mitades heterólogas, tales como toxinas, marcadores, medicamentos u otros agentes terapéuticos. Los marcadores incluyen radiomarcadores, enzimas, marcadores fluorescentes, partículas magnéticas y similares. Las toxinas incluyen toxinas diftericas, toxina botulínica, etc. Los medicamentos o agentes terapéuticos incluyen linfocinas, antibióticos, (moléculas) antisentido, factores de crecimiento, etc. Los procedimientos para utilizar dichas mitades se ilustran, por ejemplo, en las patentes USA 277.149 y USA 3.996.345.

Los anticuerpos de la presente invención presentan varias aplicaciones, que incluyen utilizaciones terapéuticas y diagnósticas, y pueden utilizarse también para la purificación inmunológica o la detección de un polipéptido MR1 o de células J α 33-T en una muestra (por ejemplo, muestras plasmáticas o séricas). En particular, pueden utilizarse *in vitro* en ensayos de cribado que serán descritos a continuación, o detectar o cuantificar la presencia (o cantidades) del polipéptido MR1 o de las células J α 33 T en una muestra recogida de un individuo, típicamente, una muestra sanguínea de un mamífero, específicamente de un individuo humano.

15 *Otros materiales*

Pueden utilizarse a continuación multímeros, por ejemplo tetrámeros o dímeros, de MR1 o de TCR (V α 7.2-J α 33/V β 13), progenies celulares inmortalizadas que expresan la cadena J α 33 TCR α , tales como los hibridomas T-T (por ejemplo, tal como se describen en Tilloy *et al* , JEM, 1999), o ratones transgénicos V α 19-J α 33 TCR que han obtenido los inventores, para cribar compuestos de prueba o para diagnosticar patologías.

Cribado

La presente invención proporciona un procedimiento para cribar compuestos que están implicados en la actividad de células J α 33 T y potencialmente de las células T y B, y en la regulación del sistema inmune. Estos compuestos, así como los ácidos nucleicos correspondientes, células huésped, plásmidos y sus parejas de unión, pueden utilizarse especialmente en el área de la regulación inmunitaria.

En particular, la invención se refiere a procedimientos para cribar compuestos que incluyen la determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para regular las células J α 33 T. En el contexto de la presente invención, el término “regulación de las células J α 33 T” incluye la modulación del número de células J α 33 T o de su expresión, así como la modulación de la actividad biológica de las células J α 33 T. Cuando un compuesto activa las células T que transportan la cadena V α 7.2/19-J α 33 TCR α , dicho compuesto estimula preferentemente dichas células para emprender actividades relacionadas con la generación de una respuesta inmune o mediada celularmente, tal como la secreción de una linfocina.

La regulación de la actividad de las células J α 33 T incluye, por tanto, la regulación de su número y expresión (sobre o sub expresión), así como la actividad biológica de las células J α 33 T (por ejemplo, las interacciones a continuación de las células B, la activación de las células LP B, la activación de las células secretoras de IgA, el nivel de IgA, IFN γ o la producción de TGF β).

En otra forma de realización, la invención se refiere a procedimientos para cribar compuestos que incluyen la determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para regular la actividad del polipéptido MR1.

En el contexto de la presente invención, el término “regulación de la actividad del polipéptido MR1” incluye la modulación de la síntesis del polipéptido MR1, de su expresión, en particular de su expresión de membrana, así como la modulación de la actividad biológica del polipéptido MR1. Cuando un compuesto activa el polipéptido MR1, dicho compuesto estimula preferentemente la unión del polipéptido MR1 a dichas células J α 33 T para emprender actividades relacionadas con la generación de una respuesta inmune o mediada celularmente, tal como la secreción de una linfocina.

La regulación de la actividad del polipéptido MR1 incluye, por tanto, la regulación de la síntesis del polipéptido MR1, o de su expresión (por ejemplo, de su transcripción, traducción, tráfico, exportación, modificación postraduccional), así como de la actividad biológica de MR1 (por ejemplo, su interacción con dichas células MAIT, la asociación de MR1 con otra pareja celular, etc).

Los compuestos preferidos para identificar son los que regulan selectivamente la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1, es decir, que no interfieren directamente de forma esencial con otro tipo celular o con un elemento de restricción distinto de MR1, aunque pueden inducirse efectos secundarios.

En una forma de realización particular, el procedimiento comprende la determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para :

- unirse a las células J α 33 T,
- unirse al polipéptido MR1,
- activar las células J α 33 T,

- inhibir a las células J α 33 T,
- inhibir la síntesis de MR1 o de su expresión (de membrana)
- estimular la síntesis de MR1 o de su expresión (de membrana)
- modular la unión de MR1 al TCR específico de las células J α 33 T.
- modular (por ejemplo, bloquear o aumentar) la interacción de dichas células J α 33 T con MR1,
- modular (por ejemplo, bloquear o aumentar) la activación de las células B inducida por las células T seleccionadas por MR1.

En una forma de realización particular, la invención comprende un procedimiento para seleccionar, cribar o caracterizar un compuesto, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de un compuesto de prueba con las células J α 33 T tal como se han definido anteriormente, o con su TCR específico, y determinando la capacidad de dicho compuesto de prueba para unirse a dichas células o al TCR.

Este procedimiento incluye la puesta en contacto de un compuesto de prueba con un TCR específico de las células J α 33 T.

El TCR específico de las células J α 33 T incluye receptores funcionales aislados de las células J α 33 T que se unen al polipéptido MR1.

En una forma de realización específica, el procedimiento comprende además la puesta en contacto de dicho compuesto de prueba con, por lo menos, otro tipo celular T (por ejemplo, un tipo de células auxiliares T, linfocitos citotóxicos T, células NK T) y determinando la capacidad de dicho compuesto de prueba para regular (unirse a) dichas otras células T con respecto a identificar compuestos selectivos tal como se han definido anteriormente.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende la puesta en contacto de dicho compuesto de prueba con el polipéptido MR1 o un fragmento suyo, o el ácido nucleico que codifica el mismo, o las células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido y que determinan la capacidad de dicho compuesto de prueba para unirse a dicho polipéptido MR1 o a dicho fragmento suyo.

Esta forma de realización particular permite la identificación de compuestos que se unen a MR1 y modulan potencialmente la actividad biológica de las células J α 33 T.

La invención, pues, se refiere asimismo a un procedimiento para seleccionar, cribar o caracterizar un compuesto, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de un compuesto de prueba con las células J α 33 T o con su TCR específico, tal como se ha definido anteriormente, en presencia de un polipéptido MR1 o de un fragmento suyo, o el ácido nucleico que codifica el mismo, o las células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido tal como se han definido anteriormente (expresando dichas células huésped recombinantes un polipéptido MR1) y determinando la capacidad de dicho compuesto de prueba para competir con o aumentar la unión de dicho MR1 a dichas células.

La etapa de contacto según la invención, se lleva a cabo preferentemente en presencia de células B, sus precursores, o de células que secreten IgA, más particularmente en presencia de células LP B.

La capacidad de un compuesto de prueba para unirse a TCR o a MR1, puede determinarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. *In vitro*, la unión puede determinarse mediante electroforesis, SPA, FRET, etc, o compitiendo con un polipéptido MR1 marcado. A este respecto, en una forma de realización preferida, la unión se determina midiendo la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión de un polipéptido MR1 marcado.

Según otra forma de realización de la invención, el polipéptido MR1, las células J α 33 T o su TCR específico, pueden reemplazarse por un anticuerpo anti-polipéptido MR1 o por células anti-TCR J α 33 T (V α 7.2-J α 33/V β 13), marcadas eventualmente, tal como se ha descrito anteriormente, (por un) un multímero, por ejemplo, tetrámero o dímero, de MR1 o de TCR(V α 7.-J α 33/V β 13), progenies celulares immortalizadas que expresen la cadena J α 33 TCR α , tal como el hibridoma T-T, por ejemplo, tal como se describe en Tilloy *et al.*, o en los ratones transgénicos V α 19-J α 33 TCR que han preparado los inventores.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para seleccionar, cribar, o caracterizar un compuesto, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de un compuesto de prueba con células J α 33 T tal como se han definido anteriormente (o su TCR específico), en presencia, opcionalmente, del polipéptido MR1 o de una célula huésped tal como se ha definido anteriormente (expresando dicha célula huésped un polipéptido MR1), y determinando la capacidad de dicho compuesto para disminuir o aumentar una respuesta biológica inducida por el polipéptido MR1. En una forma de realización particular, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de células B, sus precursores o de células que secreten IgA.

La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la activación de las células LP B, un aumento en los niveles que se expresen de Ig, una actividad citolítica, un aumento de IFN- γ o de la secreción TGF β , etc. En particular, la respuesta biológica puede consistir en la producción de IgA, IFN- γ o TGF β .

5 En una forma de realización particular, la invención comprende la puesta en contacto de un compuesto de prueba con células J α 33 T (o su TCR específico) en presencia de un anticuerpo específico para MR1, y determinando la actividad de dicho compuesto de prueba, midiendo la actividad biológica de dichas células T (o la unión a dicho TCR específico).

10 En otra forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para seleccionar, cribar o caracterizar un compuesto, que comprende la puesta en contacto de un compuesto de prueba con las células J α 33 TCR T en presencia de un polipéptido MR1, y evaluando la capacidad de dicho compuesto de prueba para modular la interacción entre dicho polipéptido MR1 y dichas células J α 33 T. El cribado de los compuestos que poseen la capacidad de interferir con dicha interacción, proporciona, de este modo, moléculas que tienen la capacidad para regular la actividad de MR1
15 o de las células J α 33 T.

Dicho cribado puede llevarse a cabo *in vitro* poniendo en contacto un polipéptido MR1 (o una célula huésped que exprese un polipéptido MR1), con el compuesto de prueba y dichas células T.

20 En una forma de realización particular, un procedimiento de cribado comprende (i), la determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para unirse a las células J α 33 T y (ii), determinar la capacidad de un compuesto de prueba seleccionado en (i) para regular (por ejemplo, bloquear, reducir o estimular) una de las funciones de las células B (por ejemplo, la proliferación de las células B o de la actividad secretora de IgA, o de su actividad TGF β o IFN γ).

25 El compuesto de prueba puede ser cualquier compuesto sintético, incluyendo productos orgánicos, lípidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, antisentido), etc. El ensayo puede realizarse en cualesquiera dispositivos apropiados, tales como placas, tubos, cubetas, matraces, etc. Típicamente, el ensayo se lleva a cabo en placas multiplacillos. Pueden ensayarse en paralelo varios compuestos de prueba. Además, el compuesto de prueba puede tener distintos orígenes, naturaleza, y composición. Puede ser cualquier sustancia orgánica o inorgánica, aislada, o mezclada con otras sustancias. Los compuestos pueden constituir la totalidad o parte de una biblioteca combinatoria de productos, por ejemplo.
30

Modulación de la respuesta inmune

35 La invención proporciona un procedimiento para modular una respuesta inmune en un individuo, en particular un mamífero, que comprende la administración al individuo que requiera dicha modulación, de un compuesto que module la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1.

40 La invención se refiere a la utilización de compuestos capaces de modular (estimular o inhibir) la actividad transductora de Myd88, y modular de este modo la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1, para modular la respuesta inmune en un individuo. Por ejemplo, dichos compuestos pueden ser un extracto bacteriano que estimula o inhibe los receptores TLR intestinales.

45 Otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para regular (*in vivo*, *in vitro*, o *ex-vivo*.) la actividad de células inmunes, particularmente de las células T y/o de las células B, regulando la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1.

50 Las células J α 33 T o el polipéptido MR1 están implicados en la regulación de la función inmune, y su modulación o regulación pueden producir de este modo una regulación de una función inmune *in vivo*, en particular en los tejidos mucosos y más particularmente, en los tejidos digestivos. En particular, compuestos que regulan la actividad de MR1 pueden utilizarse para regular la actividad de las células J α 33 T, y consecuentemente las células B u otras células T, particularmente para estimular o inhibir la actividad de las células J α 33 T, más específicamente la activación o inhibición de las células B mediadas por las células J α 33 T y en particular la activación o inhibición de las células LP B.
55

60 El compuesto que modula la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1 incluye cualquier compuesto identificado mediante el procedimiento de cribado tal como se ha definido anteriormente. Dicho compuesto puede también seleccionarse en MR1 o sus fragmentos, o en el ácido nucleico que codifica los mismos, o en las células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido tal como se ha definido anteriormente, o un anticuerpo de MR1 tal como se ha definido anteriormente. Las células J α 33 T, el TCR específico, o sus anticuerpos, pueden también utilizarse *per se* para regular la actividad de las células inmunes, particularmente de las células T y/o de las células B y más específicamente de las células LP B o de las células B de otros tejidos mucosos.

65 Un objeto de la presente invención consiste, por lo tanto, en un procedimiento para regular una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar a un individuo un compuesto que, (selectivamente), regula la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1. La invención se refiere asimismo a la utilización de un compuesto que (selectivamente) regula la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1 en la preparación de un medicamento para regular una respuesta inmune en un individuo, y en particular una respuesta inmune de la mucosa.

La invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende células J α 33 T, el polipéptido MR1, una célula huésped que expresa el polipéptido MR1 o el TCR específico de las células J α 33 T o un compuesto que regula la actividad de las células J α 33 T o del polipéptido MR1, y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones particulares comprenden un compuesto que estimula la actividad de las células J α 33 T o que inhibe la actividad de las células J α 33 T.

Un objeto particular de la presente invención consiste, por tanto, en una composición que comprende células J α 33 T o un compuesto que regula la actividad de las células J α 33 T y un compuesto que regula la actividad de otras células de tipo B o T, para utilización combinada, secuencial o separada.

El compuesto es preferentemente un compuesto que activa (o inhibe) células J α 33 T, particularmente un polipéptido MR1 tal como se ha definido anteriormente (o un anti-MR1), o una molécula que se selecciona o se identifica mediante un procedimiento tal como el descrito anteriormente.

Los compuestos pueden administrarse según varias vías, enteral o parenteralmente, tal como por vía oral, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, etc. Los compuestos pueden utilizarse a varias dosis, que pueden adaptarse por el experto en la materia.

Los compuestos están concebidos (o “ajustados”) particularmente para estimular una respuesta inmune en el hombre, en particular para estimular las células J α 33 T en un individuo humano. Dichos compuestos son también apropiados para utilización en el tratamiento, prevención o diagnóstico de patologías en las que está implicada la actividad de las células J α 33 T, tales como infecciones víricas, enfermedades tumorales u otras proliferativas, enfermedades autoinmunes, etc, relacionadas particularmente con una enfermedad de las mucosas, ajustándose los productos, en particular, para tratar (o prevenir) cualquier enfermedad inflamatoria intestinal, o cualquier patología intestinal que se asocie con una respuesta inmune inapropiada. La invención puede utilizarse, por ejemplo, para tratar pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa u otras enfermedades inflamatorias intestinales.

La invención se refiere asimismo a procedimientos para diagnosticar una disfunción en un individuo, en particular, un trastorno intestinal, particularmente, una enfermedad intestinal inflamatoria, o cualquier enfermedad intestinal que se asocie con una respuesta inmune inapropiada, tal como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa u otras enfermedades inflamatorias intestinales, que comprenden la determinación *in vivo*, *ex vivo* o, en particular, *in vitro*, por ejemplo, en una muestra obtenida a partir de dicho individuo, de la presencia de un defecto en la actividad de las células J α 33 T, o la presencia de una mutación o alteración en un gen o ARN MR1, o determinando la presencia o la cantidad de un polipéptido MR1.

Estos procedimientos pueden llevarse a cabo utilizando anticuerpos, tetrámeros o dímeros, o cebadores ácido nucleicos o sondas, tal como se describe anteriormente, para numerar o aislar las células T que transportan J α 33 o las células que expresan MR1. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un PCR cuantitativo sobre muestras sanguíneas purificadas, para constatar la ausencia de las células T que transportan J α 33, tal como se describe a continuación, en pacientes deficientes en Btk. También se pueden aislar las células J α 33 T para medir su capacidad productora de linfoquinas, mediante ELISA, tinción intracelular, o mediante borrones ELIS. El procedimiento puede llevarse a cabo con una muestra obtenida a partir de un individuo, tales como muestras tisulares, particularmente muestras de tejido mucoso, tales como muestras intestinales, colónicas, o séricas, sanguíneas, plasmáticas, o de otros fluidos biológicos, etc.

Estos procedimientos de diagnóstico están “ajustados” particularmente para el diagnóstico de enfermedades intestinales (o de que exista el riesgo de desarrollarlas), relacionadas con un defecto en la actividad de dichas células J α 33 T o del polipéptido MR1.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se darán a conocer en los ejemplos siguientes, que serán considerados como ilustrativos y no limitativos del alcance de la presente solicitud. Todas las referencias mencionadas se incorporan en la presente memoria como referencia.

Leyendas de las figuras

Figura 1.A Células humanas invariantes portadoras de V α 7.2-J α 33 expresan el marcador α 4 β 7 intestinal buscador.

Figura 1.B Células humanas invariantes portadoras de V α 7.2-J α 33 se encuentran en el LP y PP intestinales y no en la piel.

Figura 1.C Células de ratón portadoras de V α 19-J α 33 se encuentran en LP intestinal y en MLN.

Figura 1.D Células de ratón portadoras de V α 19-J α 33 se encuentran en el LP y PP intestinales y no en IEL.

Figura 2.A Celularidad de los distintos órganos de los ratones V α 19-J α 33 TG.

Figura 2.B Aumento de la utilización de los segmentos V β 8 en los ratones V α 19-J α 33 TG.

ES 2 312 782 T3

Figura 2.C Aumento de la utilización de los segmentos $V\beta 6$ y $V\beta 8$ en los ratones $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ TG.

Figura 3.A Selección de las células $V\alpha 19$ - $J\alpha 33^+$ T requiere la expresión de su ligando en las células hematopoyéticas derivadas.

Figura 3.B $V\alpha 19$ + LPL dependen de la expresión de su ligando en las células B.

Figura 3 C. Disminución en el número de $mV\alpha 19$ - $J\alpha 33^+$ LPL y de $hV\alpha 7.2$ - $J\alpha 33^+$ PBL en ausencia de células B.

Figura 3 D. Presencia de $V\alpha 19$ - $J\alpha 33^+$ LPL en ratones $mMT^{-/-}$

Figura 3 E. Células MAIT no se encuentran en ratones sin Gem

Figura 3 F. mARN $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ normalizado en LPL en ratones deficientes en MyD88, representando cada punto un único ratón.

Figura 4 A. La forma MR1A de corte y empalme se expresa preferentemente en la Lamina propia.

Figura 4B. Las células LP B se activan y expresan más IgA en ratones que sobreexpresan las células MAIT

Figura 4 C. Las células LP B se activan y expresan más IgA en ratones que sobreexpresan las células MAIT

Figura 5 A. Niveles de IgA en las heces de ratones $mV\alpha 19$ - $J\alpha 33$ Tg

Figura 5 B. Niveles de IgA en el suero de ratones $mV\alpha 19$ - $J\alpha 33$ Tg

Figura 5 C. IgG sub-normal en el suero de ratones que sobreexpresan células MAIT.

Figura 5 D. Aumento de la expresión de $IFN-\gamma$ en LPL de ratones $mV\alpha 19$ - $J\alpha 33$ Tg.

Figura 5 E. Cuantificación de $TGF\beta$ en los linfocitos MLN DN estimulados por mitógenos de ratones que sobreexpresan células MAIT.

Figura 5 F. Cuantificación de ARNm $IFN-\gamma$ en linfocitos MLN estimulados por anti-CD3 + anti-CD28 de ratones que sobreexpresan células MAIT.

Figura 6 A. Expresión de mMR1A-GFP en transfectantes RBL y HOM2.

Figura 6 B. Expresión de membrana de mMR1A-GFP en transfectantes RBL y HOM2.

Figura 6 C. Hibridomas $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T-T responden a transfectantes MR1A.

Figura 6 D. Células $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ Tg MLN T responden a transfectantes MR1A.

Figura 6 E. Respuesta del hibridoma T-T contra MR1. 5.10^4 células de la progenie celular parental BW5 147, el hibridoma 6C2 o el 18G7 se cultivaron durante 24 horas con 5.10^4 células transfectadas con mMR1 (LM1.8 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ mMR1 + clon $\alpha 3$ Ld 1.1.3), en ausencia o presencia del anticuerpo anti-mMR1 (4E3:dilución final 1/100), anti-TCR β (H57:dilución final 10 μ g/ml), del control isotipo (dilución final 10 μ g/ml) o del control ascítico (GK1.5, dilución final 1/10). 50 μ l del sobrenadante del cultivo se incubaron entonces con 6.10^3 células CTL-L2 dependientes de IL-2 durante 24 horas antes de añadir 1 μ Cie de ^{3} timidina tritiada. Se midió la radioactividad a las 16 horas.

Figura 7 A. Estrategia para inactivar MR1 (De S. Gilfillan y S. Barham)

Figura 7 B. Fenotipo de las células T y B en el bazo de ratones defectuosos en MR1.

Figura 7 C. Células MAIT no se encuentran en ratones defectuosos en MR1.

Materiales y métodos

Ratones

A partir de las dependencias centrales animales CDTA de la CNRS (Orleans, Francia), se obtuvieron ratones defectuosos $C\alpha$ y $\beta 2m^{-/-}$ (ambos N9 a C57B1/6 (B6)) y congénicos B6 CD45.1. Ratones defectuosos TAP se obtuvieron del laboratorio Jackson a partir de unos antecedentes (información previa) B6/129. Los ratones defectuosos II (B6 129) y μ MT (N10 a B6) se obtuvieron del CDTA.

Los ratones defectuosos $Ca^{-/-}$, II y TAP se cruzaron entre ellos para obtener el doble o el triple de ratones defectuosos. A partir de J. Disanto, se obtuvieron ratones defectuosos en la cadena gamma (γ) del receptor habitual de la interleucina, y se cruzaron con los ratones $RAG2^{-/-}$ y $\beta 2m^{-/-}$ para obtener triples ratones defectuosos, tal como se ha descrito (I. Grandjean, en preparación). Ratones defectuosos Xid y J_H fueron donados amablemente por el equipo de P.A. Cazenave (Instituto Pasteur). Ratones libres de microorganismos (CH3) y controles emparejados se obtuvieron de CDTA.

Ratones transgénicos $V\alpha 19-J\alpha 33$ se obtuvieron tal como se ha descrito (Tilloy *et al.*, J. Exp. Med 1999, 1907-1921), clonando un producto PCR obtenido a partir de cADN de células DN T en el vector lanzadera alpha de TCR (Patten). El constructo se inyectó en huevos B6/DBA2 F1 en las dependencias "transgénicas" (en las que se aplican técnicas de transgénesis) de la CNRS (I. Cerruti, Villejuif, Francia). Se retrocruzaron cinco progenies fundadoras durante por lo menos 9 generaciones, a ratones defectuosos Ca . Tres de las progenies se retrocruzaron también a $Ca^{-/-}$ /TAP $^{-/-}$ /II $^{-/-}$ durante por lo menos 9 generaciones y se encuentran, por lo tanto, en unos antecedentes (información previa) mezclados B6/129 (el haplotipo H-2^d MHC se eliminó mediante cribado al empezar el programa de cría). Todos los ratones se alojaron en nuestra colonia convencional SPF y se genotiparon mediante PCR.

Preparación de las células

Se prepararon las suspensiones celulares a partir del timo, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos o periféricos, mediante una ruptura mecánica suave a través de una red de nylon, en PBS suplementado con BSA al 0,5%. Los linfocitos de la Lámina propia intestinal se prepararon tal como se ha descrito en Guy-grand *et al.*, J. Exp. Med.): brevemente, se irrigaron los intestinos varias veces con PBS para eliminar su contenido, y después de eliminar las placas de Peyer, se abrió el intestino longitudinalmente y se lavó otra vez en PBS enfriado. Se eliminó el epitelio incubando dos veces en 60 ml de PBS + 3 mM de EDTA, trozos de 5 cm durante 10 minutos, y entonces dos veces en 15 ml de medio independiente de CO₂ que contenía FCS dializado al 1%, 1 mM de EGTA y 1,5 mM de MgCl₂ durante 15 minutos, con agitación al 37%. Los trozos de intestino se sometieron a rotación durante 2 minutos, se cortaron en piezas de 0,5 cm y se agitaron durante 90 minutos a 37°C en 30 ml de medio independiente de CO₂ suplementado con FCS al 20%, 100 U/ml de colagenasa y 5 U/ml de DNasa I. En la mitad y al final del tiempo de incubación, la suspensión se irrigó varias veces mediante una jeringa para aumentar la disociación. Se lavó el sedimento, se filtró mediante una criba celular de 22 μ m y los LPL se separaron mediante centrifugación en un gradiente M de linfocitos.

Citometría de flujo

Se llevó a cabo una citometría de flujo, tal como se describe en Tilloy *et al.* (J. Exp. Med., 1999, 1907-1921), utilizando los anticuerpos siguientes: CD4-APC, CD8 α -FITC, TCR $\alpha\beta$ -cy, CD69-PE, CD44-PE, V β 6-PE, V β 8-PE, H2-Kb PE, B220-cy, IgA-FITC, CD80-PE, Mac1-APC, (Pharmingen). Los resultados se obtuvieron en un FACScalibur[®] (BD). Para la tinción intracelular, después de la tinción de la superficie celular, las células se fijaron con el Tampón de Lisis Facs (BD), se incubaron 30 minutos en 40 μ l de Saponina + Leche, añadiéndose entonces 10 μ l de anti IgA-FITC, IFN APC o IL4 PE diluido en saponina + leche. Después de 30 minutos, las células se lavaron en PBS + saponina, y se volvieron a suspender en PBS-BSA. Para la detección intracelular de la citoquina, se estimularon las células, en primer lugar, 2 h 30 min con PMA y Ionimicina en presencia de monensina. Utilizamos una combinación de un CD4-PE, CD8 α -APC y TCR $\alpha\beta$ -FITC, para la clasificación celular en un FACSvantage[®] (BD). Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa CellQuest[®] (BD).

Quimeras hepáticas fetales

Ratones C57B1/6 (CD45.2 o CD45.1) o $b2m^{-/-}$ (CD45.2) de 12 semanas de edad, se inyectaron intraperitonealmente en el día -1 y en el día 0 con 0,3 (D-1) y 0,4 mg (D0) de PK136mAb; después de la segunda inyección, se irradiaron subletalmente los animales (950 cGy), y 6 horas después se inyectaron con 5 millones de células hepáticas preparadas desde el día 15 a partir de fetos de C57B1/6 (CD45.2 o CD45.1) o $\beta 2m^{-/-}$ (CD45.2). 3 meses después, los ratones se sacrificaron y se recogieron timo, nódulos linfáticos y bazos. Se llevó a cabo el análisis fenotípico mediante citometría de flujo tal como se ha descrito, apreciándose el nivel de quimerismo utilizando los marcadores congénicos CD45.2/1. El tiempo real RT-PCR y la secuenciación policlonal se llevaron a cabo en fracciones enriquecidas en TCR $\alpha\beta$ + DN de los nódulos linfáticos. Brevemente, las células de los nódulos linfáticos se tiñeron con perlas magnéticas anti-CD4 FITC y anti-CD8-FITC, se lavaron dos veces y se incubaron con perlas anti-FITC. Las células se hicieron pasar entonces por una columna MS sobre un imán MACS[®] (Myilteny), recuperándose el efluente como fracción negativa (CD4-CD8). Para cada grupo de ratones, la frecuencia de DN entre las células TCR $\alpha\beta$ + fue superior al 80%, tal como se advirtió mediante chequeo con citometría de flujo.

Quimeras de médula ósea

Suspensiones de células de médula ósea de ratones C57/B16 y $\beta 2m^{-/-}$ de 12 semanas de edad, se trataron con líquido ascítico anti-Thy1.2 (proporcionado amablemente por el Dr.A. Lehen) y complementado en presencia de 10 μ g/ml de DNasa I (Sigma) durante 1 hora a 37°C, para eliminar las células maduras. 5.10⁶ células $\beta 2m^{-/-}$ BM, junto con 5.10⁶ células C57/B16, $RAG2^{-/-}$ o CD3 $\epsilon^{-/-}$ BM, se inyectaron intravenosamente en huéspedes $RAG2^{-/-}$ -gc $^{-/-}$ - $b2m^{-/-}$ que se habían tratado dos días antes con x mg/ml 5 F.U. Como controles, 107 células $b2m^{-/-}$ o C57/B16 BM se inyectaron en huéspedes $RAG2^{-/-}$ -gc $^{-/-}$ - $b2m^{-/-}$. 3 meses después los ratones se sacrificaron y el timo, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos se recogieron. También se extrajeron los LPL del intestino delgado, tal como se ha descrito. Las

ES 2 312 782 T3

suspensiones celulares de todos estos órganos se sometieron a tinción con diversos mAbs para estudiar el quimerismo y la reconstitución hematopoyética.

Clonación de mMR1A

El cADN de las células totales C57B1/6 PBMC o de las células humanas B se amplificó durante 35 ciclos con los siguientes cebadores:

SEC ID n°: 2 5'ratón aagaaggagatctgtgatgggtcctctgttacctctgctcg,
SEC ID n°: 3 3'ratón agagaaagaattcgagaggagagcttcctcattcacttg;
SEC ID n°: 4 5'humano aaaaaattccgctagcgggatgggggaactgatggcgcttc,
SEC ID n°: 5 3'humano ttttaaccctcgagtcgatctgggtgttgaaggtagatgg.

El producto PCR se cargó en un gel de agarosa LMP al 0,8%, y después de migración, la banda superior de 1 Kb se extirpó y purificó utilizando un equipo de extracción de gel (Quiagen). El producto purificado se clonó entonces en el vector EGFP-N 1 (Clontech).

Transfecciones

El mMR1A en el producto EGFP-N1 se linearizó mediante digestión con ApaLI, se precipitó con etanol y el sedimento se disolvió en tampón estéril TE a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 10^7 células RBL o Hom2 se lavaron dos veces en PBS enfriado, se volvieron a suspender en 800 μl DMEM, y se incubaron 10 minutos con 20 μg de mMR1A-EGFPN1 digerido. Las células se sometieron entonces a electroporación en cubetas de 4 mm (Biorad), y después de 10 minutos de incubación, se volvieron a suspender en medio RPMI completo, sembrándose en placas de 6 pocillos a razón de $2 \cdot 10^5$ células/ml. Después de 24 horas, se añadió G418 a razón de 1 mg/ml (RBL) o de 0,5 mg/ml (Hom2). Después de 10-14 días, los pocillos positivos se ensayaron en cuanto a la expresión de GFP mediante análisis FACS, y las células GFP + se clasificaron en relación con la expresión de GFPhi con un FACS Advantage®. Los transfectantes RBL o HOM2GFPhi se sembraron entonces a razón de 1 célula/pocillo, y después de 10-14 días, se ensayaron los clones con respecto a la expresión de GFPhi.

Biotinilación de la membrana e inmunoprecipitación

Se incubaron 10^7 células con 0,5 mg/ml de biotina en 1 ml de PBs enfriado durante 7 minutos, diluyéndose con 10 ml de PBS enfriado y centrifugándose durante 7 minutos a 4°C (1200 rpm). El sedimento se volvió entonces a suspender en 3 ml de PBS enfriado + Glicina 0,1 M, se incubó 10 minutos con hielo, se diluyó con 10 ml de PBS enfriado, se centrifugó 3 minutos a 4°C (3000 rpm) y se volvió a suspender en tampón de lisis (Triton 0,5%, 300 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, quemostatina, aprotinina, pepstatina, y N-etil maleimida). Para la inmunoprecipitación, las células se incubaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm a 4°C. Se lavaron 50 μl de perlas de Straptavidina-agarosa en tampón de lisis + antiproteasas, y se añadieron a 50 μl del sobrenadante de la lisis celular, se incubaron durante 6 horas en un rodillo a 4°C, se lavaron 3 veces en tampón de lisis + antiproteasas, se centrifugaron durante 1 minuto a 14000 rpm, y se volvieron a suspender en 20 μl de colorante de carga.

Transferencia Western

Las células se lisaron mediante incubación en tampón de lisis, tal como se expuso anteriormente. Los lisados celulares se diluyeron en tampón reductor de la muestra y se hirvieron durante 5 minutos antes de electroforesis en SDS que contenía geles de poliacrilamida al 8%. Las proteínas se electrotransferieron a membranas de fluoruro de polivinilidona (Millipore). Las membranas se incubaron con solución bloqueante, seguido por un anticuerpo anti-GFP primario y entonces un anticuerpo específico marcado con peroxidasa de rábano. La quimioluminiscencia se detectó con un equipo Boehringer. Los borrones se visualizaron en un dispositivo Storm 860 (Molecular Dynamics).

ELISA

Para la detección de IgA en las heces de los ratones, las muestras se “desagregaron” en tampón TNC al 10% (peso/vol) que contenía 10 mM de Tris pH 7,4, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ y Tween 20 al 0,05%. Las muestras se sometieron a rotación, se incubaron 45 minutos en hielo, se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C a 10000 rpm, y se recuperaron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80°C hasta análisis posterior. Placas de 96 pocillos se recubrieron 2 horas a 37°C con 200 μl de anti-IgG1 (0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IgG2a (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IgG2b (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IgE (1/200), IgA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o TGF β (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) anticuerpos de captura, en un tampón NaHCO₃ de pH 9,6. Después de 4 lavados con PBS tween al 0,05%, las placas se saturaron con PBS BSA al 0,1% durante 1 hora a 37°C, lavándose otra vez 4 horas con idéntico tampón de lavado. Los sueros de los sobrenadantes de las heces pretratadas o del sobrenadante del cultivo se añadieron e incubaron durante la noche a 4°C. Se ensayaron diluciones seriadas de cada muestra (excepto para TGF β), que iban de 1/5000 a 1/500000 (IgG1, 2a, 2b) o 1/100 a 1/10000 (IgE) o (IgA). Después de 5 lavados, se añadieron IgG (1/1000) o IgA (1/1000) anti-ratón conjugados a la fosfatasa alcalina, y después de 2 horas de incubación a 20°C, las placas

se lavaron 5 veces, y se incubaron con zafiro (1/50) + CDPStar (1/500) en tampón de 0,1M Dietanolamina. Para la detección de IgE y TGF β , se utilizaron 2 horas a 37°C anti-IgE (1/3000) o anti-TGF β (1 μ g/ml) biotinilados; después de 5 lavados, se añadió Streptavidina conjugada a PA(1/2000), y después de 1 hora de incubación a 37°C seguida por 5 lavados, los pocillos se incubaron durante 30 minutos a 20°C con zafiro y CDPStar. La reacción luminométrica se midió con un dispositivo Victor (Wallac).

Hibridoma T-T y cribado de progenies celulares hematopoyéticas y transfectantes

Los hibridomas T-T se prepararon tal como se describe en Tilloy *et al* , 1999) a partir de células DN T de los nódulos linfáticos mesentéricos de ratones TAP^{-/-}II^{-/-}. Entre los 356 pocillos de crecimiento, 58 fueron positivos con respecto a la secuencia canónica V α 19-J α 33. Como la frecuencia inicial de V α 19-J α 33 era de alrededor del 2-5%, existe claramente una tendencia hacia la fusión de células positivas V α 19-J α 33, que podrían reflejar su activación *in vivo*. 9 hibridomas eran V β 6 y 16 eran V β 8, confirmando los resultados obtenidos con otro (material destinado a una operación idéntica) previamente publicado (Tilloy *et al* , J. Exp. Med, 1999, 1907-1921). Las progenies celulares o los transfectantes estables que iban a ser cribados, fueron sometidos a irradiación y se distribuyeron a razón de 5.10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos con fondo plano, añadiéndose 5.10⁴ hibridomas. Después de una incubación de 48 horas, se recuperó el sobrenadante y se ensayó con respecto al contenido en IL-2 con la progenie celular CTLL2 dependiente de IL-2. Para experimentos de bloqueo, se añadieron diluciones seriadas de anti- β TCR mAb (anti-H57 NA/LE, Pharmigen) a los pocillos. El control isotipo del hamster era el clon Ha4/8 (Pharmingen).

Localización de las células V α 7.2/19-J α 33 + T. Se demostró anteriormente que las células T que transportan la cadena V α 19-J α 33 TCR α invariante no eran detectables en todos los órganos linfoides excepto en los nódulos linfáticos, y que muestran un fenotipo de memoria (Tilloy *et al* ., J. Exp. Med. 1999, 1907-1921). Como algunas células que transportan receptores antigénicos invariantes se localizan en órganos específicos del organismo, tales como la cavidad peritoneal para las células B 1 o la mucosa genital o la piel para algunas subpoblaciones $\gamma\delta$, se examinó con mayor detalle la localización tisular de las células V α 7.2/19-J α 33 + T. Se planteó la hipótesis que las células sanguíneas que transportaban V α 7.2/19-J α 33 podían, de hecho, provenir de los tejidos periféricos no linfoides. Para determinar de qué tejidos provenían estas células, se clasificó mediante FACS a TCR $\alpha\beta$ + DN de las PBL humanas, según el marcador buscador $\alpha 4\beta 7$ específico de los tejidos intestinales. Utilizando PCR (Q-PCT) cuantitativa en tiempo real, los transcritos V α 7.2-J α 33 se segregaron en la fracción TCR $\alpha\beta^+$ DN $\alpha 4\beta 7^+$, indicando que las células V α 7.2-J α 33⁺ T estaban asociadas con el intestino (Fig 1A). Verdaderamente, los transcritos V α 7.2-J α 33 estaban enriquecidos en la Lámina propia intestinal (Fig 1B) y en las Placas de Peyer (no se muestra) y no en los IEL ni en la piel (Fig 1B). Para examinar si las células murinas T que transportaban V α 19-J α 33 se localizarían también en el intestino, se cuantificó la cuantía de la cadena canónica V α 19-J α 33 mediante Q-PCR en distintos órganos. Ya que estas células T son muy escasas en los ratones, se aumentó su frecuencia generando ratones que eran deficientes en las dos moléculas TAP y II. Estos ratones albergaron una proporción más alta de células V α 19-J α 33+T, pues el número de linfocitos T dominante disminuyó, debido a que la expresión de la molécula MHC clásica de selección disminuyó en gran manera. Se aislaron los linfocitos de la Lámina propia del intestino de ratones B6, TAP^{-/-}II^{-/-} y $\beta 2m^{-/-}$, llevándose a cabo Q-PCR de mV α 19-J α 33. Tal como se muestra en la Figura 1C, mientras que la cantidad de C α fue 10 veces más pequeña en una muestra B6 LP que en una MLN, ambos cADN dieron lugar a las mismas curvas V α 19-J α 33, indicando que la muestra LP contiene muchas más células V α 19-J α 33 que MLN. La secuenciación policlonal de los amplicones V α 19-J α 33 confirmó la sobrerrepresentación de la CDR3 canónica específica de esta cadena TCR α invariante (no representada). Los transcritos mV α 19-J α 33 tampoco se encontraban en los linfocitos LP de $\beta 2^{-/-}$ y eran 10 veces más abundantes en TAP^{-/-}II^{-/-}, comparados con los linfocitos B6 LP (Fig 1C) según el trabajo previo de los presentes inventores estudiando los nódulos linfáticos (jem). De forma importante, los transcritos mV α 19-J α 33 fueron también abundantes en los linfocitos PP, pero estuvieron ausentes en el IEL (Fig 1D). Estos resultados demuestran que la Lámina propia del intestino constituye la localización preferida de las células invariantes T que transportan V α 19-J α 33 que se limitan al tipo Ib. Además, los datos preliminares tanto en el hombre como en los ratones mostraron que las células MAIT se encuentran también en los pulmones (datos que no se muestran), sugiriendo que las células MAIT pueden no limitarse al intestino, sino estar presentes en varios tejidos mucosos. Por tanto, se denominará a las células T que transportan V α 7.2/19-J α 33, células T invariantes asociadas a las mucosas (MAIT).

Los ratones transgénicos V α 19-J α 33 sobreexpresan las células MAIT. En un intento para aumentar el número de células T que expresan la especificidad V α 19-J α 33, para estudiar mejor esta población de células T, generamos ratones transgénicos (Tg) para la cadena invariante V α 19-J α 33 TCR α . Se estudiaron tres distintas progenies fundadoras (A,C,G) y se retrocruzaron sobre un ancestro C $\alpha^{-/-}$ B6, para evitar cadenas endógenas TCR α . En todas las progenies, el timo contenía muy pocos timocitos maduros, y también se encontraban muy pocos linfocitos TCR $\alpha\beta$ en los LN periféricos, mientras que MLN y LP especialmente, mostraban una celularidad subnormal (Fig 2A). El nivel de expresión de la cadena TCR β varió de acuerdo con la fundadora pero, en todos los casos el número de células DN TCR $\alpha\beta$ T aumentó mucho al 50%, siendo el número de células CD8⁺T del 30-40%, mientras que los CD4⁺ se redujeron al 5-15% (Fig 2B). En los ratones Tg de cadena C $\alpha^{-/-}$ TCR, la expresión de la cadena TCR β no está controlada, e, incluso emparejada con la cadena Tg TCR α , podría dar lugar a un amplio completamente amplio que podría inducir la selección de un gran número de linfocitos T limitados al tipo II o al tipo clásico MHC, diluyendo las células MAIT específicas. Para evitar estas células T convencionales, las progenies fundadoras V α 19-J α 33 Tg se cruzaron también con un ancestro triple KO C $\alpha^{-/-}$ TAP^{-/-} II^{-/-}. Tal como se muestra en la Fig 2C, la celularidad de los linfocitos T de estos ratones Tg triples KO fue similar a la de los ratones Tg C $\alpha^{-/-}$, excepto en el bazo, donde el número de células T disminuyó también. Los números de células LP T y MLN aumentaron ligeramente cuando se compararon con los ratones Tg C $\alpha^{-/-}$. Estos resultados están de acuerdo con la ausencia de células mV α 19-J α 33 + T detectables en el

timo y en el bazo y su localización preferida en MLN y LP de los ratones B6 o TAP. Se demostró anteriormente que el hibridoma V α 19-J α 33 + T-T expresa preferentemente segmentos V β 6 y V β 8 (JEM). Para verificar que el V α 19-J α 33 Tg MLN y los linfocitos LP representaban verdaderamente a las células MAIT, se estudió la utilización de su segmento V β . Tal como se esperaba, la proporción de los linfocitos MLN de los ratones V α 19-J α 33 Tg utilizando V β 6 y V β 8 aumentó ampliamente en los subconjuntos CD4⁺ y CD8⁺ (Fig 2D). En el intestino, la situación era ligeramente distinta, ya que la utilización de V β 6 aumentó sorprendentemente en CD4⁺ LPL, mientras que CD8⁺ y DN LPL utilizaron preferentemente V β 8 (Fig 2E). De este modo, la sobreexpresión transgénica de la cadena V α 19-J α 33 invariante es suficiente para inducir la acumulación de células T V β 6⁺ y V β 8⁺ en el intestino, confirmado que la Lámina propia de éste constituye un sitio privilegiado para las células T que transportan V α 19-J α 33.

Ontogenia de las células MAIT. Las células T dominantes son seleccionadas en moléculas clásicas de tipo I y II de MHC que se expresan en el epitelio del timo. Por otra parte, la otra subpoblación invariante de células T que transportan la cadena TCR α , las células NK-T, es seleccionada/reclutada mediante el reconocimiento de CD1d que se expresa en células hematopoyéticas derivadas, los timocitos CD4⁺/Cd8⁺ (DP). Como mostramos previamente que las células MAIT requieren una molécula dependiente de β 2m, para examinar el proceso de selección de las células MAIT, se generaron quimeras hepáticas fetales entre ratones deficientes en β 2m y ratones wt B6. El número de células MAIT en las células DN T de los nódulos linfáticos de estas distintas quimeras, se estimó midiendo cantidades V α 19-J α 33 mediante Q-PCR. Tal como se esperaba, las quimeras B6 β 2m^{-/-} (B6 hepático-fetales transferidos a receptores deficientes β 2m irradiados) tienen muy pocas células CD8⁺ T, de acuerdo con el requerimiento absoluto para la expresión del tipo I de MHC en el epitelio tímico para seleccionar positivamente las células CD8⁺ T dominantes (Fig 3A). Los transcritos mV α 19-J α 33 se encontraban en B6 β 2m^{-/-}, pero no en las quimeras β 2m^{-/-}- β 6 tal como se muestra mediante Q-PCR (Fig 3A). La secuenciación policlonal de los amplicones confirmó la abundancia de la secuencia canónica en los amplicones amplificados V α 19-J α 33 (que no se muestra). Así, la expresión del ligando putativo dependiente de β 2m en las células hematopoyético-derivadas es necesaria y suficiente para permitir la acumulación de las células DN MAIT en los nódulos linfáticos. Para identificar qué tipo de célula hematopoyética era responsable de la selección de las células MAIT, generamos quimeras mezcladas en las que, la médula ósea de los ratones deficientes β 2m (BM-#1) se mezcló con una médula ósea de origen distinto (BM-#2) inyectándose entonces en huéspedes alinoides defectuosos β 2m (β 2m^{-/-}/RAG2^{-/-} γ c^{-/-}). En este momento, las células T derivan de BM-#1 después de volver a repoblar el timo del huésped y son deficientes β 2m, mientras las células derivadas de BM-#2 constituyen la única fuente de β 2m. Por tanto, cuando el BM-#2 es RAG2^{-/-}, sólo los macrófagos y las células dendríticas muestran moléculas MHC dependientes de β 2m, mientras que cuando BM-#2 es CD3 ϵ ^{-/-}, existen células B añadidas. En todos los grupos, se generaron muy pocas células CD8^{hi} T, pues el epitelio tímico del huésped no aloja la molécula clásica de tipo I de MHC (Fig 3B). Tal como se muestra en la Fig 3B, cuando el origen de β 2m eran los macrófagos y las células dendríticas, no se pudo encontrar el transcrito V α 19-J α 33 en LPL, mientras que la adición de las células β 2m + B fue suficiente para dar lugar a V α 19-J α 33 + LPL. Estos resultados indican que las células T pueden dispensarse para la selección de MAIT (contrariamente a las células NK T), mientras que DCs o los macrófagos no son suficientes y sugieren una función importante para las células B.

La selección de las células MAIT por las células B se confirmó además por una disminución significativa en la cantidad de los transcritos V α 19-J α 33 en TCR $\alpha\beta$ + DN de MLN y en los LPL de los ratones J_H^{-/-}, que son completamente deficientes en células B (figura 3C). La secuenciación policlonal de los amplicones demostró que la secuencia canónica no se encontraba en los ratones J_H^{-/-}, aunque se utilizaron los segmentos V α 19 y J α 33 conjuntamente con CDR3 de distintas longitudes (figura 3D). Para examinar si las células MAIT humanas requerirían también la presencia de las células B, cuantificamos los transcritos V α 7.2-J α 33 en los PBL humanos TCR $\alpha\beta$ + DN de un individuo normal y de 2 pacientes a los que les faltaba la tirosin quinasa de Bruton (Btk^{mutada}), que no tienen células B. Tal como se muestra en la Fig 3E, la cantidad de los transcritos hV α 7.2-J α 33 en las células DN T de estos pacientes fue muy baja, comparada con el individuo normal. Estos resultados muestran totalmente que las células B son necesarias para la acumulación de las células MAIT en los MLN y en el intestino de los ratones B6 y en la sangre periférica humana. Recientemente, se ha descubierto que los ratones a los que les falta la región transmembranosa de IgM [ratones (μ MT^{-/-})] albergan células productoras de IgA en su intestino, a pesar de una deficiencia casi completa de células B. Se examinó entonces si estas células B podrían seleccionar las células MAIT, midiendo la cantidad de transcritos V α 19-J α 33 en LPL de los ratones μ MT^{-/-}. Tal como se muestra en la Fig 3F, se encontró un número normal de células MAIT en LPL de los ratones μ MT^{-/-} deficientes en células B, indicando que las células B intestinales son suficientes para la selección de las células MAIT.

Como las células MAIT se encuentran en la Lámina propia del intestino, podría hipotetizarse una vía extra tímica de desarrollo. Sin embargo, en la Lámina propia, incluso, de ratones desnudos ancianos, no se pudo encontrar ningún transcrito V α 19-J α 33 canónico (no representado), confirmando nuestro informe previo (Tilloy *et al*, 1999). Finalmente, nos preguntamos si la acumulación de células MAIT estaría gobernada antigénicamente, estudiando la Lámina propia de ratones libres de gérmenes. Tal como muestra en la Fig 3D, no pudieron encontrarse transcritos V α 19-J α 33 canónicos en la Lámina propia de las células MLN DT T obtenidas a partir de varios ratones libres de gérmenes. Este resultado sugiere que, o las células MAIT reconocen un epítipo conservado, derivado de algún patógeno habitual, o que un ligando endógeno experimente un aumento regulado por la flora microbiana comensal.

La flora comensal podría inducir directa o indirectamente un aumento regulado de MR1 o de su ligando, y el reclutamiento de células MAIT a la Lámina propia intestinal. En cualquier caso, la vía de señalización a través de la cual la flora comensal induce la selección de las células MAIT podría implicar moléculas evolucionariamente conservadas tales como los receptores Toll (TLR). Para examinar esta hipótesis, se cuantificó el número de células

MAIT en la Lámina propia de ratones deficientes en MyD88 (un adaptador de señales de varios TLR y de algún otro receptor de membrana). Tal como se muestra en la Fig 3F, se descubrió que las células MAIT habían disminuido ampliamente en los ratones deficientes en MyD88, indicando que Myd88 es necesario para la selección de las células, y que los receptores TLR están probablemente implicados en la selección de las células MAIT.

Células B y células MAIT. Anteriormente, se ha demostrado que las células MAIT son seleccionadas por la molécula Ib de tipo MHC, MR1. MR1 se expresa en muchos tejidos, pero muestra muchas formas de corte y empalme alternativas en el hombre y en los ratones. El análisis secuencial sugiere que sólo el ARNm más voluminoso (que codifica MR1A) permite la expresión de una proteína funcional. Para examinar si la localización intestinal de las células MAIT estaría relacionada con la expresión preferida de una proteína funcional MR1, se amplificó MR1 mediante PCR con cebadores que permitían distinguir las distintas formas de corte y empalme en el cADN del bazo o de las células LP B. Tal como se muestra en la Fig 4A, la molécula predominante NMI de corte y empalme, era la más voluminosa en las células LP B, mientras que las más cortas eran más abundantes en el bazo, sugiriendo que la localización de las células MAIT en LPL podría estar relacionada con la expresión de su ligando en este órgano. Debido a que no existen buenos marcadores, que pudieran distinguir apropiadamente las células activadas B1 y B2 en la LP, no se pudo evaluar si MR1A se podría expresar de forma distinta en estas dos poblaciones celulares. A continuación, se estudiaron el número y el fenotipo de las células B en los ratones $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg que sobreexpresan las poblaciones MAIT. Tal como se aprecia en la figura 4B, el número de células B maduras ($CD19^{+}/B220^{hi}/IgD^{hi}$) disminuyó en la LP, mientras que hubo un aumento en la proporción de células B activadas ($B220^{int}/IgD^{int}$ con una expresión más alta de CD80 en esta subpoblación. Al contrario que esto, todos los subconjuntos de células B mostraron un fenotipo normal en los otros órganos linfoides tales como el bazo y MLN (Fig 4B). Además, en LP de los ratones Tg, aumentó el número de células voluminosas que expresaban IgA superficial, cuando se comparó con los ratones de control (Fig 4C).

Funciones de las células MAIT

Las modificaciones en el fenotipo observado de las células LP B según la cantidad de células MAIT, sugirió que estas células pueden regular las funciones de las células B del intestino. En verdad, se encontró un gran aumento (de 3 a 10 veces) de los niveles de IgA en las heces de los ratones $Ca^{-/-}/TAP^{-/-}/II^{-/-}$ $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg cuando se compararon con los animales B6 (Fig 5A). Una posible advertencia de este hallazgo fue que los ratones deficientes Ca son propensos a desarrollar una colitis que podría explicar el fenotipo de los ratones $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg, que se encuentran en un ancestro $Ca^{-/-}$ o uno $Ca^{-/-}/TAP^{-/-}/II^{-/-}$. Sin embargo, no encontramos aumento en los niveles de IgA en las heces, en ratones $Ca^{-/-}$, $TAP^{-/-}/II^{-/-}$ o $Ca^{-/-}/TAP^{-/-}/II^{-/-}$ criados en nuestras dependencias para animales. Además, el análisis histológico de los cortes intestinales de ratones $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg de 4/5 meses de edad en ambos ancestros no mostraron síntomas de colitis (no representado). Así, la sobreproducción de IgA intestinal que observamos está ciertamente relacionada con la sobreexpresión de las células MAIT en los ratones $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg. Por otra parte, los niveles séricos de los distintos isotipos Ig fueron similares en los ratones Tg y B6, indicando que la ausencia de un desvío hacia Th1 (IgG2a) o Th2 (IgG1, IgE) de la respuesta inmune sistémica en los ratones $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg. Sólo existió un ligero aumento en los niveles de IgG1, y un pequeño descenso en los niveles de IgG2b, mientras que los niveles de IgG2a, IgE e IgA fueron similares (Fig 5B). Así, la sobreexpresión de las células MAIT modificó sólo el IgA intestinal y no los niveles séricos de Ig. Sin embargo, este aumento en el nivel de IgA en las heces no se encontró en el $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ transgénico en un ancestro único $Ca^{-/-}$. Además, los ratones MR1 KO mostraron un aumento en el número de Ig⁺ plasmablastos. Estos resultados, de forma total, sugieren que las células MAIT podrían regular la actividad de las células que secretan IgA en LP.

Medimos las linfoquinas que se expresaban o estaban producidas por las células MAIT, después de distintos estímulos. Se estimularon, en primer lugar, las células $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg MLN T con PMA y ionomicina y se examinó su producción de citoquinas mediante tinción intracelular, o en el sobrenadante. La proporción de células CD4⁺ y CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ que secretaban IFN- γ aumentó en los ratones Tg cuando se compararon con los controles B6 (CD4⁺: 10% +/- vs; CD8⁺: 7% +/- vs 1% +/-) (Fig 5C), mientras que la de las células productoras de IL4 IL10 fue similar (datos no representados). De manera importante, la cantidad de la principal linfoquina implicada en la secreción de IgA, TGF β 1, aumentó en el sobrenadante de las células $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg MLN T (Fig 5D). El ARNm de varias citoquinas extraídas de Tg LPL se midió también mediante Q-PCR. Los ratones Tg mostraron un promedio de 10 veces de aumento en los niveles de IFN γ ARN cuando se compararon con los ratones de control, mientras los de IL4 disminuyeron dos veces (Fig 5E). Por otra parte, la expresión de los niveles de IL-5, IL2, IL10 y TNF- α mARN fue similar en los ratones wt y $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg (datos que no se muestran). Como IFN- γ se ha implicado en el aumento regulado del receptor poly Ig (plgR) que transporta IgA desde el intersticio a la luz intestinal, este aumento en la expresión de IFN- γ asociado con una secreción más alta de TGF β 1 observada en los ratones $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ Tg, sugiere que las células MAIT tienen la capacidad de regular la secreción de IgA intestinal.

Células MAIT y MR1

Como las células MAIT requieren células hematopoyéticas y, más específicamente, células B para su selección (ver anteriormente) se examinó en primer lugar la capacidad de un conjunto de progenies celulares para estimular una serie de hibridomas T-T que expresan $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ + TCR (Tilloy *et al.*, J. Exp. Med. 1999, 1907-1921 y datos no publicados). Ninguna de las progenies celulares estudiadas pudo inducir la liberación de IL-2 más que los 40 hibridomas T-T que se ensayaron (datos no representados). La conservación filogenética sorprendente de tanto las secuencias MR1 como de MAIT TCR, hizo que MR1 fuera un buen candidato para ser el ligando de las células MAIT. Generamos varias progenies que expresaban mMR1A como una proteína de fusión con EGFP. Como se muestra en

la Fig 6A, los transfectantes fueron GFP-positivos mediante FACS, pero la mayoría de la fluorescencia se encontraba en el interior celular (datos no representados), de modo similar a lo que se ha descrito en otro caso (BBRC). En una progenie celular B humana transfectada (HOM2), una pequeña cantidad de la proteína se expresó en la superficie celular tal como se muestra por la banda de 80 kD que se aprecia en la transferencia Western con el anticuerpo anti-GFP en un precipitado de una perla de estreptavidina de un lisado celular biotinilado superficial (Fig 6B). Como para el RBL transfectado, la expresión superficial sólo se apreció después de estimulación con ionomicina y un éster de forbol (Fig 6B). Se examinó entonces la capacidad de estos transfectantes MR1 para estimular el hibridoma T-T. Tal como se aprecia en la Fig 6C, se estimularon específicamente 3 hibridomas para liberar IL-2 mediante el RBL transfectado por MR1A (18G7, 6C2, 6H2) y/o mediante HOM2 (6C2) sugiriendo intensamente que existía un reconocimiento directo de MR1A por V α 19-J α 33 TCR. Además, la estimulación de los hibridomas T-T fue bloqueada, añadiendo un anticuerpo anti-TCR al cultivo y un anticuerpo anti-MR1 (proporcionado amablemente por Ted Hansen de la Universidad de Washington en Saint Louis, MI): véase la Fig 6E. De acuerdo con estos resultados, las células T obtenidas de los ratones transgénicos V α 19-J α 33 TCR, que sobreexpresan las células MAIT, se estimularon para liberar TGF β 1 mediante los transfectantes HOM2 (Fig 6D). Para demostrar el papel de MR1A en la selección *in vivo* de las células MAIT, se estudió un ratón deficiente en MR1 generado por S. Gilfillan (Washington University en Saint Louis, MI). La estrategia diana se muestra en la Fig 7A. Los ratones MR1 KO mostraron un número normal y un fenotipo de células B y T en los órganos linfoides centrales y periféricos (timo, bazo, nódulos linfáticos periféricos y mesentéricos (PLN y MLN) (Fig 7B). Utilizando RT-PCR en tiempo real para los segmentos V α 19-J α 33 en TCR $\alpha\beta$ + DN clasificados de MLN, no pudimos amplificar ninguna secuencia V α 19-J α 33 en los ratones MR1 KO, mientras que se obtuvo una amplificación normal en los controles de camada (Fig 7C). La secuenciación policlonal de los amplicones V α 19-J α 33 confirmó la especificidad de la amplificación (datos que no se muestran). Se obtuvo el mismo resultado en las células LP T (Fig 7D). De este modo, las células MAIT que expresan V α 19-J α 33 no se encuentran en los ratones MR1 KO. Estos resultados demuestran totalmente que MR1 es el ligando que selecciona las células MAIT.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para seleccionar, cribar o **caracterizar** un compuesto, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de un compuesto de prueba con células T $J\alpha 33$ o un TCR específico de las mismas en presencia del polipéptido MR1 (SEC ID nº:1), un fragmento del mismo, o una célula huésped recombinante que expresa dicho polipéptido, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para regular la actividad de dichas células T $J\alpha 33$ o de dicha unión del polipéptido MR1.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende la determinación de la capacidad de dicho compuesto de prueba para competir con o aumentar la unión de dicho polipéptido MR1 o su fragmento a dichas células T $J\alpha 33$ o a su TCR específico.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende la determinación de la capacidad de dicho compuesto de prueba para disminuir o aumentar una respuesta biológica inducida por el polipéptido MR1.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la respuesta biológica es seleccionada de entre el grupo constituido por la activación de las células B de la Lámina Propia, (LP), aumento en los niveles expresados de Ig, una actividad citolítica, y un aumento de IFN- γ o de la secreción de TGF β .

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa de contacto se lleva a cabo en presencia de células B, de sus precursores, o de células que secretan IgA, más particularmente en presencia de células B LP.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho polipéptido MR1, las células T $J\alpha 33$, o su TCR específico, son reemplazados por un anticuerpo específico para el polipéptido MR1 o anti-TCR células T $J\alpha 33$, un multímero, progenies celulares inmortalizadas que expresan la cadena $J\alpha 33$ TCR α , tales como el hibridoma T-T, o los ratones transgénicos V $\alpha 19$ - $J\alpha 33$ TCR.

7. Utilización de un compuesto que modula la unión del polipéptido MR1 (SEC ID nº1) con las células T $J\alpha 33$, en la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o cualquier otra enfermedad intestinal inflamatoria, en la que dicho compuesto es seleccionado de entre el grupo constituido por anticuerpos específicos para TCR de las células T $J\alpha 33$, polipéptidos MR1 o sus fragmentos, células huésped recombinantes que expresan dicho polipéptido, y un anticuerpo específico para el polipéptido MR1.

8. Composición farmacéutica que comprende un compuesto que modula la unión del polipéptido MR1 (SEC ID nº:1) con las células T $J\alpha 33$, y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, en la que el compuesto es seleccionado de entre el grupo constituido por un polipéptido MR1, o una célula huésped recombinante que expresa dicho polipéptido, un anticuerpo específico para el polipéptido MR1 y un anticuerpo específico de TCR de las células T $J\alpha 33$.

9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que el compuesto es seleccionado de entre el grupo constituido por un polipéptido MR1 o una célula huésped recombinante que expresa dicho polipéptido, y un anticuerpo específico para el polipéptido MR1.

10. Composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, que comprende además un compuesto que regula la actividad de otro tipo de célula T o células B, para utilización combinada, secuencial o separada.

Figura 1a

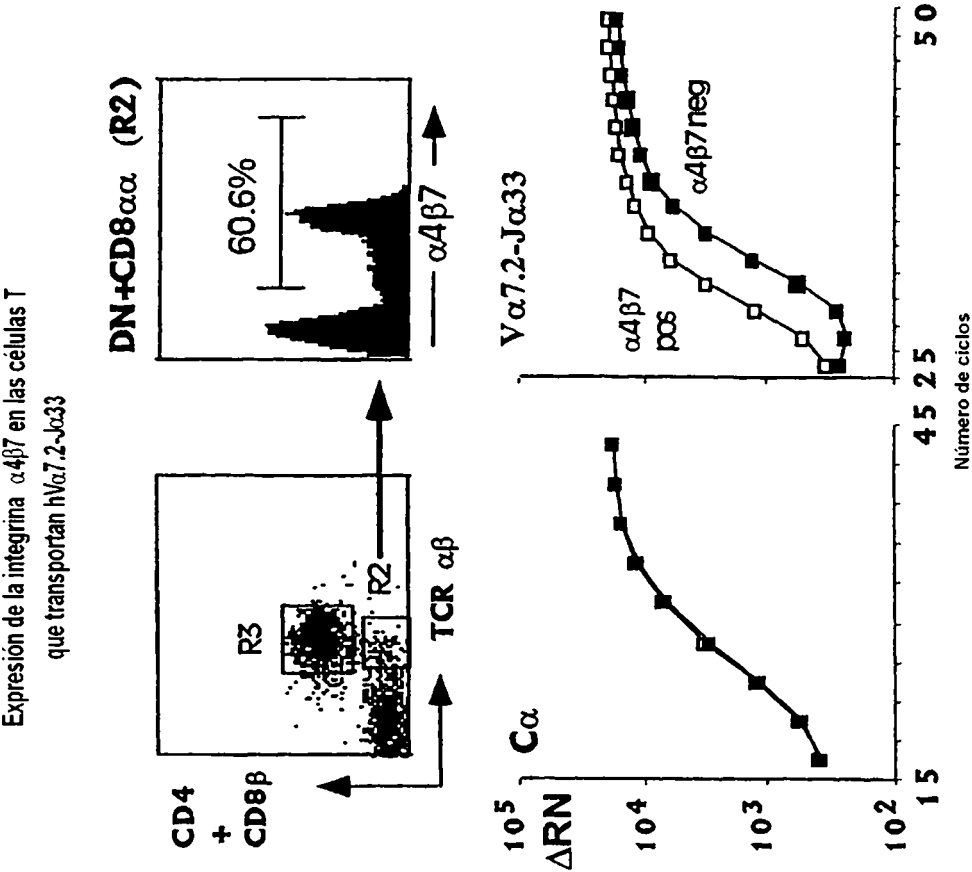


Fig. 1b

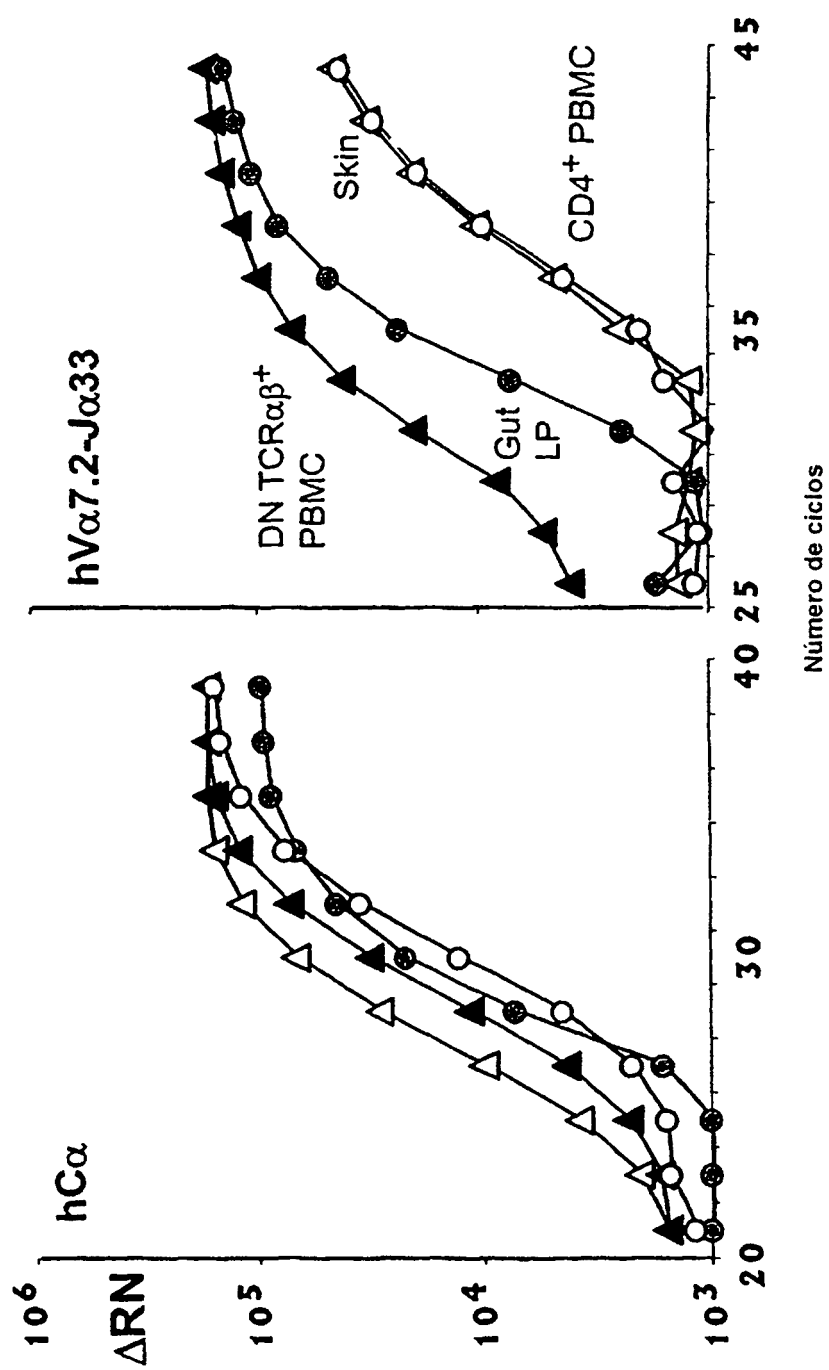
Cuantificación de las células $V\alpha 7.2-J\alpha 3T$ en los tejidos humanos

Fig. 1C

Las células invariantes que transportan $V\alpha 19-J\alpha 33$ son abundantes en la lámina propia del intestino

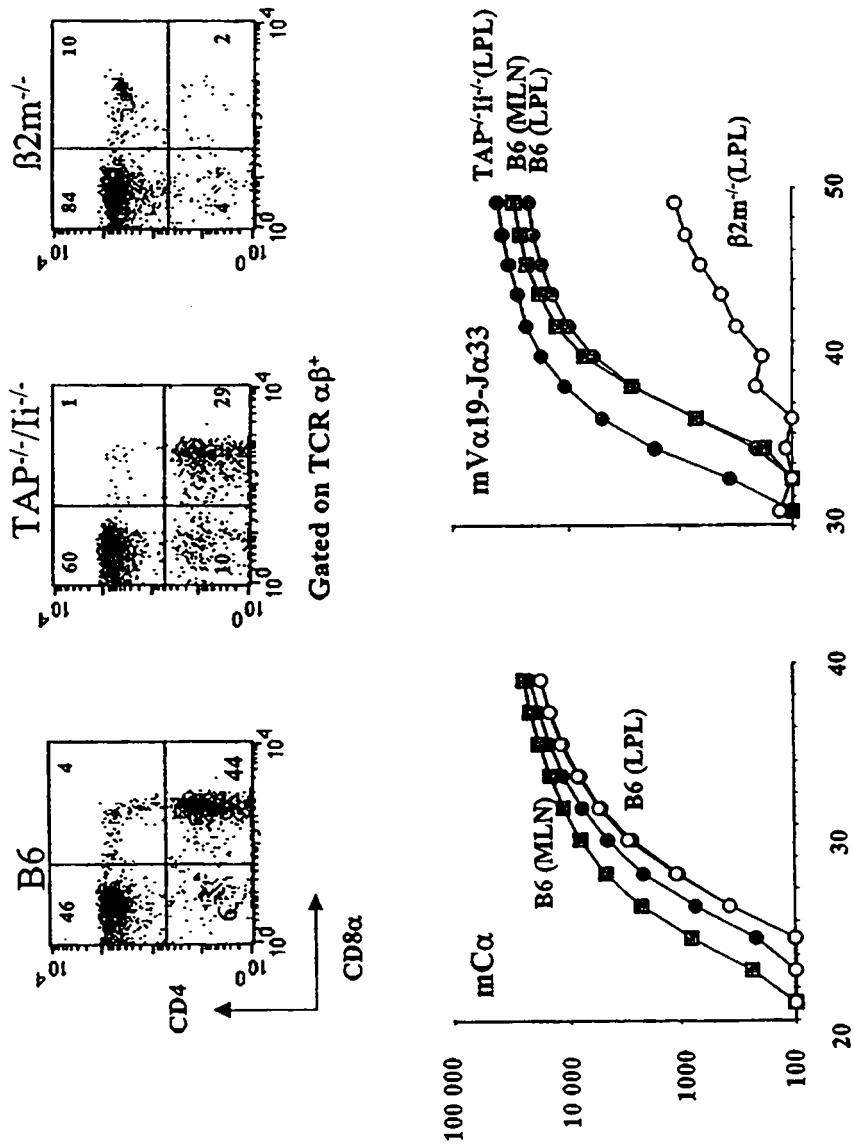


Figura 1D

Células mV α 19-J α 33T en intestino

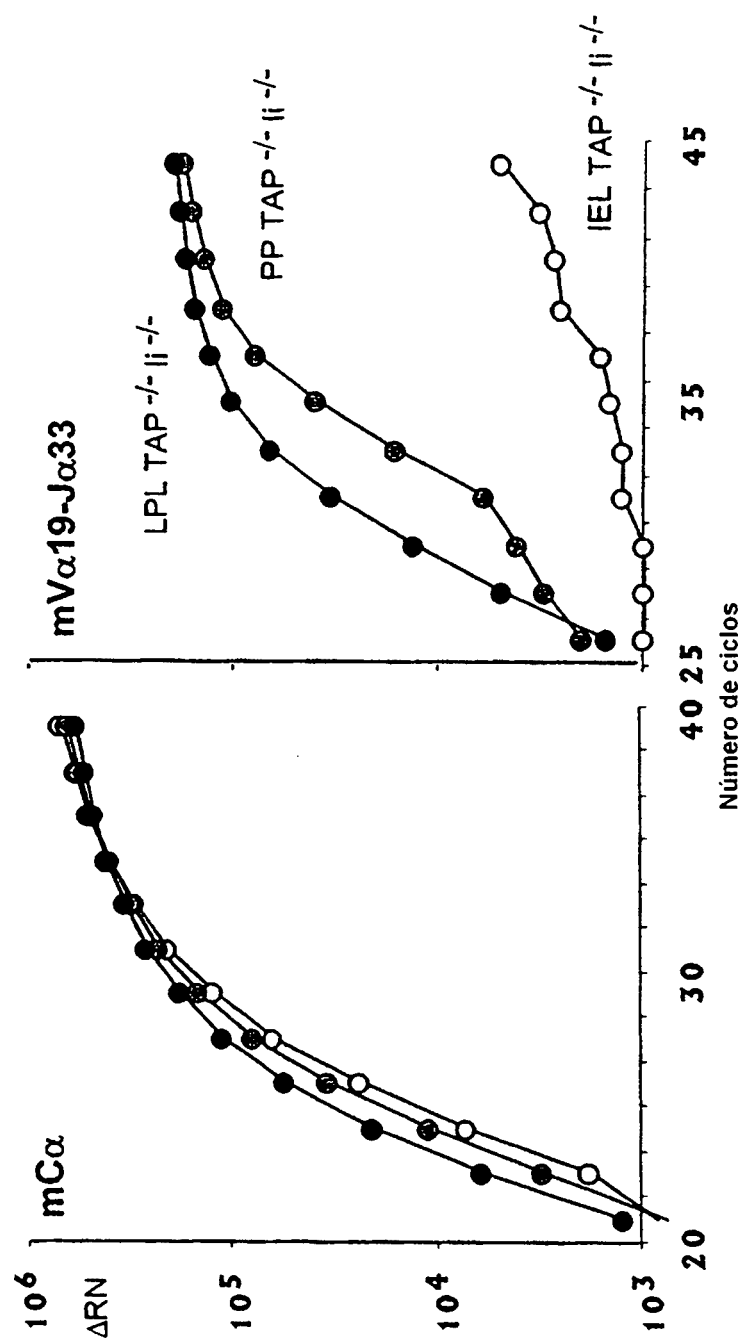


Fig. 2A

Gran cantidad de células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ en los MLN y en la lámina propia de los ratones transgénicos $\text{V}\alpha 19.\text{J}\alpha 33$

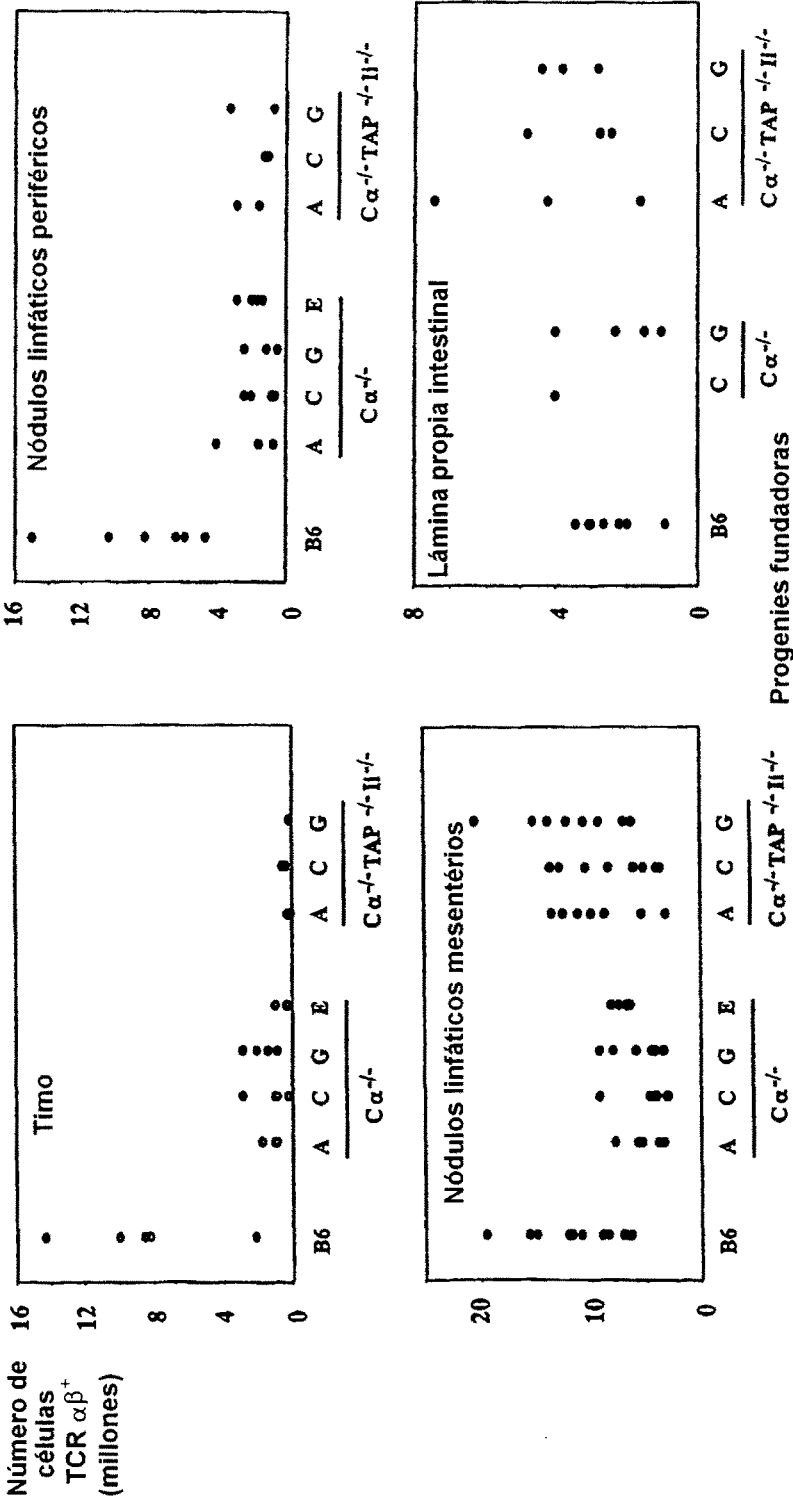


Fig. 2B

Aumento de la utilización de segmentos
V β 8 en DN y CD8 α LPL de los ratones
transgénicos V α 19-J α 33

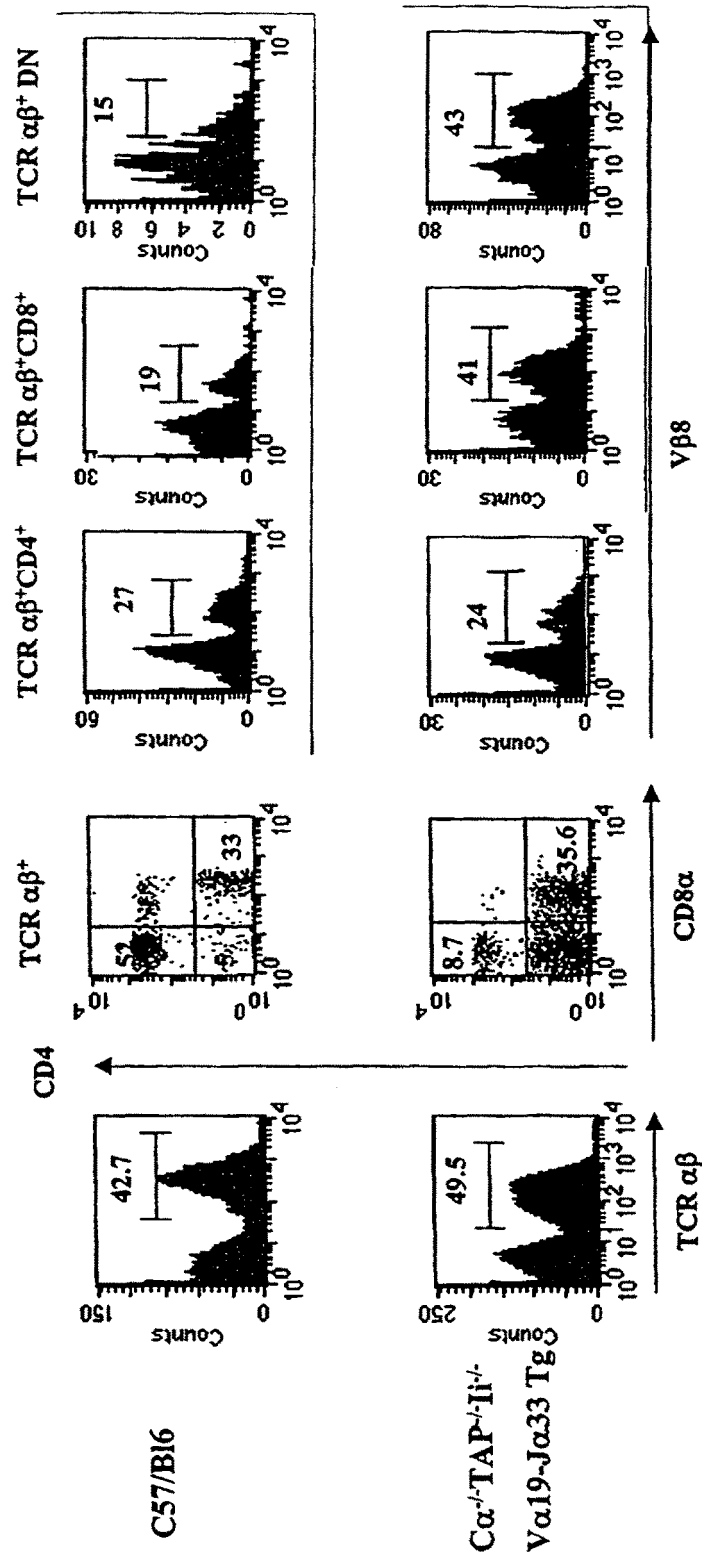


Figure 2C

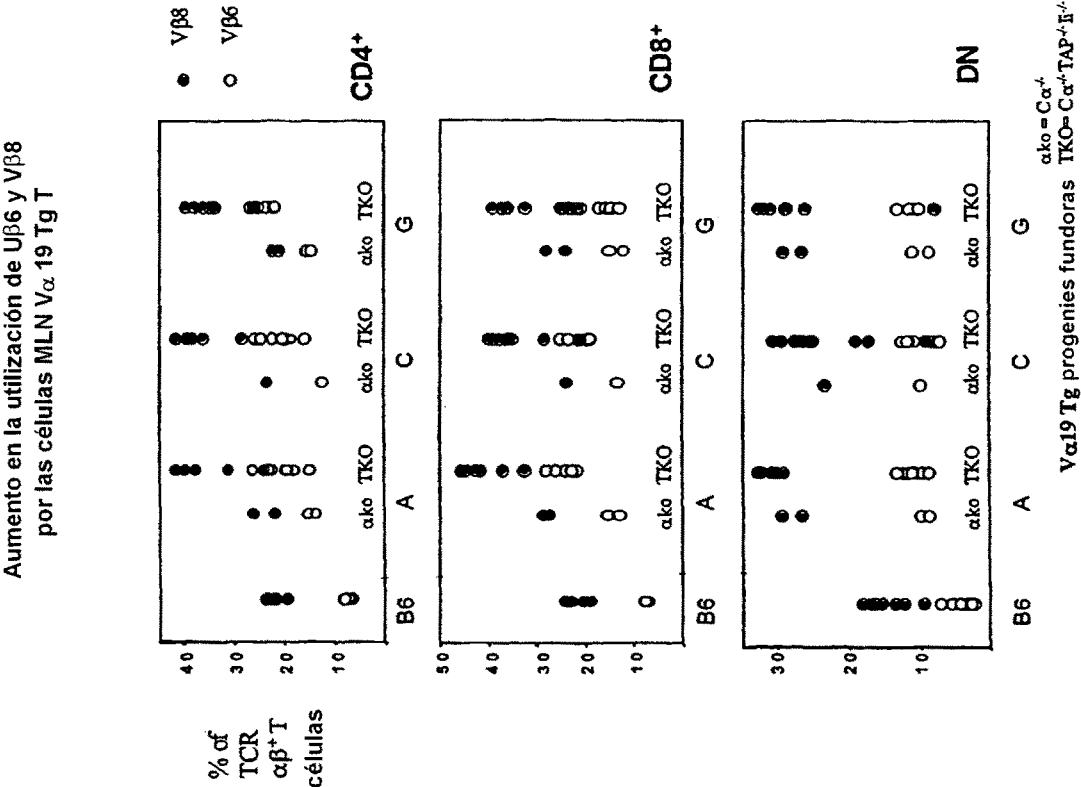


Fig. 3A

La selección de células $V\alpha 19^+ T$ requiere la expresión de su ligando en las células hemapotoéticas

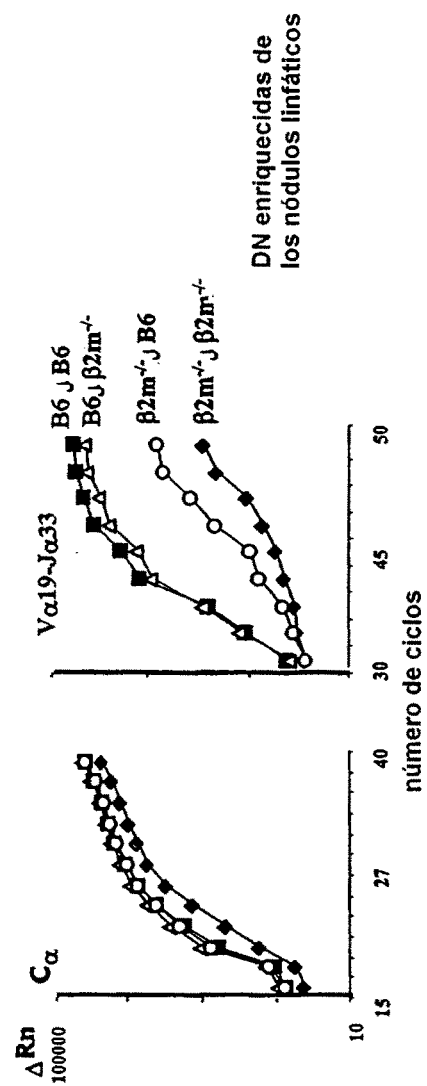
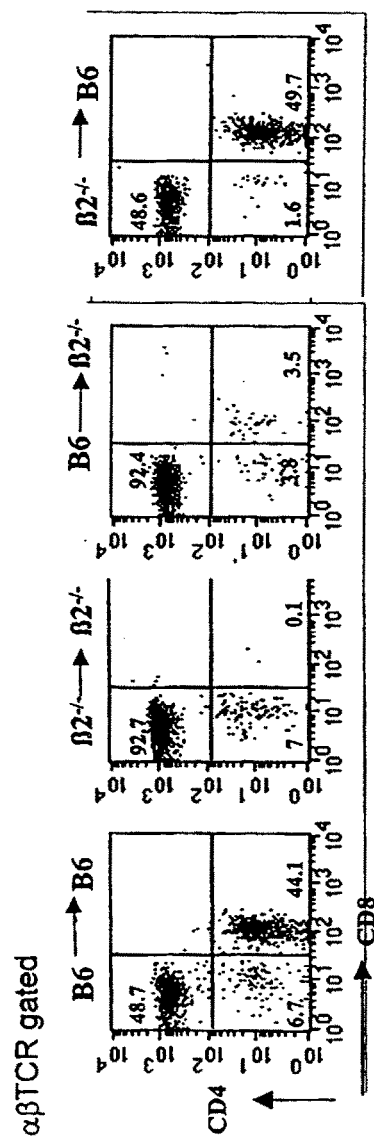


Fig. 3B

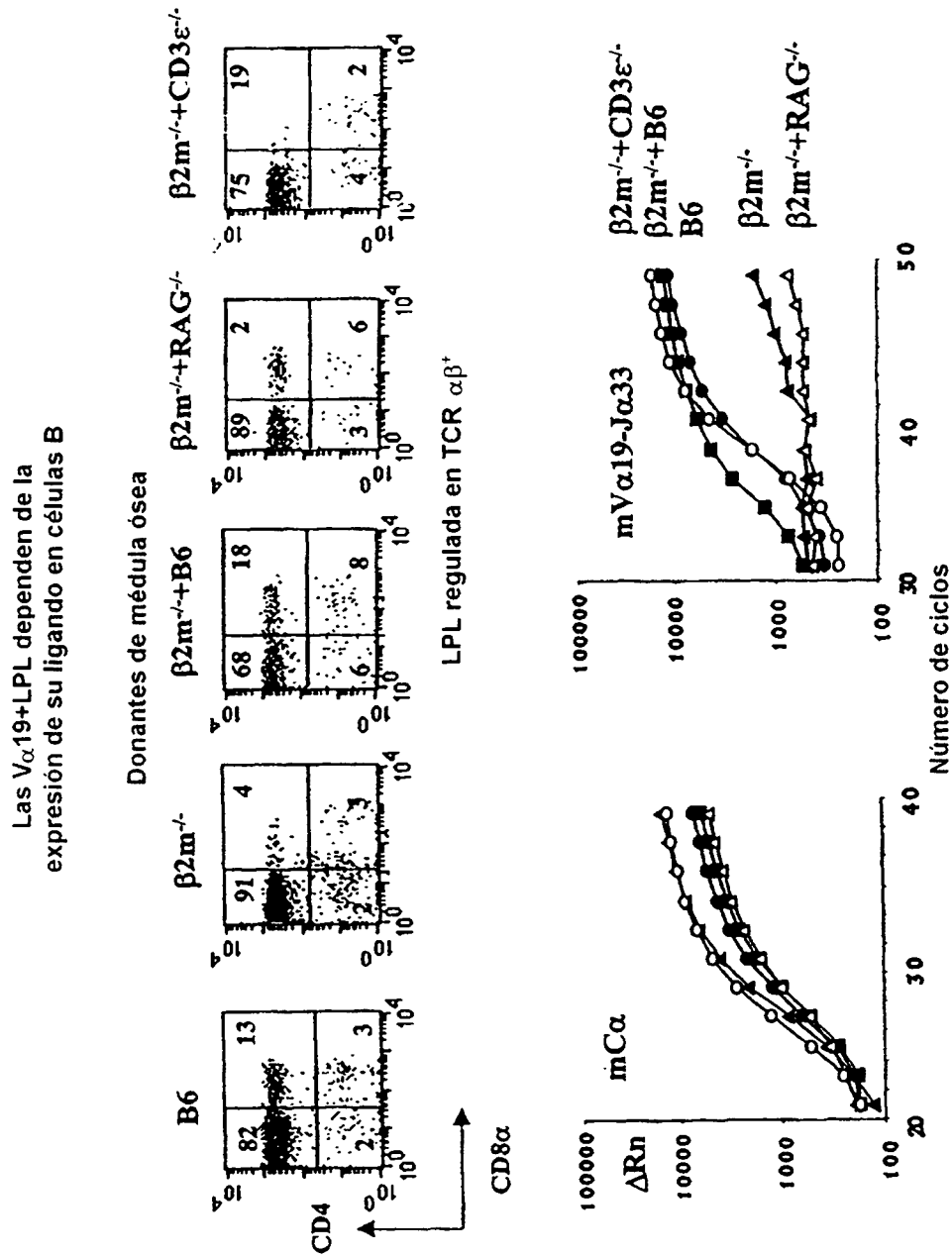


Fig. 3C y 3E

Disminución del número de $mV\alpha 19-J\alpha 33^+$
LPL y $hV\alpha 7.2-J\alpha 33^+$ PBL en ausencia de
células B

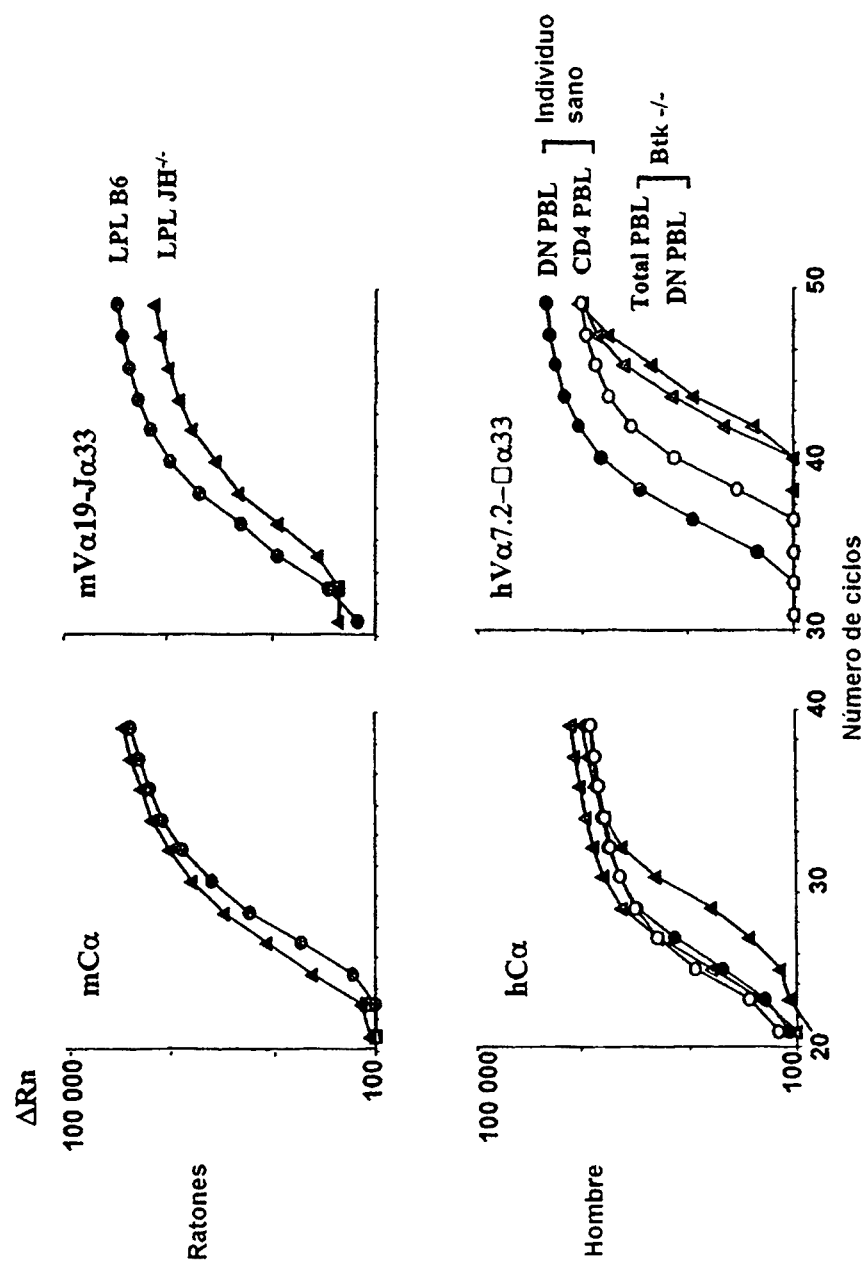


Fig. 3D

Presencia de $V\alpha 19J\alpha 33^+$ en ratones LPL $\mu MT^{-/-}$

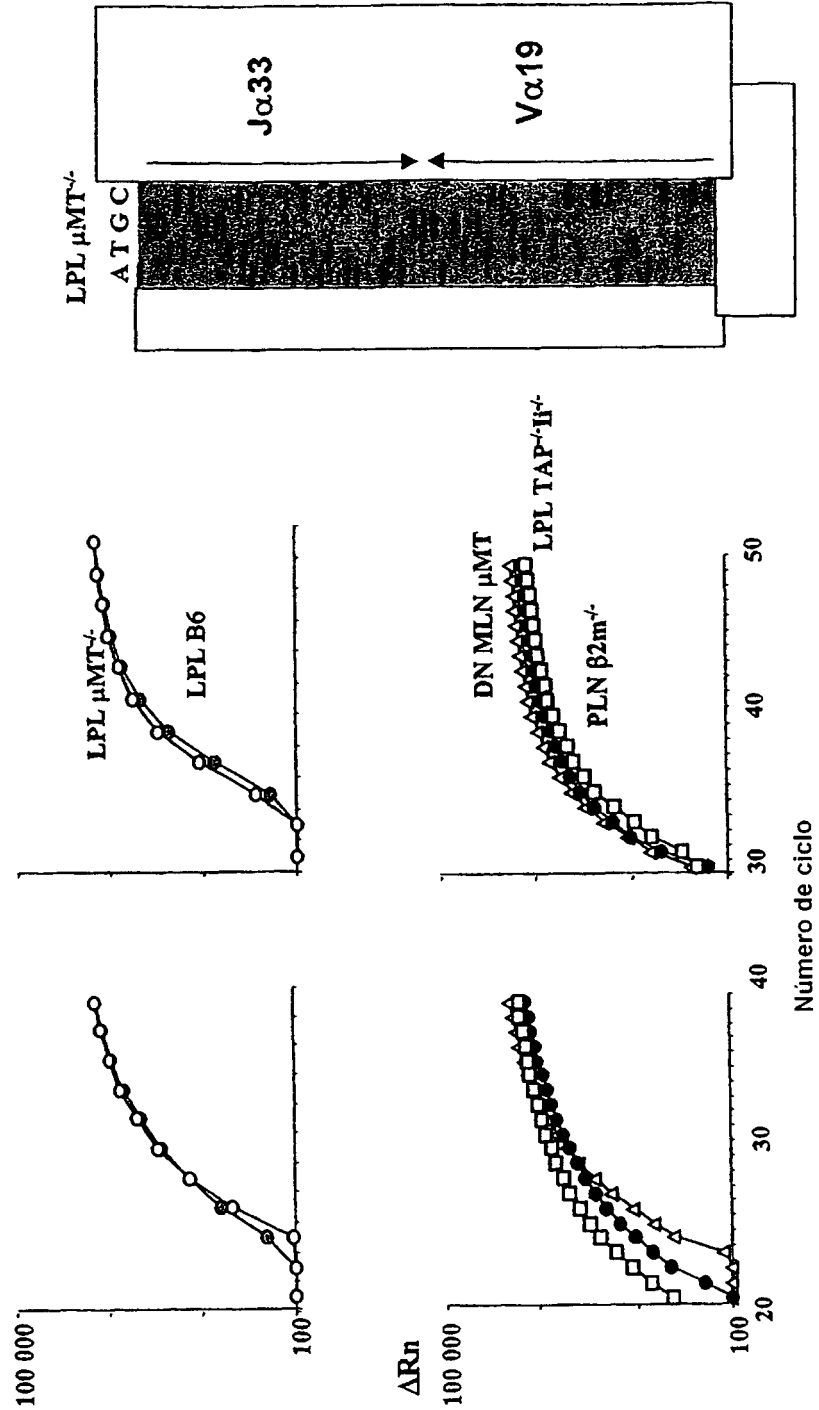


Figura 3F

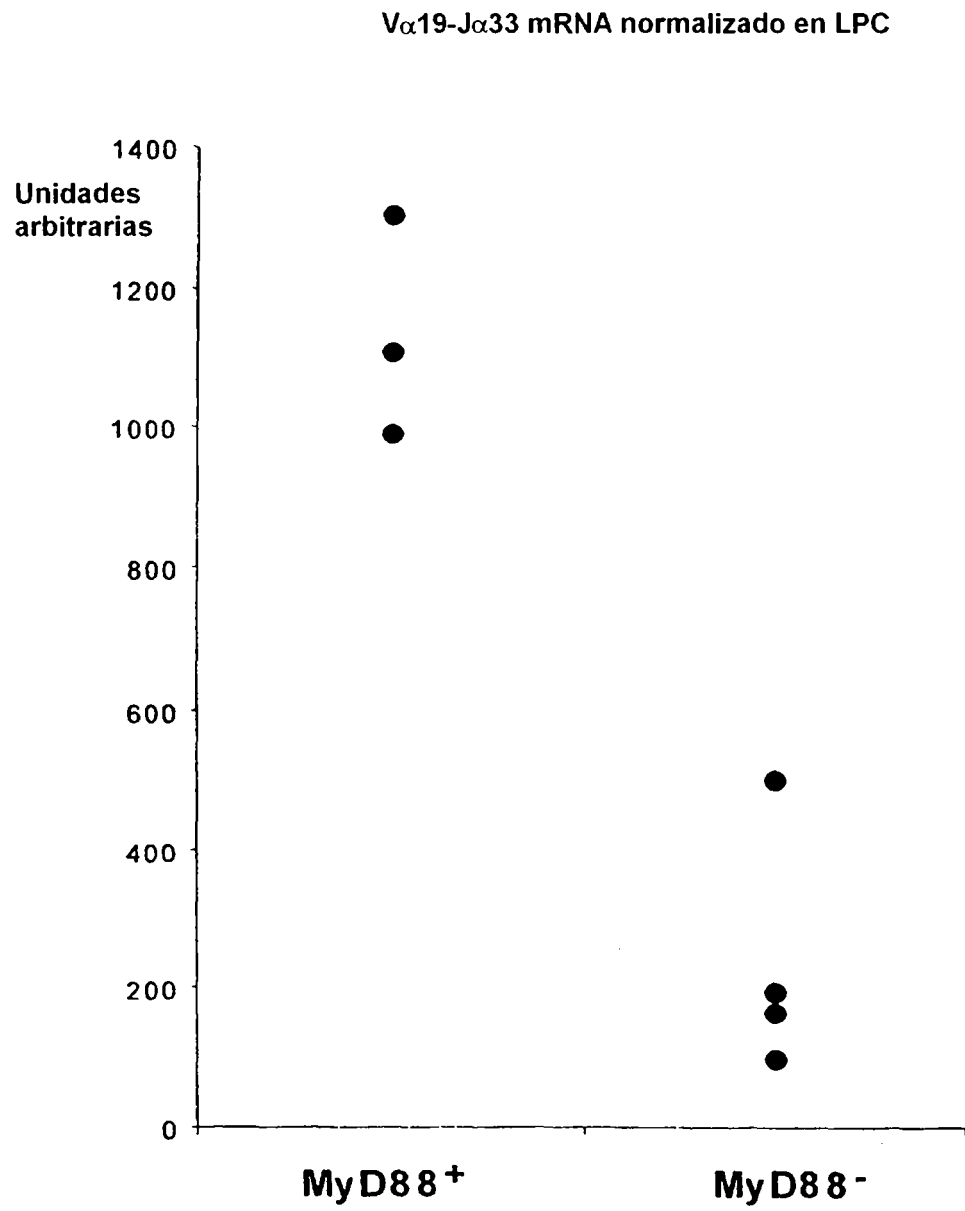


Figura 4A

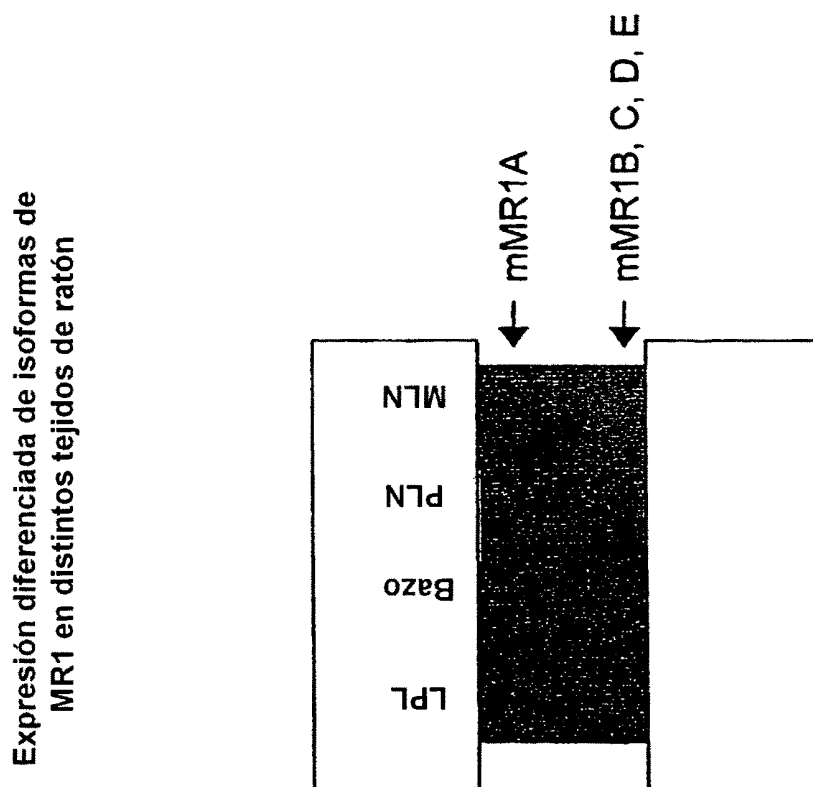


Figura 4B

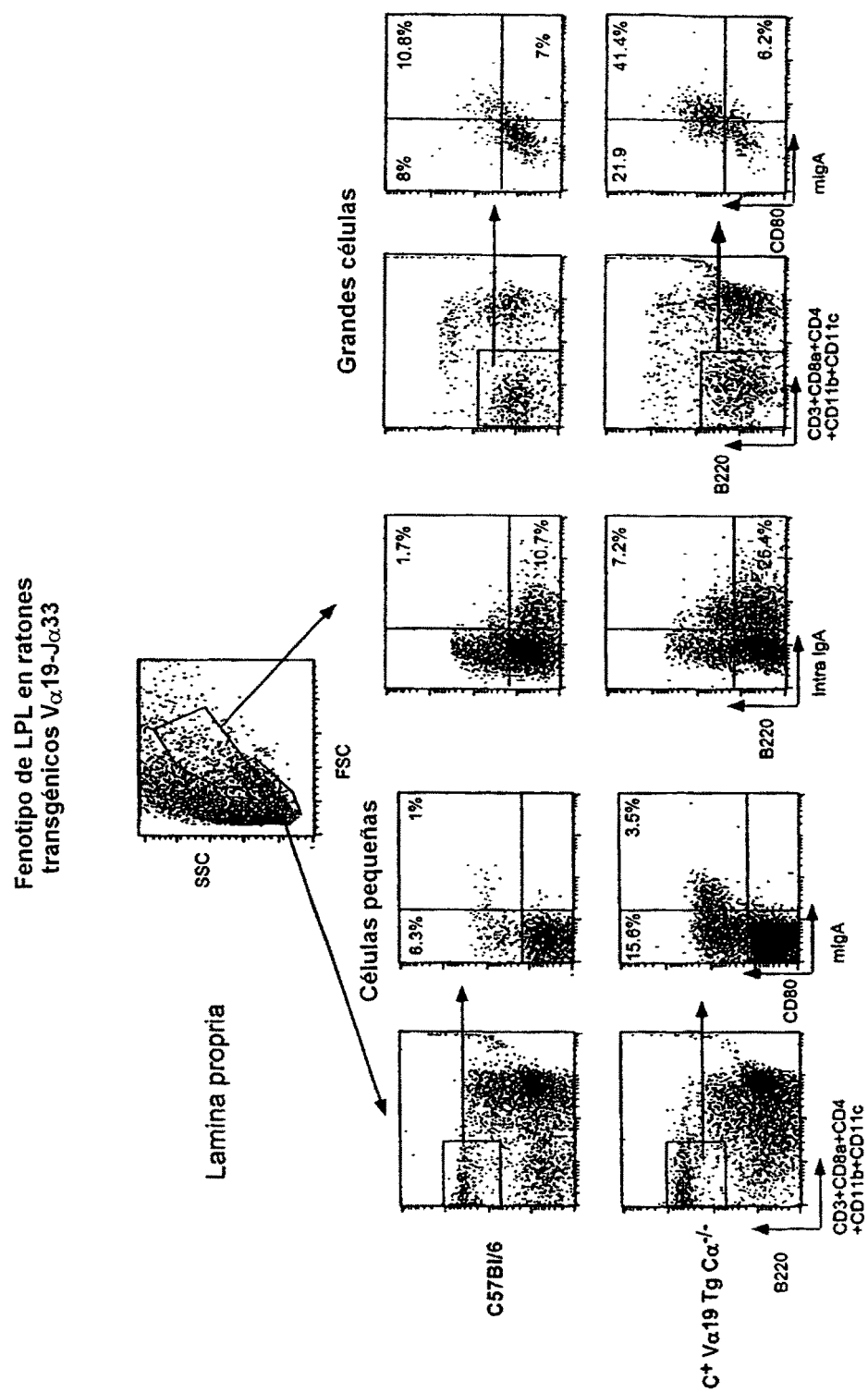


Figura 4C

Aumento de la expresión de IgA en ratones transgénicos Vα19-Jα33

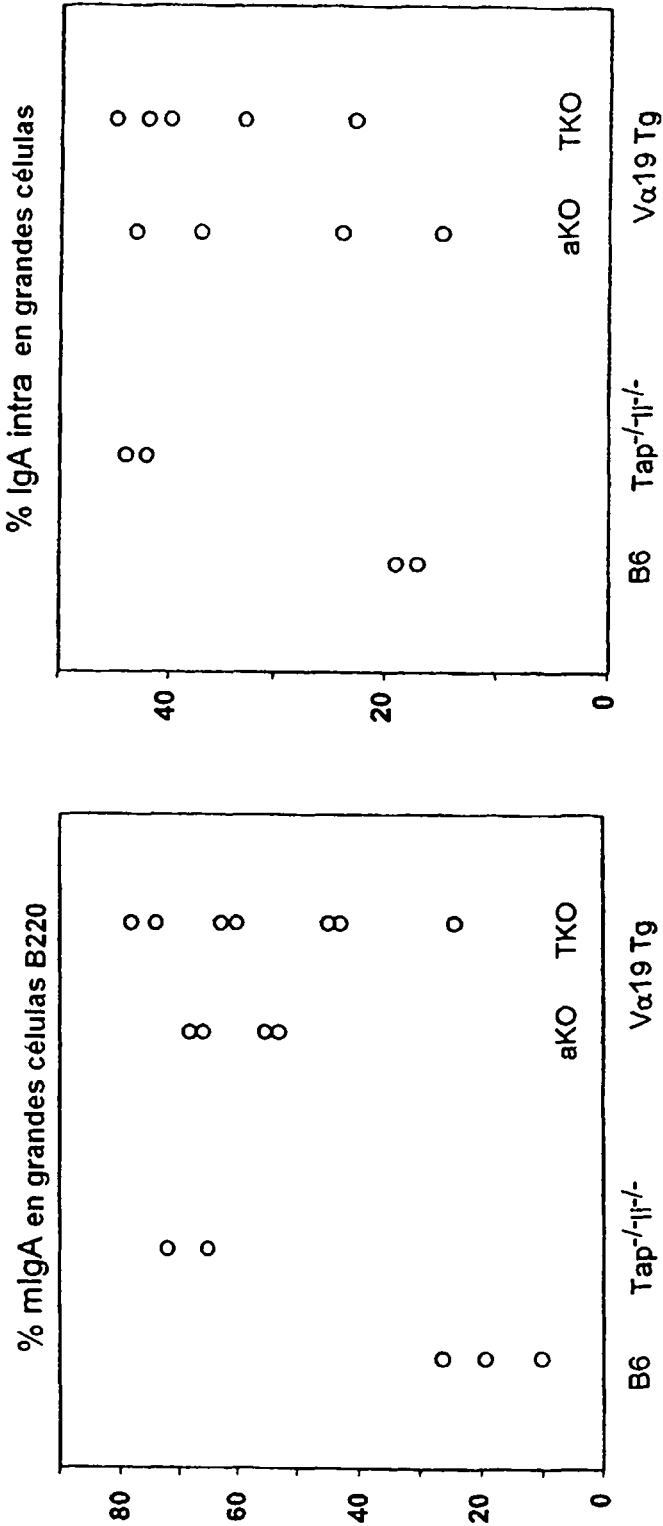


Figura 5A

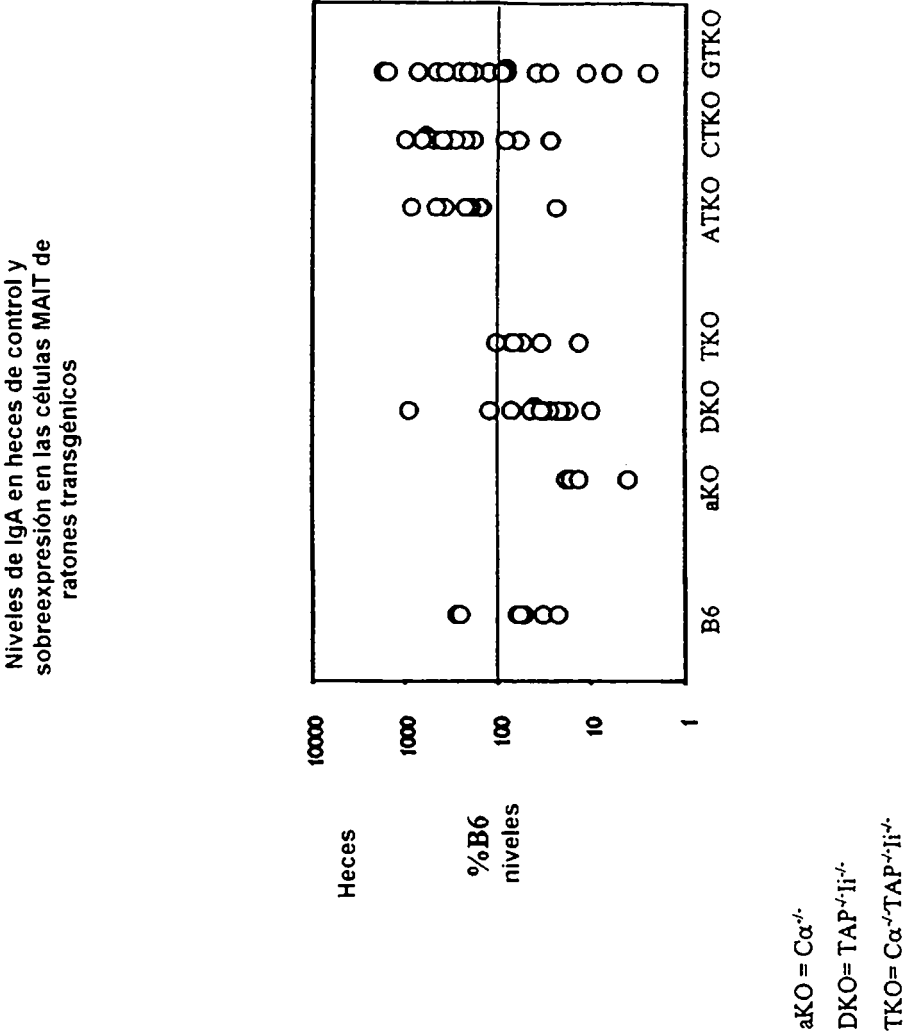


Figura 5B

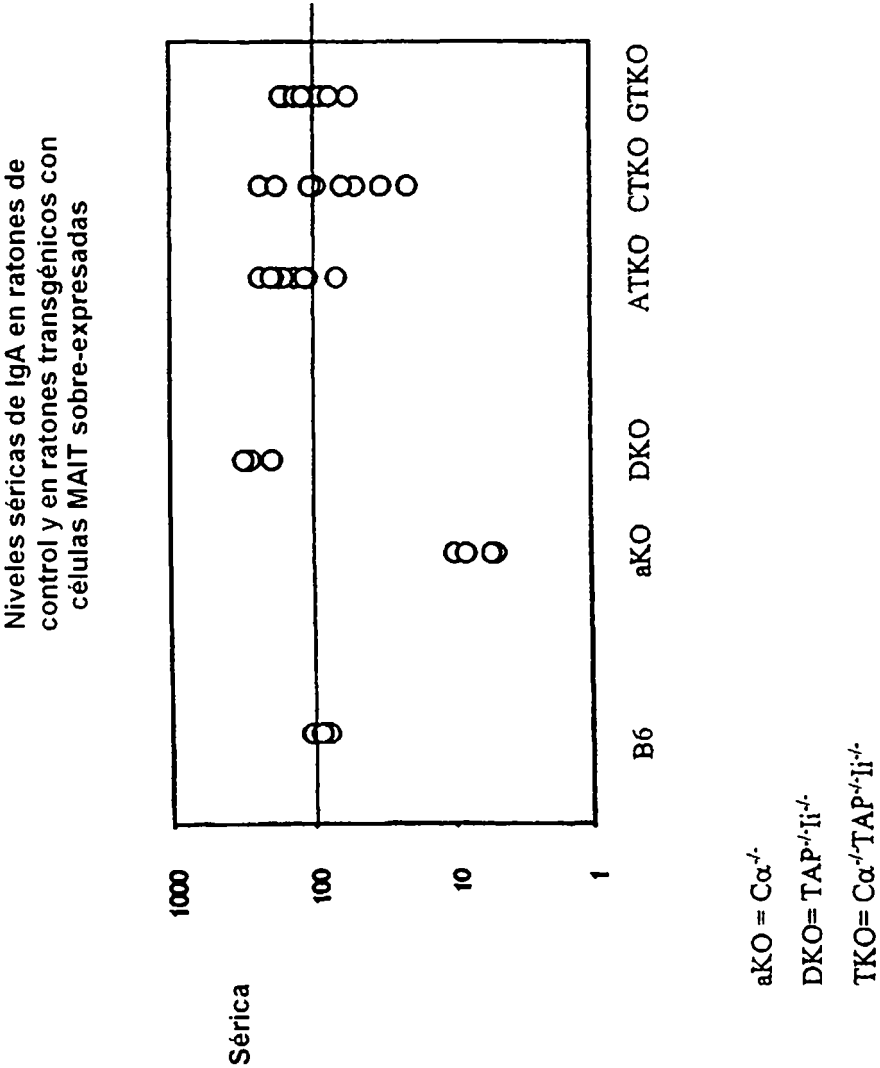


Figura 5C

Niveles séricos de Igs en ratones de control y en ratones transgénicos con células MALT sobreexpresadas

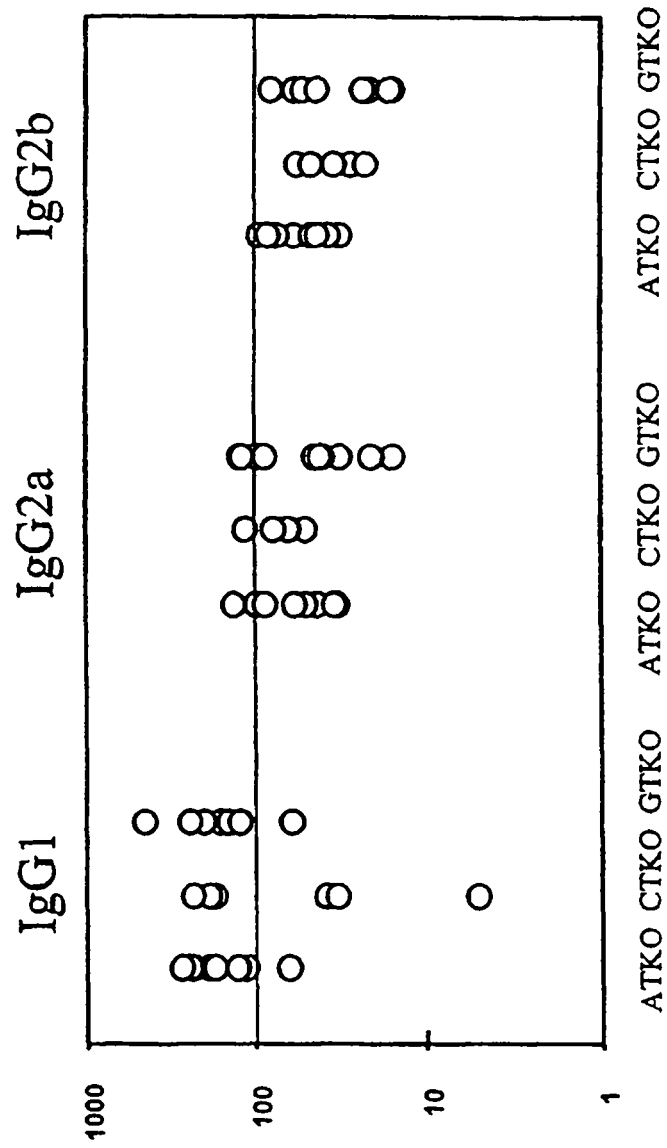


Figura 5D

Detección intracelular de la producción de IFN- γ mediante MLN de ratones B6 y transgénicos V α 19 después de la estimulación in vitro con PMA+ Ionomicina en presencia de monensina

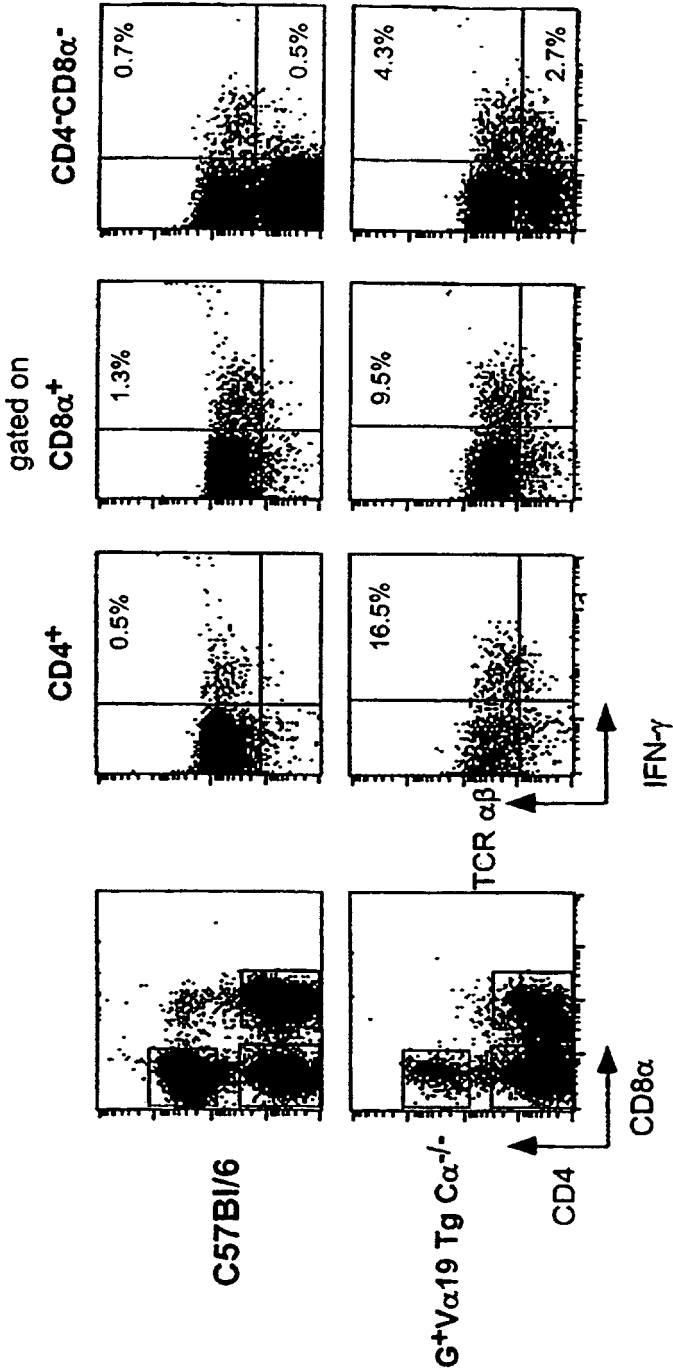


Figura 5E

Células $V\alpha 19$ Tg MLN T secretan $TGF\beta$
tras estimulación con PMA + ionomine

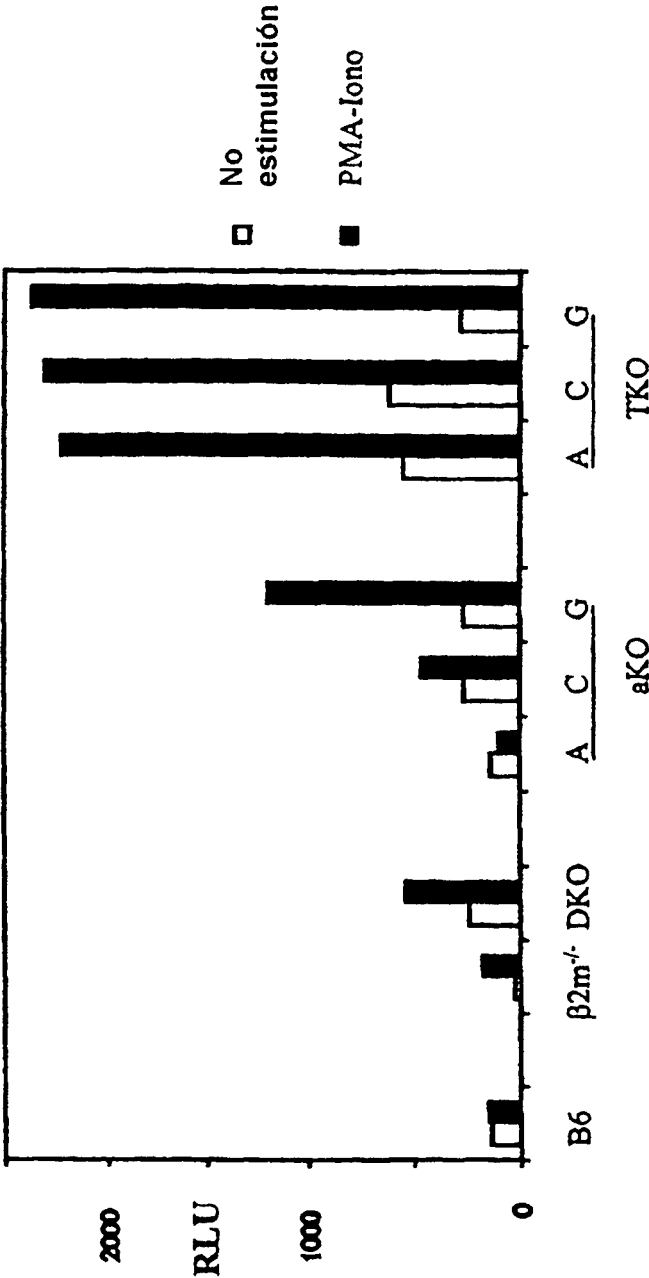


Figura 5F

Alta expresión de IFN γ mRNA en células LN mesentéricas de ratones transgénicos V α 19, después de estimulación

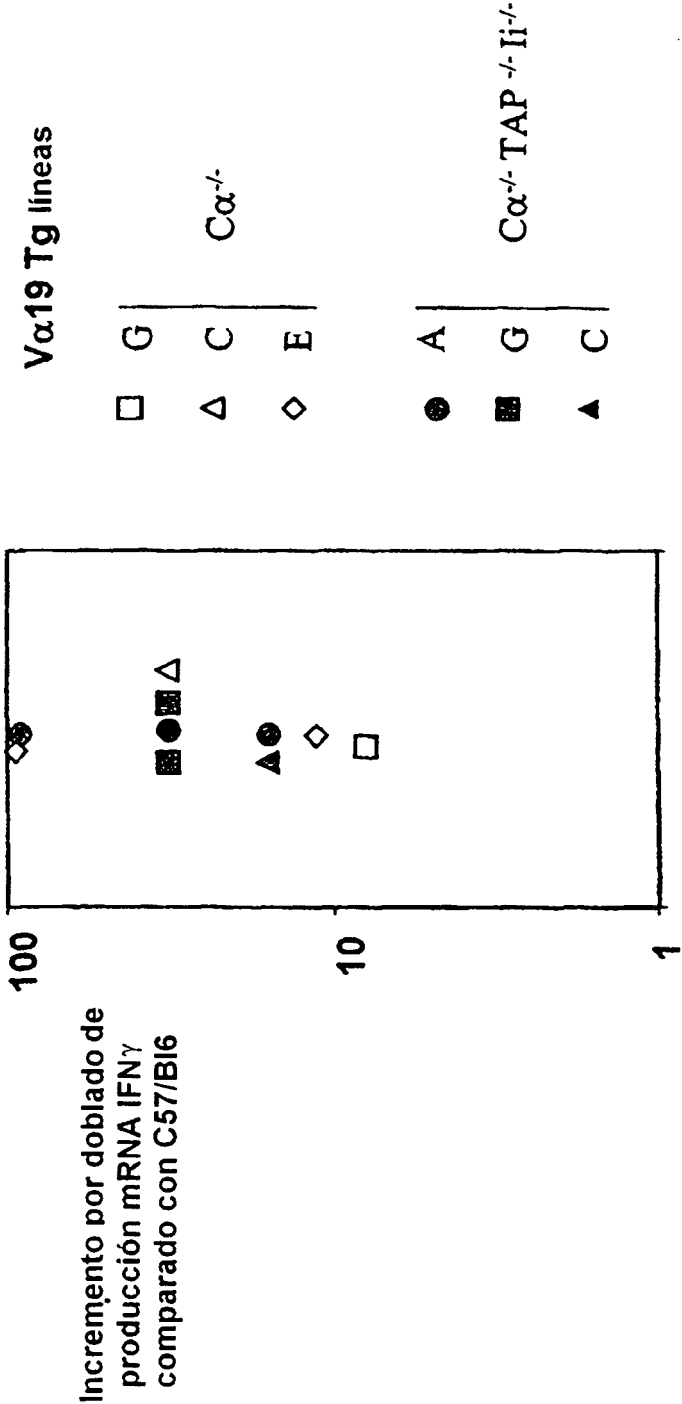


Figura 6A

Detección FACS de GFP en RBL y Hom2
transfectados con MR1A-GFP

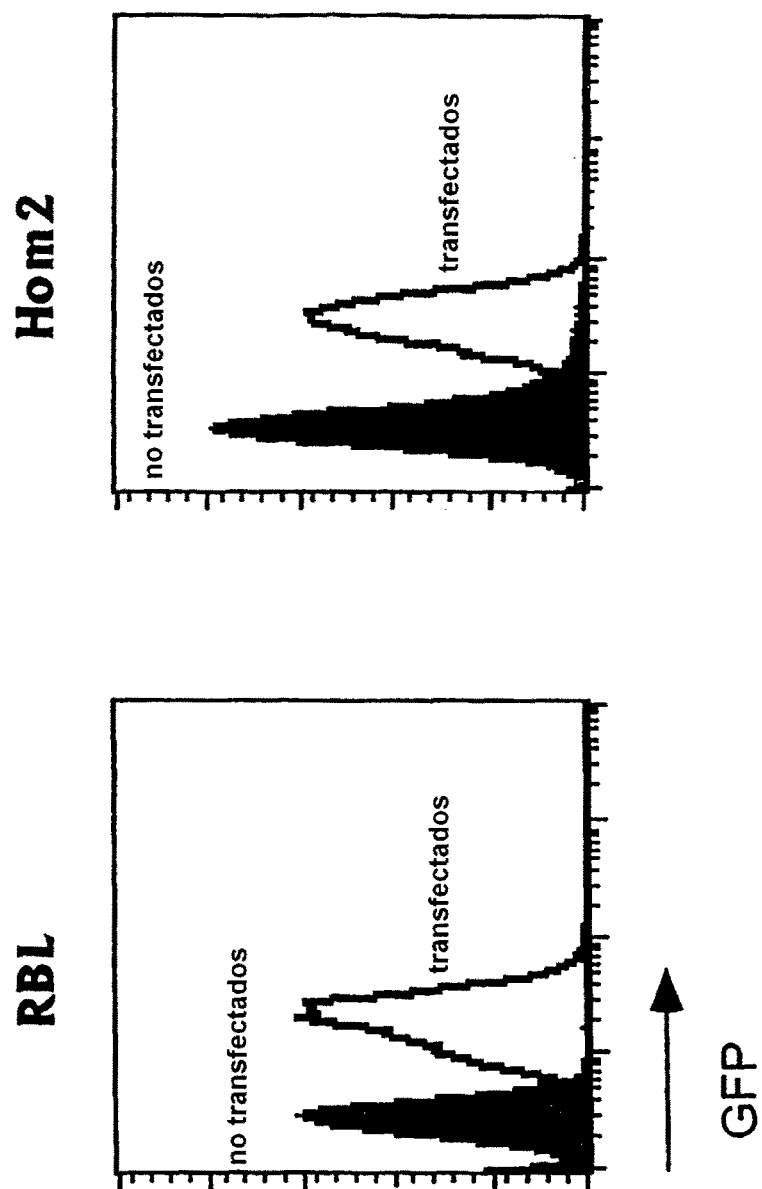


Figura 6B

Expresión de la membrana de mMR1A en
Hom2 y RBL transfectados con
mMR1A-GFP

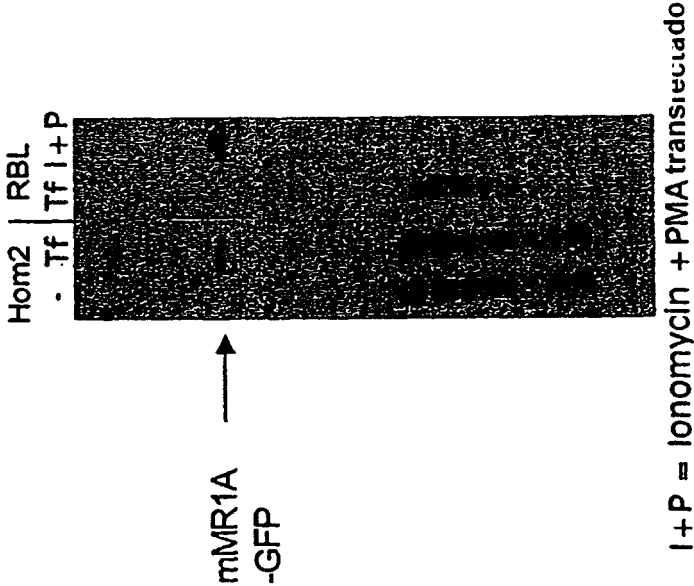


Figura 6C

Liberación de IL-2 (ensayo CT LL-2)
mediante hibridomas V α 19+T
estimulados progenies celulares
transfectados con mMR1A

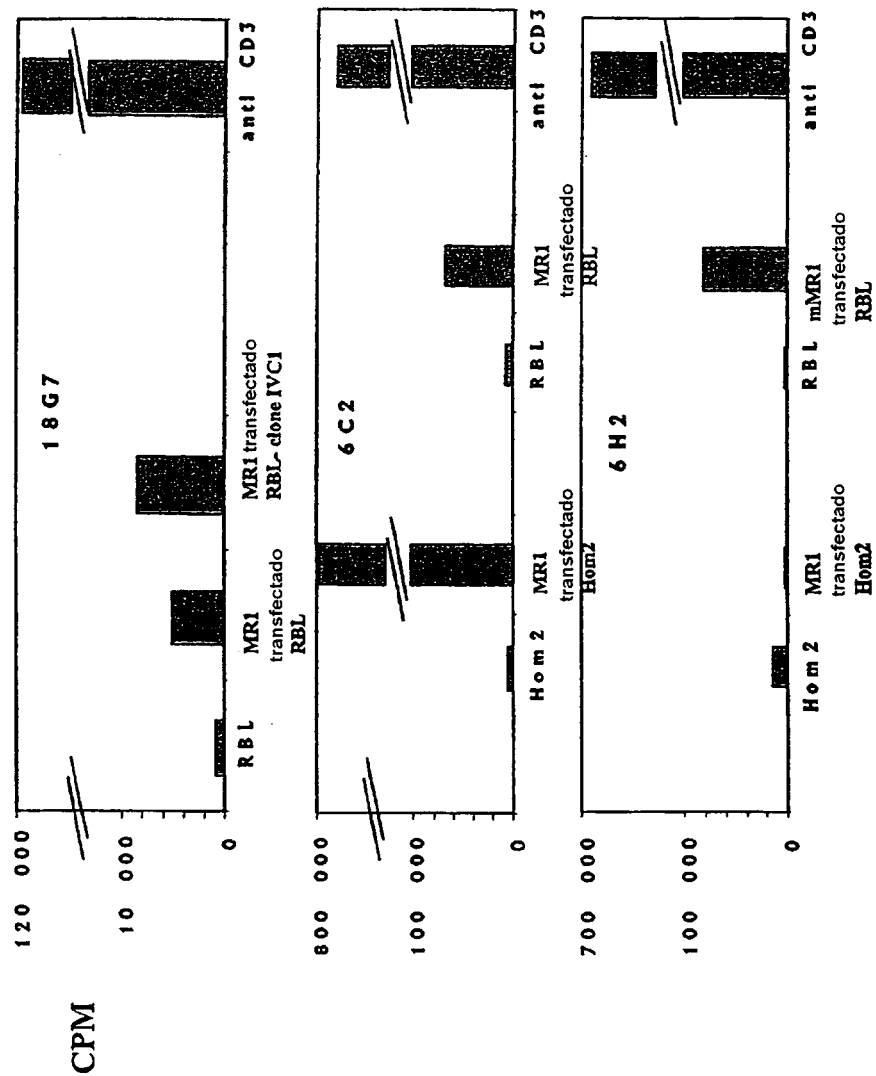


Figura 6D

Células Va19Tg MLN T secretan TGFβ tras estimulación Hom 2 transfectados con mMR1A

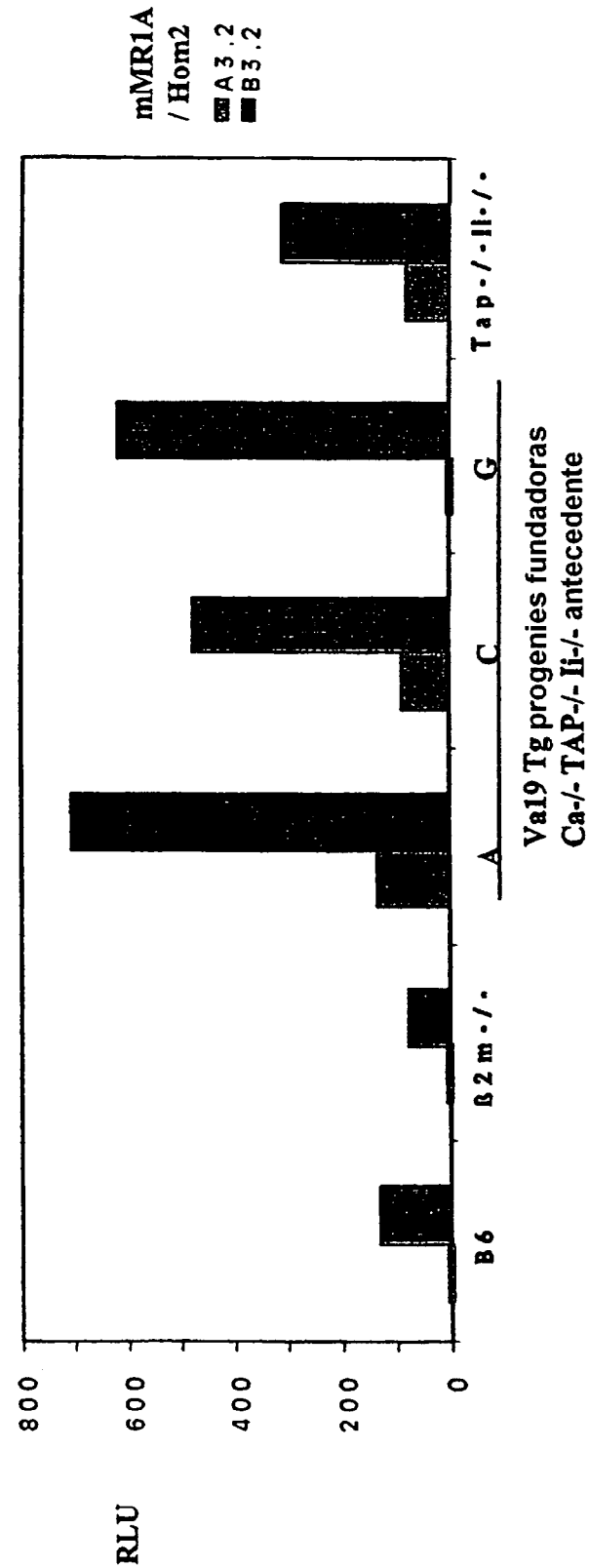


FIGURA 6E

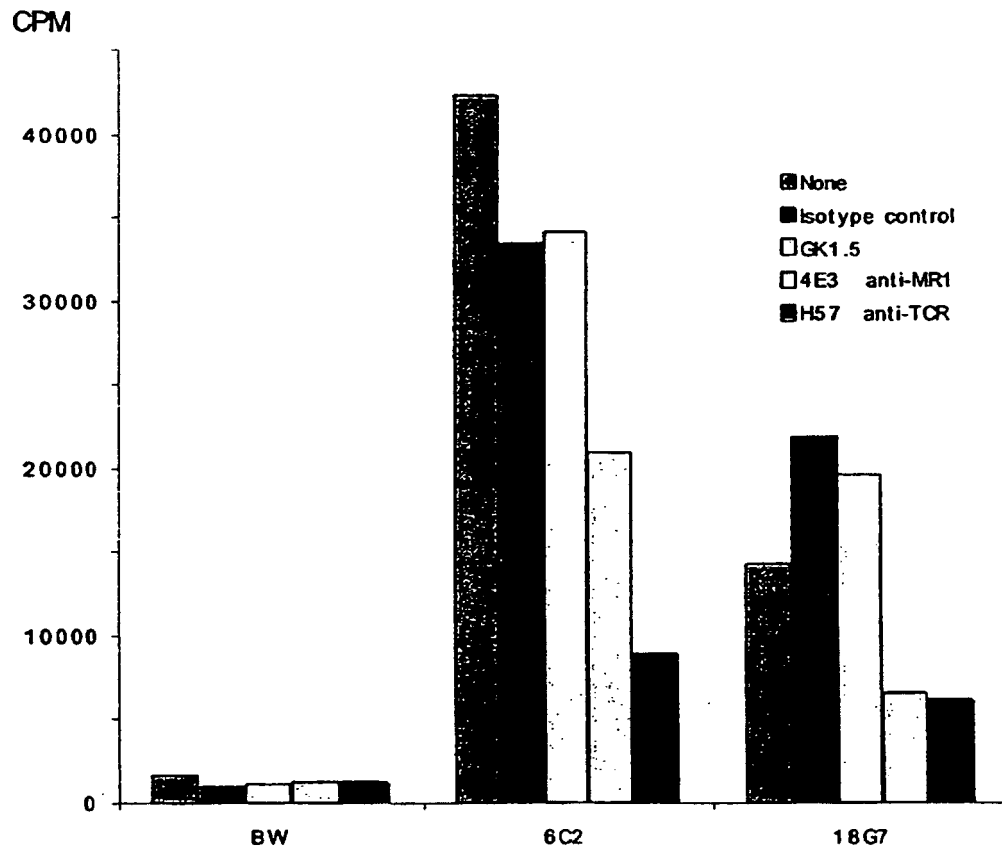


Fig. 7A

Estrategia diana MR1

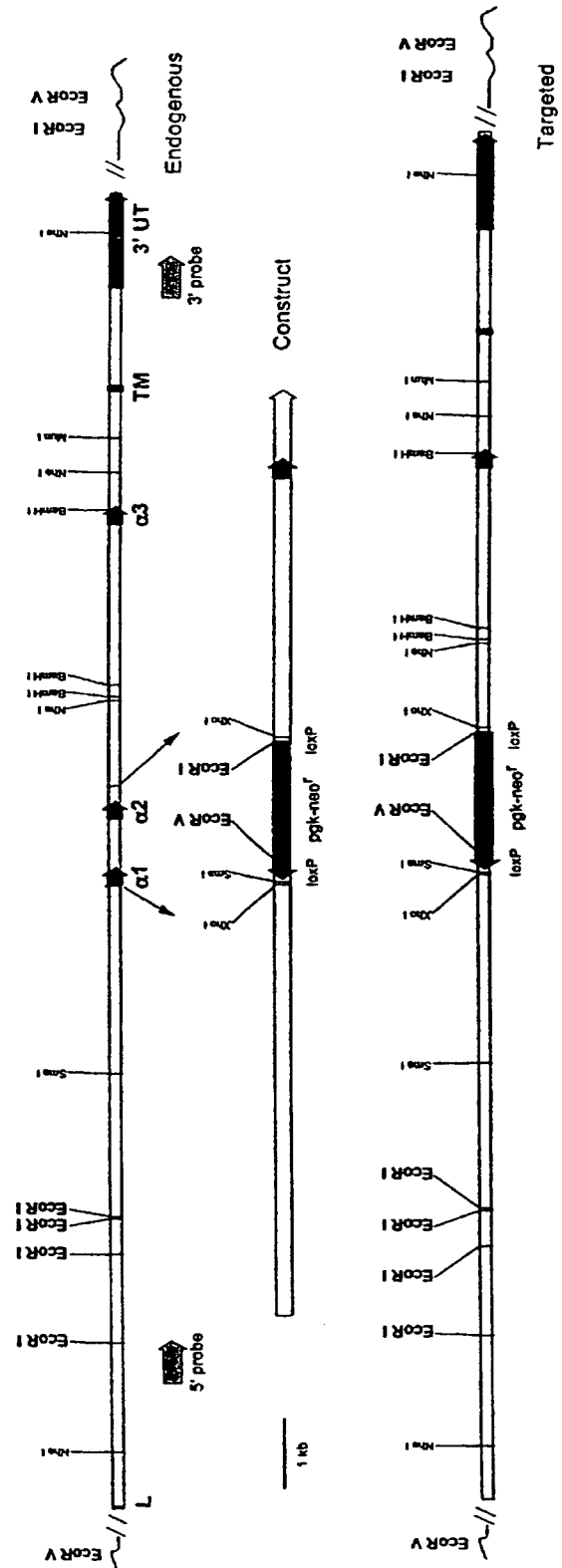


Figura 7B

Fenotipo normal de esplenocitos $MR1^{-/-}$

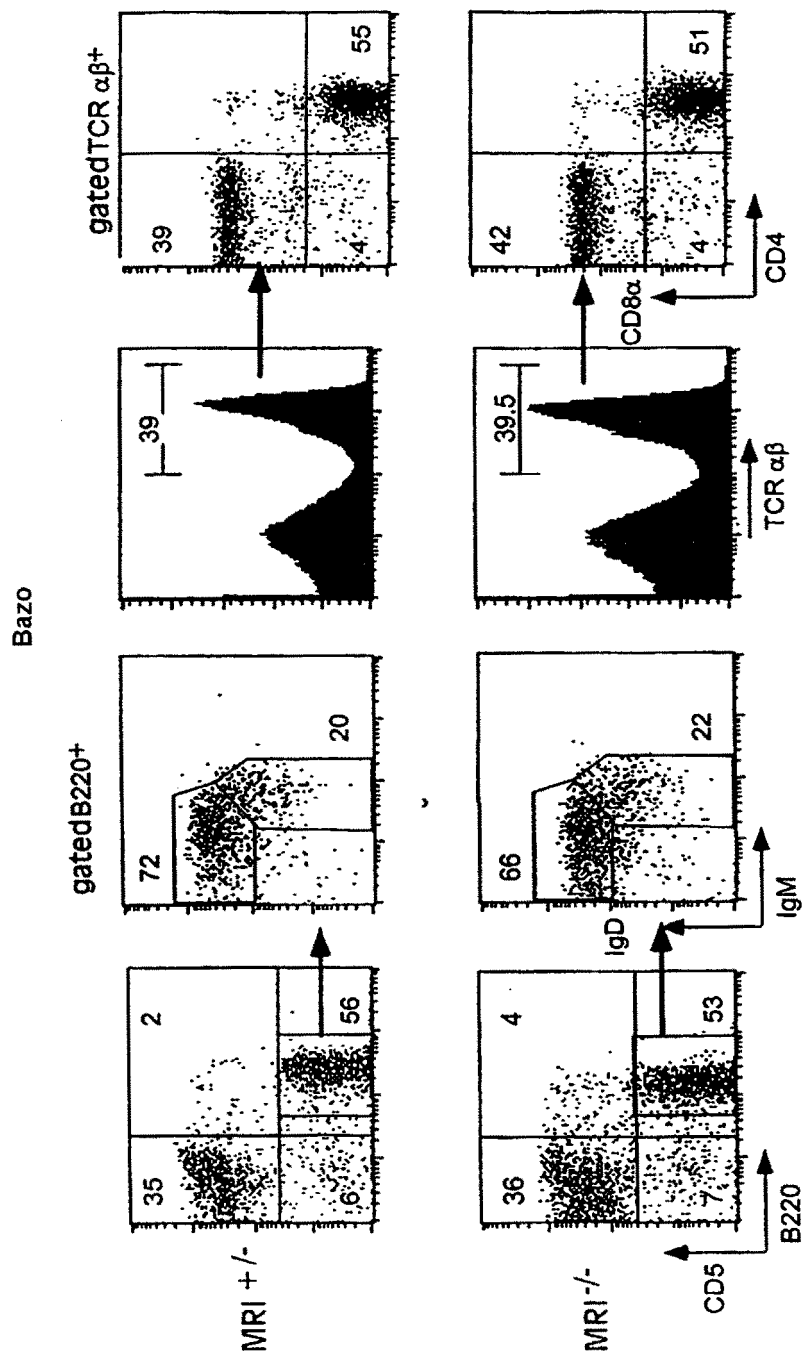
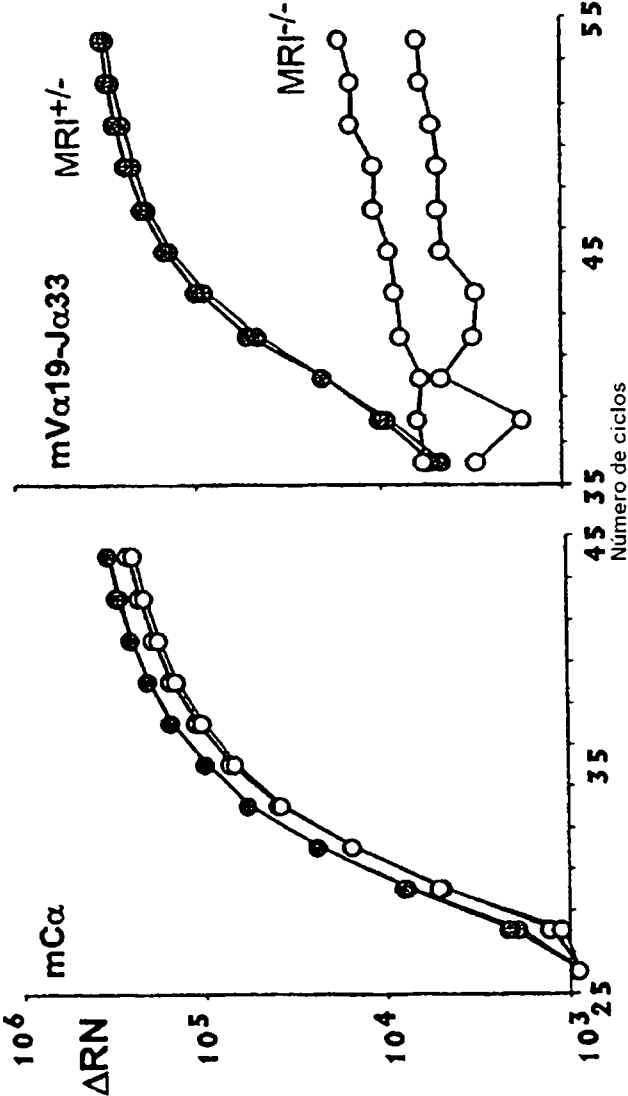


Figura 7C

Ausencia de transcritos mV 19-J 33 en
células DN TCR $\alpha\beta^+$ T aisladas de MLN
de ratones MRI KO



ES 2 312 782 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Institut Curie

<120> Subpoblación de células T que regula la inmunidad del intestino

<130> BO133WO

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 341

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Gly Glu Leu Met Ala Phe Leu Leu Pro Leu Ile Ile Val Leu Met
1 5 10 15

Val Lys His Ser Asp Ser Arg Thr His Ser Leu Arg Tyr Phe Arg Leu
20 25 30

Gly Val Ser Asp Pro Ile His Gly Val Pro Glu Phe Ile Ser Val Gly
35 40 45

Tyr Val Asp Ser His Pro Ile Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Arg Gln
50 55 60

Lys Glu Pro Arg Ala Pro Trp Met Ala Glu Asn Leu Ala Pro Asp His
65 70 75 80

Trp Glu Arg Tyr Thr Gln Leu Leu Arg Gly Trp Gln Gln Met Phe Lys
85 90 95

Val Glu Leu Lys Arg Leu Gln Arg His Tyr Asn His Ser Gly Ser His
100 105 110

Thr Tyr Gln Arg Met Ile Gly Cys Glu Leu Leu Glu Asp Gly Ser Thr
115 120 125

ES 2 312 782 T3

Thr Gly Phe Leu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Gln Asp Phe Leu Ile Phe
 130 135 140
 5 Asn Lys Asp Thr Leu Ser Trp Leu Ala Val Asp Asn Val Ala His Thr
 145 150 155 160
 10 Ile Lys Gln Ala Trp Glu Ala Asn Gln His Glu Leu Leu Tyr Gln Lys
 165 170 175
 15 Asn Trp Leu Glu Glu Glu Cys Ile Ala Trp Leu Lys Arg Phe Leu Glu
 180 185 190
 Tyr Gly Lys Asp Thr Leu Gln Arg Thr Glu Pro Pro Leu Val Arg Val
 195 200 205
 20 Asn Arg Lys Glu Thr Phe Pro Gly Val Thr Ala Leu Phe Cys Lys Ala
 210 215 220
 25 His Gly Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Tyr Met Thr Trp Met Lys Asn Gly
 225 230 235 240
 Glu Glu Ile Val Gln Glu Ile Asp Tyr Gly Asp Ile Leu Pro Ser Gly
 245 250 255
 30 Asp Gly Thr Tyr Gln Ala Trp Ala Ser Ile Glu Leu Asp Pro Gln Ser
 260 265 270
 35 Ser Asn Leu Tyr Ser Cys His Val Glu His Cys Gly Val His Met Val
 275 280 285
 Leu Gln Val Pro Gln Glu Ser Glu Thr Ile Pro Leu Val Met Lys Ala
 290 295 300
 40 Val Ser Gly Ser Ile Val Leu Val Ile Val Leu Ala Gly Val Gly Val
 305 310 315 320
 45 Leu Val Trp Arg Arg Arg Pro Arg Glu Gln Asn Gly Ala Ile Tyr Leu
 325 330 335

Pro Thr Pro Asp Arg
340

50

<210> 2

<211> 41

55 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 2

60

aagaaggaga tctgtgatgg tgctcctgtt acctctgctc g

41

<210> 3

65 <211> 41

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 312 782 T3

<400> 3

agagaaagaa ttcgagaggg agagctccc tcattcactt g

41

5

<210> 4

<211> 41

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

15 aaaaaatttc cgctagcggg atgggggaac tgatggcgtt c

41

<210> 5

<211> 41

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

25

ttttaaccc tcgagtcgat ctggtgttgg aaggtagatg g

41

30

35

40

45

50

55

60

65