

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 645**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01) A61P 37/00	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01) A61P 31/00	(2006.01)
C12N 5/20	(2006.01) A61P 11/06	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
G01N 33/577	(2006.01) A61P 15/00	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
A61K 47/48	(2006.01)	
A61K 51/10	(2006.01)	
A61K 35/14	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01946572 .3**
- 96 Fecha de presentación: **19.06.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1297017**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Composiciones y métodos de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para subpoblaciones de linfocitos T**

30 Prioridad:
19.06.2000 US 212466 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.10.2012

73 Titular/es:
BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER (33.3%)
330 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US;
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (33.3%) y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (33.3%)

72 Inventor/es:
EXLEY, MARK, A.;
WILSON, SAMUEL, B. y
BALK, STEVEN, P.

74 Agente/Representante:
PÉREZ BARQUÍN, Eliana

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).

ES 2 389 645 T3

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para subpoblaciones de linfocitos T

5 **Antecedentes de la invención**

La modulación del sistema inmunitario es deseable para tratar una variedad de enfermedades y trastornos incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, alergias, asma, afecciones inflamatorias, aborto espontáneo, embarazo, enfermedad de injerto contra huésped y cánceres.

10 Los linfocitos T son linfocitos que participan en múltiples reacciones inmunitarias mediadas por células, tales como el reconocimiento y la destrucción de células infectadas o cancerosas. Subgrupos de linfocitos T, tales como linfocitos T supresores, citotóxicos y auxiliares, median en diferentes funciones inmunológicas. Los linfocitos T supresores son los responsables de cortar la respuesta inmunitaria después de que se elimine una infección. Los linfocitos T citolíticos o
15 "citotóxicos naturales" destruyen células infectadas o cancerosas. Los linfocitos T auxiliares producen citocinas que modulan la actividad de los linfocitos T citotóxicos y/o de los linfocitos B productores de anticuerpos.

Un subgrupo de linfocitos T auxiliares, las células Th1, secretan interleucina-1 (IL-1), IL 2, interferón gamma (TNF- γ), e IL-2 que potencian las respuestas mediadas por células, tales como la actividad de linfocitos T citotóxicos e inhiben tanto la actividad de los linfocitos T auxiliares Th2 como la inmunidad humoral mediada por anticuerpos solubles. Debido a su capacidad para destruir células presentadoras de antígeno y su actividad efectora mediada por citocinas, las células Th1 están asociadas a reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado vigorosas. Se cree que las células Th2, el otro subgrupo de linfocitos T auxiliares, inhiben las respuestas mediadas por células y potencian la respuesta humoral. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, que activan el desarrollo de linfocitos B y la producción de anticuerpos. Los linfocitos T también pueden participar en las respuestas de desviación inmunitarias, tales como la supresión de una respuesta inmunitaria en curso que pueda implicar la secreción de TGF- β o citocinas IL-10 (Sonoda *et al*, J. Ex. Med. 190:1215-1255, 1999; Streilein *et al.*, Hum. Immunol. 52:138-143, 1997; Hong *et al*, J. Ex. Med. 190, 1197-1200, 1999; Streilein *et al*, J. Immunol. 158:3557-3560, 1997).

30 Para reconocer un antígeno particular unido a una célula presentadora de antígenos, la mayoría de los linfocitos expresan un receptor de linfocitos altamente específicos (TCR) sobre su superficie celular. Las cadenas de los receptores de linfocitos T más comunes se llaman α y β . Un segundo receptor de linfocitos T, que se encuentra en una subpoblación menor de linfocitos T, está compuesto por cadenas γ y δ . Los genes para las cadenas α , β , γ y δ de los receptores de linfocitos T tienen organizaciones similares a las de los genes de anticuerpo: existen colecciones de regiones V, D y J a partir de las que se unen los miembros para formar genes enteros.
35

En contraste con la mayoría de las subpoblaciones de linfocitos T, que tienen diversas secuencias para su cadena TCR- α , los linfocitos T invariantes tienen una cadena TCR- α invariante altamente conservada, V α 24-J α Q en seres humanos y V α 14-J α 281 en ratones, que se empareja preferencialmente con V β 11 humana o V β 8 murina. Estas células son CD4⁺CD8⁻ o bien CD4⁻CD8⁺. Se supone que este TCR invariante permite que los linfocitos T invariantes reconozcan antígenos lípidos derivados de patógenos o endógenos presentados por las proteínas de tipo MHC de clase I no polimórficas, denominadas miembros de la familia CD1. Los seres humanos tienen cuatro proteínas CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, y CD1d), pero los ratones sólo tienen un gen CD1d duplicado que es altamente homólogo a la CD1d humana. La CD1d humana se expresa en niveles altos por los timocitos, en niveles más bajos por linfocitos B y monocitos, por algunas células fuera de los linajes linfático y mielóide.
40
45

Muchos linfocitos T invariantes se distinguen por la expresión de varias proteínas de superficie celular halladas en gran medida en los linfocitos citolíticos naturales (NK), incluyendo CD161 (NKR-P1A) en seres humanos, y una lectina de tipo C de superficie celular, NKR-P1C (NK1), en ratones. Esa subpoblación de linfocitos T, denominado en el presente documentos como "linfocitos T NK invariantes", representa una fracción principal de los linfocitos T maduros en el timo, la subpoblación principal de linfocitos T en el hígado de ratón, y hasta un 5 % de linfocitos T esplénicos en algunas cepas de ratón.
50

Los linfocitos T invariantes murinos y humanos producen grandes cantidades de las citocinas inmunorreguladoras IL-4 (un efector de Th2) e IFN- γ (un efector de Th1) *in vivo* en respuesta a un anticuerpo anti-CD3 o CD1d. Estas citocinas permiten que las células participen en ambas respuestas Th2 y Th1. El papel de los linfocitos T invariantes en el aumento de la respuesta de Th2, que parece ser protectora en algunas enfermedades autoinmunitarias, está apoyado además por la presencia de defectos en los linfocitos T invariantes en una serie de modelos humanos y murinos de enfermedades autoinmunitarias, incluidos diabetes de tipo 1. Por tanto, las alteraciones en el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 inducidas por linfocitos T invariantes pueden desempeñar un papel en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias.
55
60

Los linfocitos T invariantes también pueden promover las rápidas respuestas inmunitarias de Th1 y las respuestas antitumorales. Los linfocitos T invariantes, que comprenden una fracción principal de los linfocitos T en el hígado murino, se pueden estimular por IL-12 para llegar a ser linfocitos T citotóxicos activos y proteger contra metástasis
65

hepática en modelos tumorales. Esta conclusión se confirmó genéticamente a través de la generación de ratones inactivados en J α 281, que no expresan el TCR V α 14-J α 281 invariante. Estos ratones tenían números notablemente disminuidos de linfocitos T invariantes y no pudieron mediar el rechazo de tumor inducido por IL-12. Otros estudios mostraron que la administración de IL-12 dejó de inducir una respuesta de IFN- γ temprana en el bazo e hígado de ratones inactivados en CD1d, que son deficientes en linfocitos T invariantes. Además, los datos de pacientes humanos muestran menores linfocitos T NK invariantes y respuestas de tipo Th1 reducidas en pacientes con cáncer avanzado. La respuesta antitumoral de linfocitos T invariantes activados se pudo mediar parcialmente por su citotoxicidad específica de CD1d y toxicidad de tipo célula NK/LAK. Otras funciones reguladoras de linfocitos T invariantes, posiblemente a través de la producción de citocinas o interacciones con células presentadoras de antígenos (CPA), también pueden desempeñar papeles importantes en respuestas inmunitarias antitumorales.

Los linfocitos T invariantes también pueden tener un papel en la patogénesis del aborto espontáneo. La estimulación de linfocitos T invariantes deciduals en ratones por administración de un ligando para linfocitos T invariantes provocó aborto en ratones gestantes. Se requirió la destrucción dependiente de perforina y la producción de IFN- γ y del factor de necrosis tumoral α por los linfocitos T invariantes para esta inducción de aborto.

En contraste con la sangre periférica humana en la que los linfocitos T invariantes son la subpoblación reactiva de CD1d principal, la médula ósea humana y de ratón y el hígado humano tienen poblaciones de Linfocitos T dominados por linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d usando diversos TCR que también pueden producir una gran cantidad de IL-4 y IFN- γ . Estos linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d pueden ser linfocitos T NK o no NK, y funcionan de forma similar a los linfocitos T invariantes reactivos para CD1d. Los linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d en la médula ósea pueden tener un papel en la supresión de la enfermedad de injerto contra huésped, y ambas poblaciones pueden potenciar las respuestas de leucemia contra injerto. En el hígado, estos linfocitos T pueden proteger contra infecciones, tales como infecciones por Hepatitis C, pero también pueden provocar daños debido a su respuesta a Th1.

Además, se descubrió que los linfocitos T NK reactivos para CD1d son decisivos para la tolerancia inmunitaria a antígenos en la cámara anterior del ojo, un sitio privilegiado inmunitario (Sonoda *et al.*, *supra*). Estos mecanismos también pueden ser importantes en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

Los glucosil-fosfatidilinositoles de parásitos derivados de Plasmodium, Trypanosoma o Leishmania han mostrado recientemente que estimulan los linfocitos T NK V α 14 invariantes reactivos para CD1d. Además, un lípido de α -galactosilceramida (α -GalCer), que se aisló a partir de esponja marina en un examen para determinar la actividad antitumoral, es un antígeno presentador de CD1d. α -GalCer es un ejemplo de un agente que se puede usar para expandir linfocitos T invariantes reactivos para CD1d humanos del cordón umbilical o muestras de sangre periférica que en primer lugar se enriquecen por los linfocitos T invariantes por purificación usando un anticuerpo anti-V α 24. Las células V α 24⁺ enriquecidas se cocultivan en presencia de α -GalCer y células presentadoras de antígeno purificadas (CPA). Sin embargo, sería deseable en un marco clínico usar un método mejorado de expansión de los linfocitos T invariantes que no requiera un protocolo de complejo de dos etapas o la presencia de células presentadora de antígeno, lo que puede no funcionar bajo determinadas condiciones.

EXLEY MARK *ET AL.*, 1998, JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 188(5): 867-876 y NICOL A *ET AL.*, 2000, IMMUNOLOGY 99(2): 229-234 describen anticuerpos de unión a V α 24.

El documento WO 99/34209 se refiere a métodos que se pueden usar para diagnosticar si un individuo tiene, o bien es probable que desarrolle, una enfermedad autoinmunitaria. Los métodos se basan en la determinación del nivel de linfocitos T CD4⁺CD8⁻ V α 24J α Q⁺ presentes en el individuo que se está sometiendo a prueba o en el patrón de secreción de citocinas demostrado por estas células. Además, se da a conocer un método terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria que se basa en la expansión específica de la población de linfocitos T CD4⁺CD8⁻ V α 24J α Q⁺.

Existe una necesidad de controlar y alterar específicamente la población de linfocitos T y, más específicamente, subpoblaciones específicas de linfocitos T en mamíferos para la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como enfermedades autoinmunitarias, infecciones, alergias, asma, afecciones inflamatorias, aborto espontáneo, embarazo, enfermedad de injerto contra huésped y cánceres.

Sumario de la invención

Se ha descubierto y llevado a la práctica un método para preparar anticuerpos que permite la identificación y expansión o activación selectiva de subgrupos de linfocitos T específicos. En particular, la invención proporciona anticuerpos que reconocen y expanden linfocitos T que tienen secuencias de TCR específicas. Estos anticuerpos se pueden usar para diagnosticar, prevenir, estabilizar y tratar una variedad de enfermedades, incluyendo cánceres y enfermedades autoinmunitarias.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo purificado, o un fragmento o derivado del

mismo, en el que dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo:

- reconoce y se une al bucle CDR3 de un receptor de antígeno de linfocitos T invariantes (TCR),

5 - (i) se une y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de: linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$, y

- no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas;

10 en el que dicho derivado es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado químicamente, a través de tecnología de fusión génica, o a través de síntesis química, de modo que esté covalentemente unido a una toxina, compuesto terapéuticamente activo, enzima, citocina, radiomarcador, marcador fluorescente o etiqueta de afinidad.

También se describe un anticuerpo purificado que se une preferencialmente al receptor de antígeno de linfocitos T (TCR). Este anticuerpo se une preferencialmente a un bucle CDR3 o a una unión α - β del TCR; o se une preferencialmente o modula (por ejemplo, incrementa o disminuye) la expansión o activación de al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$. En un aspecto relacionado, la descripción describe una combinación de anticuerpos purificados (por ejemplo, una mezcla de 2, 3, 4 ó 5 anticuerpos) que juntos se unen preferencialmente a un receptor de antígeno de linfocitos T (TCR). En combinación, estos anticuerpos que unen preferencialmente a un bucle CDR3 o a una unión α - β del TCR; o modulan preferencialmente la expansión o activación de al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$. Las combinaciones de anticuerpos incluyen una mezcla de uno de los siguientes pares de anticuerpos: (i) un anticuerpo anti-V α 24 y un anticuerpo anti-CD161; (ii) un anticuerpo anti-V α 24 y un anticuerpo anti-CD94; (iii) un anticuerpo anti-V β 11 y un anticuerpo anti-CD161; o (iv) un anticuerpo anti-V β 11 y un anticuerpo anti-CD94. Estas combinaciones de anticuerpos se pueden unir preferencialmente o modular preferencialmente la expansión o activación de linfocitos T reactivos para CD1d.

En realizaciones deseables, el anticuerpo o la combinación de anticuerpos se une preferencialmente al linfocito T invariante. En otra realización deseable, los linfocitos T NK que se unen por el anticuerpo o combinación de anticuerpos son linfocitos T reactivos para CD1d, linfocitos T invariantes, linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$. De forma deseable, los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ son linfocitos T invariantes. De forma deseable, el bucle CDR3, unión α - β o sitio de unión a antígeno de un TCR se expresa en un linfocito T NK, linfocito T reactivo para CD1d o linfocito T $J\alpha Q^+$. También se describe un anticuerpo o combinación de anticuerpos que se une preferencialmente a un bucle CDR3, un sitio de unión a antígeno o una unión α - β de un TCR expresado en un linfocito T NK, linfocito T reactivo para CD1d o linfocito T $J\alpha Q^+$, y el anticuerpo o combinación de anticuerpos que modula preferencialmente la expansión o activación del linfocito T unido. Un linfocito T que expresa un TCR que se une por el anticuerpo o combinación de anticuerpos se puede expandir en presencia del anticuerpo. La unión del bucle CDR3, unión α - β o sitio de unión a antígeno de un TCR expresado en un linfocito T puede ser suficiente para cuantificar los linfocitos T, los bucles CDR3, las uniones α - β o los sitios de unión a antígeno. Se puede usar un segundo anticuerpo para distinguir diferentes subpoblaciones de linfocitos T unidos por el anticuerpo. En una realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo bifuncional. En una realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal. En una realización deseable, el anticuerpo se une covalentemente a una toxina, compuesto terapéuticamente activo, enzima, citocina, radiomarcador, marcador fluorescente, marcador magnético o etiqueta de afinidad. Los anticuerpos deseables tienen una región constante que se encuentra en un mamífero, aparte del ratón, tal como un ser humano. De forma deseable, el anticuerpo es humanizado.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un fragmento o derivado del anticuerpo de la presente invención como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo se une preferencialmente a un bucle CDR3 de un TCR invariante; y (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$. Los fragmentos deseables incluyen fragmentos ScFv, Fab y F(ab')₂.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo bifuncional que incluye (a) un anticuerpo, un fragmento o un derivado de la invención, y (b) un segundo anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo que se une a un segundo epítipo expresado en un linfocito T que expresa el TCR invariante o se expresa en un linfocito T NK, linfocito T reactivo para CD1d o linfocito T $J\alpha Q^+$, en el que dicho segundo anticuerpo se une a dicho primer anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. De forma deseable, el segundo anticuerpo también es un anticuerpo de la invención. En otra realización, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3, anti-CD161, anti-CD28 o anti-CD94. La descripción da a conocer un anticuerpo bifuncional que se une preferencialmente a un bucle CDR3 o a una unión α - β del TCR; o se une preferencialmente o modula la expansión o activación de al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$. En diversos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3 y anti-CD161 bifuncional, anticuerpo anti-V α 24 y anti-CD161; anticuerpo anti-V α 24 y anti-CD94; anticuerpo anti-V β 11 y anti-CD161; anticuerpo anti-V β 11 y anti-CD94; anticuerpo anti-CD3 y anti-CD94, anticuerpo

anti-CD3 y anti-CD28; o anticuerpo anti-V α 24 y anti-V β 11. En realizaciones particulares, el anticuerpo bifuncional (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa linfocitos T reactivos para CD1d.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona un hibridoma estable que produce un anticuerpo de la invención.

5 Los anticuerpos de la invención se pueden usar para purificar subpoblaciones de linfocitos T. Por tanto, la invención también proporciona una subpoblación de linfocitos T purificados. Los linfocitos T en la subpoblación se unen específicamente por un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. De forma deseable, el anticuerpo o combinación de anticuerpos se une específicamente al bucle CDR3 de un TCR expresado en la subpoblación de linfocitos T. En una realización deseable, los linfocitos T en la subpoblación son linfocitos T NK. Los linfocitos T NK deseables incluyen linfocitos T reactivos para CD1d, linfocitos T invariantes, linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. En otra realización deseable, los linfocitos T son linfocitos T reactivos para CD1d. Aún en otra realización deseable, los linfocitos T son linfocitos T J α Q⁺. De forma deseable, los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ son linfocitos T invariantes.

15 La invención también proporciona métodos para generar un anticuerpo de la invención que se une preferencialmente a un bucle CDR3 de un TCR invariante; y (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. Un método de este tipo incluye (a) acoplar un péptido cíclico a un transportador, (b) inmunizar un animal con el péptido acoplado, y (c) aislar un anticuerpo que se une preferencialmente a un bucle CDR3 de un TCR invariante; y (i) se une preferencialmente y (ii) modula o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. De forma deseable, la etapa (b) se repite. En otras realizaciones deseables, el animal es un mamífero o ave deficiente en linfocitos T invariantes o CD1.

25 En un aspecto relacionado, la invención proporciona otro método de generación de un anticuerpo de la invención. Este método incluye (a) inmunizar un animal (por ejemplo, un mamífero o un ave) con linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺, y (b) aislar un anticuerpo que se une preferencialmente a un bucle CDR3 del TCR invariante; y (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. De forma deseable, la etapa (a) se repite. En una realización deseable, los linfocitos T invariantes se administran a un animal deficiente en linfocitos T invariantes o CD1.

35 En otro aspecto relacionado, la invención proporciona un método de generación de un anticuerpo de la invención. Este método incluye (a) acoplar un péptido cíclico a un transportador, (b) inmunizar un animal (por ejemplo, un mamífero o un ave) con el péptido acoplado, (c) inmunizar el animal con linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺, y (d) aislar un anticuerpo que se une preferencialmente a un bucle CDR3 del TCR invariante; y (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. De forma deseable, la etapa (b) o (c) se repite. En una realización deseable, los linfocitos T invariantes se administran a un animal deficiente en linfocitos T invariantes o CD1.

40 Aún en otro aspecto relacionado, la invención proporciona un método de generación de un anticuerpo de la invención (a) inmunizando un animal (por ejemplo, un mamífero o un ave) con linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺, (b) acoplando un péptido cíclico a un transportador y (c) inmunizando al animal con el péptido acoplado y (d) aislando un anticuerpo que se une preferencialmente a un bucle CDR3 del TCR invariante; y (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. De forma deseable, la etapa (a) o la etapa (c) se repite. En una realización deseable, los linfocitos T invariantes se administran a un animal deficiente en linfocitos T invariantes o CD1.

50 En realizaciones deseables de los métodos de generación de un anticuerpo, el animal (por ejemplo, mamífero o ave) es un animal deficiente en linfocitos T invariantes o CD1, un ratón inactivado en CD1d, un animal en el que se han retirado los linfocitos T invariantes, un animal que carece de parte de la cadena TCR- α o un animal que carece de parte de la cadena TCR- β . En otras realizaciones deseables, el animal es tolerante a linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d, linfocitos T J α Q⁺ o al TCR invariante. En otras realizaciones deseables, el animal carece de toda o parte de la molécula V α 14 o J α 281. También se contempla que se pueda usar otro animal con una cantidad reducida o carente de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺.

60 Los anticuerpos, anticuerpos bifuncionales, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos de la presente invención como se define en las reivindicaciones tienen una variedad de aplicaciones de diagnóstico, de obtención de imágenes y terapéuticas.

65 En un aspecto de este tipo, la invención proporciona un método de medición de la cantidad de TCR NK o la cantidad de linfocitos T NK en una muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los TCR. En otra

realización, el anticuerpo es un anticuerpo bifuncional que se une tanto a CD3 como a CD161 expresados en el mismo linfocito T.

5 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de medición de la cantidad de TCR reactivos para CD1d o la cantidad de linfocitos T reactivos para CD1d en una muestra. Este método implica poner en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los TCR. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-V α 24 y anti-CD161 bifuncional; anticuerpo anti-V α 24 y anti-CD94; anticuerpo anti-V β 11 y anti-CD161; anticuerpo anti-V β 11 y anti-CD94; anticuerpo anti-CD3 y anti-CD94, anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28; o anticuerpo anti-V α 24 y anti-V β 11.

15 En otro aspecto relacionado, la invención proporciona un método de medición de la cantidad de TCR J α Q⁺ o la cantidad de linfocitos T J α Q⁺ en una muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. El anticuerpo se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los TCR.

20 En métodos deseables de determinación de la cantidad de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ en una muestra, la muestra es de un sujeto implicado en un ensayo clínico de un tratamiento o que se somete a un tratamiento para una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo y cáncer. De forma deseable, la cantidad de los TCR o los linfocitos T se usa para determinar el tratamiento deseable para tratar o prevenir una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo y cáncer. En otra realización deseable de estos aspectos, la cantidad de los TCR o los linfocitos T se usa para diagnosticar la recuperación o remisión de o la eficacia de cualquier tratamiento para una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, embarazo y cáncer.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método de visualización de los TCR NK o los linfocitos T NK en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los TCR. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo bifuncional que se une tanto a CD3 como a CD161 expresados en el mismo linfocito T.

40 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de visualización de los TCR reactivos para CD1d o los linfocitos T reactivos para CD1d en una muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los TCR. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-V α 24 y anti-CD161 bifuncional; anticuerpo anti-V α 24 y anti-CD94; anticuerpo anti-V β 11 y anti-CD161; anticuerpo anti-V β 11 y anti-CD94; anticuerpo anti-CD3 y anti-CD94, anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28; o anticuerpo anti-V α 24 y anti-V β 11.

45 En otro aspecto relacionado, la invención proporciona un método de visualización de los TCR J α Q⁺ o los linfocitos T J α Q⁺ en una muestra. Este método incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los TCR.

50 En realizaciones deseables de la medición o visualización de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ en una muestra, la muestra es de un animal transgénico o es un tejido de autopsia. De forma deseable, el anticuerpo se une covalentemente a un marcador fluorescente, radiomarcador o marcador magnético (por ejemplo, una perla magnética).

55 En otro aspecto, la invención proporciona un método de identificación de un sujeto en riesgo de una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo y cáncer. Este método incluye (a) cuantificar la cantidad de una subpoblación de linfocitos T en una muestra del sujeto, y (b) comparar la cantidad de los linfocitos T en la muestra con la cantidad de los linfocitos T hallados en sujetos diagnosticados con la afección o sujetos no diagnosticados con la afección. De forma deseable, la cantidad de los linfocitos T en la muestra se compara con la cantidad de los linfocitos T hallados tanto en sujetos diagnosticados con la afección como en sujetos no diagnosticados con la afección. En una realización deseable, el método incluye además comparar la cantidad de otro tipo de linfocitos T en la muestra con la cantidad de otro tipo de linfocitos T hallada en sujetos diagnosticados con la afección o sujetos no diagnosticados con la afección. De forma deseable, la cantidad del otro tipo de linfocitos T en la muestra se compara con la cantidad del otro tipo de linfocitos T hallada tanto en sujetos diagnosticados con la

afección como en sujetos no diagnosticados con la afección. La cantidad de la subpoblación de linfocitos T en una muestra se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo como se define en las reivindicaciones, tal como un anticuerpo o combinación de anticuerpos que se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los linfocitos T; y que se une preferencialmente a linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de diagnóstico o estadiaje de un sujeto con una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo y cáncer. Este método incluye (a) cuantificar la cantidad de una subpoblación de linfocitos T en una muestra del sujeto, y (b) comparar la cantidad de los linfocitos T en la muestra con la cantidad de los linfocitos T hallados en sujetos diagnosticados con la afección o sujetos no diagnosticados con la afección. De forma deseable, la cantidad de los linfocitos T en la muestra se compara con la cantidad de los linfocitos T hallados tanto en sujetos diagnosticados con la afección como en sujetos no diagnosticados con la afección. En una realización deseable, el método incluye además comparar la cantidad de otro tipo de linfocitos T en la muestra con la cantidad de otro tipo de linfocitos T hallada en sujetos diagnosticados con la afección o sujetos no diagnosticados con la afección. De forma deseable, la cantidad del otro tipo de linfocitos T en la muestra se compara con la cantidad del otro tipo de linfocitos T hallada tanto en sujetos diagnosticados con la afección como en sujetos no diagnosticados con la afección. La cantidad de la subpoblación de linfocitos T en una muestra se determina poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo como se define en las reivindicaciones, tal como un anticuerpo o combinación de anticuerpos que se une preferencialmente a un bucle CDR3 de los linfocitos T; y que se une preferencialmente a linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$.

En realizaciones deseables de cualquiera de los aspectos anteriores, la muestra es sangre periférica, fluido linfático, fluido ascítico, sangre de cordón umbilical, orina, heces, médula ósea, bilis o una muestra de biopsia. También se contempla que se pueda usar cualquier otra muestra de un mamífero, tal como otras muestras de sangre o tejidos.

En otro aspecto, la invención proporciona el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo o cáncer en un animal. Este método incluye administrar al animal un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. De forma deseable, el anticuerpo o combinación de anticuerpos se administra al animal por vía intraarticular, intralesional, oral, intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. En otra realización deseable, el anticuerpo o combinación de anticuerpos se administra con un transportador farmacéuticamente adecuado. En una realización deseable, también se administra al animal una citocina. En otra realización deseable, también se administra al animal un tipo celular u otro agente que funciona en conjunto con los anticuerpos.

También se describe un método de inhibición de patogénesis de linfocitos T en un animal administrando al animal un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. La administración del anticuerpo o combinación de anticuerpos es suficiente para inhibir un linfocito T que expresa un TCR unido por el anticuerpo o combinación de anticuerpos, un linfocito T NK, un linfocito T reactivo para CD1d o un linfocito T $J\alpha Q^+$. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3, un sitio de unión a antígeno o una unión α - β de un TCR de un linfocito T NK, un linfocito T reactivos para CD1d o un linfocito T $J\alpha Q^+$. El anticuerpo o combinación de anticuerpos inhibe la expansión o activación de al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se puede unir covalentemente a una toxina, un radiomarcador o una molécula que dirige procesos defensivos del huésped o catabólicos hacia las células. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se puede administrar al animal por vía oral, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intralesional, subcutánea, intraperitoneal, intralesional o por cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para inhibir el linfocito T. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se puede administrar con un transportador farmacéuticamente adecuado. También se puede administrar al animal una o más citocinas. La patogénesis de linfocitos T puede ser una respuesta de un linfocito T a una infección vírica, tal como una infección por Hepatitis, infección por picornavirus, infección por polio o infección por coxsackie.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T poniendo en contacto una muestra que tiene linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T. Este método incluye (a) poner en contacto una muestra que comprende linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre los linfocitos T y el anticuerpo o combinación de anticuerpos, (b) aislar el complejo, y (C) poner en contacto los linfocitos T en el complejo o recuperarlos del complejo con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de linfocitos T.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T. Este método incluye (a) poner en contacto una muestra que comprende linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre los linfocitos T y el anticuerpo o combinación de anticuerpos, (b) aislar el complejo, y (c) poner en contacto los linfocitos T en el complejo o recuperarlos del complejo con un antígeno y células presentadoras de antígeno bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de linfocitos T. De forma deseable, el antígeno es un antígeno de α -galactosilceramida, un lípido o glucosil-fosfatidilinositol de un patógeno infeccioso, un antígeno de una célula cancerosa, un propio lípido, o cualquier otro antígeno de fuentes endógenas o no fisiológicas.
- 10 Aún en otro aspecto, la invención proporciona un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T. Este método incluye (a) purificar los linfocitos T de una muestra que comprende los linfocitos T y (b) poner en contacto las células purificadas con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de linfocitos T.
- 15 En realizaciones deseables de los métodos de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T, el método incluye además poner en contacto la muestra o el complejo con una o más citocinas u otras células que funciona en conjunto con el anticuerpo o combinación de anticuerpos.
- 20 En otro aspecto, la invención proporciona un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T en un animal. Este método incluye (a) obtener una muestra que comprende los linfocitos T del animal, (b) poner en contacto los linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de los linfocitos T, y (c) administrar los linfocitos T puestos en contacto al animal.
- 25 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T en un animal. Este método incluye (a) obtener una muestra que comprende los linfocitos T del animal, (b) purificar los linfocitos T, (c) poner en contacto los linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de los linfocitos T, y (d) administrar los linfocitos T puestos en contacto al animal. De forma deseable, la purificación de los linfocitos T incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención. En una realización deseable, la purificación de los linfocitos T incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-V α 24, CD4, CD8, CD56, CD161 o V β 11. También se contempla que se pueda usar otro anticuerpo o combinación de anticuerpos que se une a un linfocito T para purificar las células.
- 30 También se describe un método para incrementar el tamaño de una subpoblación de linfocitos T en un animal. Este método incluye (a) obtener una muestra que comprende los linfocitos T del animal, (b) poner en contacto los linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre los linfocitos T y el anticuerpo, (c) aislar el complejo, y (d) poner en contacto los linfocitos T en el complejo o recuperarlos del complejo con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de linfocitos T, y (e) administrar los linfocitos T puestos en contacto al animal.
- 35 También se describe un método para incrementar el tamaño de una subpoblación de linfocitos T en un animal. Este método incluye (a) obtener una muestra que comprende los linfocitos T del animal, (b) poner en contacto los linfocitos T con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre los linfocitos T y el anticuerpo o combinación de anticuerpos, (c) aislar el complejo, y (d) poner en contacto los linfocitos T en el complejo o recuperarlos del complejo con un antígeno y células presentadoras de antígeno bajo condiciones que permitan el contacto para incrementar el número de linfocitos T, y (e) administrar los linfocitos T puestos en contacto al animal. De forma deseable, el antígeno es un antígeno de α -galactosilceramida, un lípido o glucosil-fosfatidilinositol de un patógeno infeccioso, un antígeno de una célula cancerosa, un propio lípido, o cualquier otro antígeno de fuentes endógenas o no fisiológicas.
- 40 También se describen realizaciones de los métodos para incrementar el tamaño de una subpoblación de linfocitos T en un animal, los métodos también incluyen administrar una o más citocinas al animal. La citocina se puede administrar al animal antes, durante o después de que los linfocitos T se administren al animal. La citocina se puede administrar por vía intramuscular, intravenosa, intraarticular, intralesional, subcutánea, o por cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para modular la actividad de un linfocito T. De forma deseable, la muestra o los linfocitos T se ponen en contacto con una o más citocinas. Los métodos de estos aspectos se pueden usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo o cáncer en el animal.
- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un método de purificación de una subpoblación de linfocitos T de una muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención.
- 50
- 55
- 60
- 65

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método de purificación de una subpoblación de linfocitos T de una muestra. Este método incluye (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre los linfocitos T y el anticuerpo, y (b) aislar el complejo. De forma deseable, la muestra también se pone en contacto con un anticuerpo anti-V α 24, CD4, CD8, CD56, CD161 o V β 11. En otra realización, la muestra se pone en contacto con cualquier otro anticuerpo que se une a un subgrupo de linfocitos T relacionado. De forma deseable, el método también incluye la recuperación de los linfocitos T del complejo. En una realización deseable, el anticuerpo se une covalentemente a un marcador fluorescente, y el complejo se aísla en base a la señal de fluorescencia del complejo. En otra realización deseable, el anticuerpo se une covalentemente a un marcador magnético, y el complejo se aísla en base al magnetismo del complejo.

En realizaciones deseables de cada aspecto de la invención, la citocina que se pone en contacto con la muestra, los linfocitos T o el complejo o la citocina que se va a administrar al animal se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IFN- α/β , IFN- γ y GM-CSF. También se contempla que se pueda usar cualquier otra citocina o combinación de citocinas. De forma deseable, la citocina altera la proporción de la respuesta de desviación inmunitaria Th1/Th2 por los linfocitos T puestos en contacto. De forma deseable, el sujeto o el animal es un ser humano. Otros animales deseables incluyen mamíferos y aves de laboratorio o de interés veterinario, tales como ratones, ratas, conejos, cerdos, cabras, ganado vacuno, ovejas, caballos, pollos y pavos. En realizaciones deseables, la infección vírica relacionada con la invención es una infección por hepatitis, infección por picornavirus, infección por polio, infección por VIH o infección por Coxsackie. En otras realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es diabetes de tipo 1.

En realizaciones deseables de cada método de la invención, el anticuerpo o la combinación de anticuerpos se une preferencialmente al linfocito T invariante. La subpoblación de linfocitos T, linfocitos T o linfocitos T que expresan el TCR son linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺. Los linfocitos T NK deseables son linfocitos T reactivos para CD1dT, linfocitos T invariantes, linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺. Los linfocitos T reactivos para CD1d deseables o los linfocitos T J α Q⁺ son linfocitos T invariantes. Los linfocitos J α Q⁺ deseables son linfocitos T V α 24⁺ J α Q⁺. El anticuerpo o combinación de anticuerpos se une preferencialmente a un bucle CDR3 de un TCR invariante expresado en el linfocito T y (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa el linfocito T unido. De forma deseable, el anticuerpo o combinación de anticuerpos (i) se une preferencialmente y (ii) expande o activa sólo una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺. De forma deseable, un bucle CDR3 de un TCR unido por un anticuerpo o combinación de anticuerpos de la invención se expresa por un linfocito T NK, linfocito T reactivo para CD1d, linfocito T J α Q⁺ o linfocito T invariante. También se contempla que los linfocitos T invariantes relativos a cualquiera de los aspectos de la invención puede no ser reactivo para CD1d. Los anticuerpos marcados deseables incluyen anticuerpos unidos a biotina, FITC, PE o una perla magnética.

Se debe entender que cada uno de los aspectos de la invención se aplica igualmente a los anticuerpos, anticuerpos bifuncionales, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos de la invención, como se define en las reivindicaciones. Cada uno de los aspectos de la invención también se aplica igualmente a una combinación de anticuerpos que juntos se unen preferencialmente a un bucle CDR3 o a una unión α - β del TCR. En diversas realizaciones, los anticuerpos en una combinación de anticuerpos de la invención se ponen en contacto simultánea o secuencialmente con linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ o con una muestra que contiene linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺. En otras realizaciones, los anticuerpos en una combinación de anticuerpos de la invención se administran simultánea o secuencialmente a un animal para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección.

Cada aspecto de la invención también se aplica a cualquier subpoblación de linfocitos T oligoclonalmente expandida específica de antígeno en animales (por ejemplo, seres humanos, otros mamíferos y aves) en respuesta a un reto antigénico dado. Estas subpoblaciones de linfocitos T oligoclonalmente expandidas específicas de antígeno incluyen los linfocitos T oligoclonalmente expandidos en respuesta a un componente inmunodominante del antígeno en múltiples individuos.

También se señala que la presentación de un antígeno a un linfocito T de interés no requiere una célula presentadora de antígeno (CPA). Por ejemplo, se puede usar una forma soluble o inmovilizada de una molécula presentadora de antígeno para presentar un antígeno a un linfocito T o una muestra que contiene un linfocito T de interés bajo condiciones que permitan la activación o expansión del linfocito T sin la presencia de una CPA.

Por "bucle CDR3" se quiere decir los aminoácidos en la unión que se genera por el reordenamiento entre un segmento V y un segmento J de la cadena TCR- α o por el reordenamiento entre un segmento V, un segmento D y un segmento J de una cadena TCR- β . La identificación del bucle CDR3 se simplifica por la presencia de una cisteína conservada en el extremo del segmento V. El primer aminoácido después de esta cisteína es el primer residuo del bucle CDR3.

La secuencia de un bucle CDR3 se puede identificar fácilmente en base a un alineamiento de secuencia de la secuencia de aminoácidos de un TCR de interés con una o más secuencias de otros TCR. Por ejemplo, se puede usar

una tabla de Kabat que contiene un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de numerosos receptores de linfocitos T para identificar el bucle CDR3 en una cadena TCR- α o en una cadena - β de interés (Johnson y Wu, Nuc. Acid. Res. 29(l): 205-206, 2001; <http://immuno.bme.nwu.edu>). El bucle CDR3 también se puede identificar en base a un alineamiento de secuencias con uno o más TCR para los que se ha identificado el bucle CDR3 en base a la estructura cristalina de rayos x (Reinherz *et al.*, Science 286 (5446): 1913-1921,1999). Adicionalmente, se puede identificar el bucle CDR3 determinando la estructura tridimensional de la cadena de TCR de interés.

Por "anticuerpo que se une preferencialmente a un bucle CDR3, un sitio de unión a antígeno o una unión α - β de un TCR" se quiere decir un anticuerpo que reconoce y se une a un bucle CDR3, un sitio de unión a antígeno o una unión α - β de un TCR o que reconoce y se une a un bucle CDR3, un sitio de unión a antígeno o una unión α - β de un TCR expresado en un linfocito T, pero que sustancialmente no reconoce ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de forma natural otras proteínas o células. La señal en el ensayo ELISA descrito en el ejemplo 1 para la unión del anticuerpo a un bucle CDR3, un sitio de unión a antígeno o una unión α - β de un TCR expresado en un linfocito T es deseable, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o 500 veces mayor que la de la unión a una célula de control que no es un linfocito T o a un linfocito T que expresa TCR con bucles CDR3, uniones α - β y sitios de unión a antígeno con secuencias de aminoácidos que son menores de un 99, 95, 90, 85, 80, 70, 60, 50, 40 o 20 % idénticas a la correspondiente secuencia del bucle CDR3, unión α - β o sitio de unión a antígeno unido preferencialmente al anticuerpo. Se pueden generar formas del anticuerpo humanizadas o de otras especies usando técnicas estándar.

De forma deseable, el anticuerpo se "purifica", lo que quiere decir que se ha separado de otros componentes que lo acompañan de forma natural. Típicamente, el anticuerpo está sustancialmente puro cuando es al menos un 50 %, en peso, libre de proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas naturales con las que está asociado de forma natural. De forma deseable, el anticuerpo es al menos un 75 %, de forma más deseable, al menos un 90 %, y de la forma más deseable, al menos un 99 %, en peso, puro. Se puede obtener un anticuerpo sustancialmente puro que se une preferencialmente a un bucle CDR3, unión α - β o un sitio de unión a antígeno de un TCR, por ejemplo, usando un método de la presente invención para inmunizar un mamífero para la generación del anticuerpo, por la construcción de un hibridoma que secreta el anticuerpo, sintetizando químicamente el anticuerpo o por separación del anticuerpo a partir de fuentes naturales. Se puede someter a ensayo la pureza por cualquier método adecuado, como se describe a continuación para el aislamiento de anticuerpos.

Por "unión α - β de un TCR" se quiere decir la interfase entre las cadenas α y β de un TCR. La interfase incluye interacciones no covalentes entre los dominios variables de las cadenas α y β . De forma deseable, se usa la estructura tridimensional de la unión α - β o un modelo de la estructura tridimensional de la unión α - β en el diseño de polipéptidos o moléculas pequeñas para inmunizar un mamífero para generar un anticuerpo para la unión α - β del TCR. Se han notificado varias estructuras tridimensionales de la interfase entre las cadenas α y β de un TCR y se pueden usar por un experto en la técnica para modelar la interfase de las cadenas α y β de un TCR expresado por un linfocito T NK, reactivo para CD1d, $J\alpha Q^+$ o invariante. Por ejemplo, en base a la estructura modelada o real de la interfase de las cadenas α y β , se puede diseñar una molécula pequeña que tenga una estructura tridimensional similar a la de una región expuesta de la interfase. Adicionalmente, se puede diseñar un polipéptido que tenga una estructura tridimensional similar a la de una porción o toda la unión α - β de un TCR. Por ejemplo, se puede usar una estructura modelada o real de un TCR de interés para obtener una estructura modelada o real de la unión α - β del TCR que después se puede imitar por un polipéptido diseñado (por ejemplo, un polipéptido de aproximadamente 100 aminoácidos). Se pueden añadir engarces o enlaces covalentes entre los dominios del polipéptido diseñado de modo que se genere un polipéptido monocatenario. Para estos procedimientos de modelado, se puede usar cualquier programa de modelado estándar, tal como MolScript.

De forma similar, se pueden usar estos métodos para generar anticuerpos que unen preferencialmente la unión γ - δ de un TCR de interés.

Por "sitio de unión a antígeno de un TCR" se quiere decir la región de un TCR que se une a un antígeno. Esta región incluye parte de la superficie expuesta de la región variable del TCR. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno contiene el bucle CDR3 de la cadena α , el bucle CDR3 de la cadena β , una porción predecible de los bucles CDR1, una porción predecible de los bucles CDR2 y algunas superficies estructurales cercanas.

De forma deseable, se usa la estructura tridimensional del sitio de unión a antígeno o un modelo de la estructura tridimensional del sitio de unión a antígeno en el diseño de polipéptidos o moléculas pequeñas para inmunizar un mamífero para generar un anticuerpo para el sitio de unión a antígeno del TCR. Se han notificado varias estructuras tridimensionales de sitios de unión a antígeno de los TCR (en presencia o ausencia de un antígeno) y se pueden usar por un experto en la técnica para modelar el sitio de unión a antígeno de un TCR expresado por un linfocito T NK, reactivo para CD1d, $J\alpha Q^+$ o invariante. Adicionalmente, se puede usar una estructura modelada o real de CD1d para determinar cómo podrían interactuar otros compuestos con linfocitos T reactivos para CD1d. En base a la estructura modelada o real de un sitio de unión a antígeno, se puede diseñar una molécula pequeña o polipéptido que tenga una estructura tridimensional similar a la de una porción o todo el sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, se puede usar una

estructura modelada o real de un TCR de interés para obtener una estructura modelada o real del sitio de unión a antígeno del TCR que después se puede imitar por un polipéptido diseñado (por ejemplo, un polipéptido de aproximadamente 100 aminoácidos). Se pueden añadir engarces o enlaces covalentes entre los dominios del polipéptido diseñado de modo que se genere un polipéptido monocatenario. Para estos procedimientos de modelado, se puede usar cualquier programa de modelado estándar, tal como MolScript.

Por "linfocito T invariante" se quiere decir un linfocito T que tiene un receptor de antígeno de linfocitos T invariantes reactivos para CD1d. Por "receptor de antígeno de linfocitos T invariantes reactivos para CD1d" se quiere decir un receptor de antígeno de linfocitos T que reconoce CD1d y tiene una cadena alfa que se genera a partir de un reordenamiento entre $V\alpha 24$ y $J\alpha Q$ que produce poca o ninguna diversidad en la región N (Kent *et al.*, Human Immunology 60:1080-1089, 1999). En ratones, la cadena TCR- α invariante se genera a partir de un reordenamiento entre $V\alpha 14$ y $J\alpha 281$ que produce poca o ninguna diversidad en la región N. El reordenamiento equivalente se puede producir en otros mamíferos (por ejemplo, ratas) y en aves. Aunque la cadena TCR- α invariante humana se empareja preferencialmente con $V\beta 11$, se puede emparejar con otras $V\beta$. El receptor de antígeno de linfocitos T invariantes reactivos para CD1d humano reconoce CD1d, pero no los miembros de la familia CD1a, CD1b o CD1c estrechamente relacionados (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186 (1): 109- 120, 1997).

Por "fragmento" se quiere decir un polipéptido que tiene una región de aminoácidos consecutivos idéntica a la región correspondiente de un anticuerpo de la invención. El fragmento tiene la capacidad de unir, activar y/o expandir linfocitos T *ex vivo* o *in vivo*, como se determina usando los ensayos descritos en el presente documento. De forma deseable, el número, la actividad o la pureza de las células expandidas es al menos de un 20, 40, 60, 80 ó 90 % de lo producido por un anticuerpo de la invención, como se mide usando los ensayos proporcionados en el presente documento. De forma deseable, la unión del fragmento al bucle CDR3, unión α - β o sitio de unión a antígeno de un TCR es al menos de un 20, 40, 60, 80 ó 90 % de la de un anticuerpo de la invención.

Por "derivado" se quiere decir un anticuerpo o fragmento de la invención que se modifica químicamente o a través de tecnología de fusión génica o síntesis química, de modo que esté covalentemente unido a una toxina, compuesto terapéuticamente activo, enzima, citocina, radiomarcador, marcador fluorescente o etiqueta de afinidad. El grupo unido covalentemente se puede unir al extremo amino, extremo carboxi, entre el extremo amino y carboxi, o a una cadena lateral de un aminoácido en el anticuerpo o fragmento. Por "etiqueta de afinidad" se quiere decir un péptido, proteína o compuesto que se une a otro péptido, proteína o compuesto. En una realización deseable, se usa la etiqueta de afinidad para purificación o inmovilización del derivado. En otra realización deseable, se usa la etiqueta de afinidad o toxina para dirigir el anticuerpo o fragmento a una célula, tejido o sistema de órgano específico *in vivo*. Aún en otra realización deseable, se usa el marcador fluorescente o radiomarcador para la obtención de imágenes del derivado. Aún en otra realización deseable, se usa el compuesto terapéuticamente activo o radiomarcador para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno. En otra realización, el derivado o fragmento de un anticuerpo de la invención tiene una estabilidad incrementada o solubilidad incrementada en comparación con el anticuerpo. También se contempla que el anticuerpo, fragmento o derivado de la invención se puede unir no covalentemente a otro anticuerpo unido covalentemente a una toxina, compuesto terapéuticamente activo, enzima, citocina, radiomarcador, marcador fluorescente, marcador magnético o etiqueta de afinidad.

Por "humanizado" se quiere decir la alteración de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de modo que se provoquen menores anticuerpos y/o respuestas inmunitarias contra el anticuerpo humanizado cuando se administra a un ser humano. Para el uso del anticuerpo en un mamífero, aparte de un ser humano, se puede convertir un anticuerpo de la invención a ese formato de especie.

Por "anticuerpo bifuncional" se quiere decir un anticuerpo que incluye un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo unido covalentemente a otro anticuerpo u otro fragmento de un anticuerpo. De forma deseable, ambos anticuerpos o fragmentos se unen a diferentes epítomos expresados en el mismo linfocito T. De forma deseable, al menos un anticuerpo incluido en el anticuerpo bifuncional es un anticuerpo de la invención. De forma deseable, el anticuerpo se une a CD3, CD161 o tanto CD3 como CD161. En otras realizaciones deseables, el anticuerpo se une a uno o más de los siguientes: $V\alpha 24$, CD94, $V\beta 11$ y anti-CD28.

Por "péptidos cíclicos" se quiere decir un péptido no lineal que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos un 60 %, de forma deseable un 80 %, de forma más deseable un 90 %, y de la forma más deseable un 100 % idéntica a una región en el bucle CDR3 de un TCR. En una realización deseable, la secuencia de aminoácidos del péptido incluye CVVSDRGSTLGRADCG (SEQ ID N.º 1) del bucle CDR3 del TCR- α invariante humano o una región de al menos 5, 8, 10 ó 15 aminoácidos consecutivos de SEQ ID N.º 1. En otra realización deseable, la secuencia de aminoácidos del péptido es idéntica a la de SEQ ID N.º 1. El péptido se puede ciclar por la formación de un enlace covalente entre el grupo amino N terminal del péptido o la cadena lateral de residuo y el grupo carboxilo C terminal o la cadena lateral de un residuo. Por ejemplo, se puede formar un péptido lactama por la ciclación entre el grupo amino N terminal o un grupo amino de una cadena lateral de aminoácidos y el grupo carboxilo C terminal o una cadena lateral que contiene un carboxilo o amida, tal como la de ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparragina. Otras ciclaciones posibles incluyen la formación de un tioéter por la reacción de un grupo tiol en una cadena lateral de cisteína con el grupo amino N terminal, grupo carboxilo C terminal, o la cadena lateral de otro aminoácido. También se puede formar

un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína. También se contempla que se puede usar un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos un 60 %, de forma deseable un 80 %, de forma más deseable un 90 % y de la forma más deseable un 100 % idéntica a una región de otro bucle o superficie expuesta de la cadena alfa o beta del TCR invariante u otro TCR para la generación de anticuerpos para otro TCR. Los bucles deseables incluyen el bucle CDR3 de la cadena α o β de un linfocito T NK, linfocito T reactivo para CD1d, o linfocito T $J\alpha Q^+$.

Por "mamífero deficiente en linfocitos T invariantes o CD1d" se quiere decir un mamífero que cuando se compara con otros mamíferos de la misma especie tiene una cantidad reducida de o carece de moléculas CD1d funcionales, linfocitos T invariantes, cadenas TCR- α o cadenas TCR- β . Ejemplos deseables de estos mamíferos incluyen un ratón inactivado en CD1d (Sonoda *et al.*, 1999, *supra*), un mamífero no tolerante al TCR invariante, un mamífero en el que se han retirado los linfocitos T invariantes, un mamífero que carece de parte de la cadena TCR- α (Cui *et al.*, Science 278:1623, 1997), un mamífero que carece de parte de la molécula VB8 o animales con linfocitos T NK, invariantes o subpoblaciones relativas eliminadas por anticuerpos, citocinas o estimulación antigénica repetida.

Por "inmunizar" se quiere decir administrar a un animal (por ejemplo, un mamífero o un ave) cualquier péptido acoplado a transportadores, linfocitos T invariantes, o ambos, usando procedimientos estándar. Las vías de administración deseables incluyen vía intraperitoneal, intramuscular, intradérmica y subcutánea. La dosis y frecuencia de administración se puede determinar usando procedimientos estándar.

Por "aislar anticuerpos" se quiere purificar el anticuerpo de antisuero, líquido ascítico o sobrenadante de hibridomas. Los anticuerpos se pueden purificar por un experto en la técnica usando técnicas estándar, tales como las descritas en Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, volumen 2, p. 11.13.1-11.13.3, John Wiley & Sons, 1995). De forma deseable, el anticuerpo es al menos 2, 5 ó 10 veces tan puro como el material de partida, medido usando electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía en columna, densidad óptica, análisis de HPLC, o análisis de western para detectar una reducción en la cantidad de proteínas contaminantes o ELISA para detectar un incremento en la actividad específica para la unión a marcadores para una subpoblación de linfocitos T particular.

Por "poner en contacto" se quiere decir incubar una muestra con un anticuerpo o citocina. El anticuerpo o citocina puede estar en forma soluble, o puede estar inmovilizado. En una realización, la citocina o anticuerpo inmovilizado está unido estrechamente o unido covalentemente a una perla o placa. En realizaciones deseables, el contacto se produce *ex vivo* o *in vivo*.

Por "medir" se quiere decir determinar el porcentaje de células en una muestra que pertenecen a una subpoblación de linfocitos T específica o determinar el número de células en una muestra que pertenece a una subpoblación de linfocitos T específica, como se describe en el presente documento. En una realización deseable, los linfocitos T son linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$.

Por "tratar o prevenir" se quiere decir administrar un anticuerpo de la presente invención o linfocitos T que se han incubado con el anticuerpo a un mamífero, como se describe en el presente documento.

Por "patogénesis de linfocitos T" se quiere decir una enfermedad o trastorno que está provocado o exacerbado por una actividad de linfocitos T, tal como su producción de citocinas o citotoxicidad.

Por "enfermedad autoinmunitaria" se quiere decir una enfermedad en la que se genera una respuesta del sistema inmunitario contra los propios epítotos. Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis reumatoide, pénfigo vulgar, esclerosis múltiple y miastenia grave.

Por "incrementar el tamaño de una subpoblación de linfocitos T" se quiere decir estimular la expansión de estas células incubándolas con un anticuerpo o incubándolas con un antígeno y células presentadoras de antígeno. De forma deseable, el número de linfocitos T pertenecientes a la subpoblación que está presente después de esta incubación es al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 150 ó 500 veces superior al número de estas células presente después de la correspondiente incubación de control en ausencia del anticuerpo o del antígeno y células presentadoras de antígeno. De forma más deseable, el número de linfocitos T pertenecientes a la subpoblación que está presente después esta incubación es al menos 2, 5, 10, 20 ó 50 veces mayor que el número de estas células presente después de la correspondiente incubación en presencia de 0,1 - 2 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (FA). También se contempla que el porcentaje podría seguir siendo el mismo, pero el número real del subgrupo relevante se puede incrementar si se incrementa el número total de linfocitos T. De forma deseable, el cambio en el porcentaje de células que pertenecen a la subpoblación de linfocitos T es al menos 2, 5, 10, 20 ó 50 veces mayor que el correspondiente cambio en el porcentaje de células que pertenecen a la subpoblación de linfocitos T en una muestra de control que no se ha incubado con el anticuerpo. En otra realización deseable, los linfocitos T son linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$.

Por "modular preferencialmente la expansión o activación de al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$ " se quiere decir inducir o inhibir la expansión o activación de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$. Se puede medir la

- inducción de la expansión de estas subpoblaciones de linfocitos T como se describe para determinar el incremento en el tamaño de la subpoblación de linfocitos T. Se puede determinar la inhibición de la expansión de estas subpoblaciones de linfocitos T comparando el número de linfocitos T pertenecientes a la subpoblación después de la incubación con un anticuerpo de la invención en comparación con una incubación de control sin el anticuerpo. De forma deseable, el número de linfocitos T pertenecientes a la subpoblación presente después de la incubación con el anticuerpo es 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 veces menor que el número de estos linfocitos T presente después de la correspondiente incubación de control. Esta inhibición de la expansión de los linfocitos T puede ser útil en la prevención o tratamiento de la patogénesis de linfocitos T. Se puede someter a ensayo la inducción o inhibición de la activación de una subpoblación de linfocitos T usando procedimientos estándar para medir la producción de citocinas o citotoxicidad de la subpoblación de linfocitos T. De forma deseable, el incremento o disminución en la producción de citocinas o citotoxicidad es al menos 5, 10, 20, 20, 40, 50, 70, 90 ó 100 % de la actividad de la subpoblación de linfocitos T de control incubada en ausencia del anticuerpo. De forma deseable, el cambio en el tamaño o la actividad de al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$ es al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 150 ó 500 veces mayor que el correspondiente cambio en células distintas de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$. En una realización deseable, preferencialmente el anticuerpo se une o modula la expansión o activación de sólo una de las subpoblaciones de linfocitos T seleccionadas del grupo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$.
- 20 Por "anticuerpo anti- $V\alpha 24$, CD4, CD8, CD56, CD161, CD94, CD28 o $V\beta 11$ " se quiere decir un anticuerpo que reconoce y se une a moléculas $V\alpha 24$, CD4, CD8, CD56, CD161, CD94, CD28 o $V\beta 11$ o células que expresan una de estas moléculas, pero que sustancialmente no reconoce ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de forma natural otras proteínas o células.
- 25 Por "obtener una muestra que comprende linfocitos T" se quiere retirar una muestra que tiene linfocitos T de un mamífero o adquirir una muestra que tiene estas células y se produce por un mamífero. En una realización deseable, la muestra es sangre periférica. En otra realización, la muestra es un fluido corporal, tal como orina, bilis o un tejido corporal. En otra realización, la muestra es una muestra de médula ósea o cordón umbilical.
- 30 Por "purificar los linfocitos T" se quiere decir aislar las células de una muestra que contiene de forma natural otras células. Los linfocitos T se pueden purificar usando un anticuerpo de la invención o un anticuerpo anti- $V\alpha 24$, CD4, CD8, CD56, CD161 o $V\beta 11$ en procedimientos estándar. Los métodos de purificación deseables incluyen de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunoprecipitación, cromatografía de inmunoafinidad, purificación por inmunoafinidad de perlas magnéticas y fijación celular con un anticuerpo unido a la placa. De forma deseable, los linfocitos T purificados son al menos 2, 5, 10, 50, 100, 500 ó 900 veces tan puros como la muestra original, como se mide usando análisis de ELISA o FACS para detectar la unión de los linfocitos T purificados a marcadores para la subpoblación de linfocitos T a la que pertenecen.
- 35 Por "subpoblación de linfocitos T purificada" se quiere decir una subpoblación de linfocitos T sustancialmente pura que está aislada de una muestra que contiene de forma natural otras células. La subpoblación de linfocitos T purificados se enriquece por al menos uno de los siguientes: linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$. De forma deseable, la subpoblación de linfocitos T se enriquece por sólo uno de los siguientes: linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$. La subpoblación de linfocitos T purificados es más pura que la pureza de la subpoblación de linfocitos T que se encuentra en la naturaleza. De forma deseable, la subpoblación de linfocitos T purificada está al menos un 1, 5, 15, 30, 50, 75, 90 ó 99 %, en número, libre de células con las que está asociada de forma natural. Típicamente, estas otras células que están asociadas con la subpoblación de linfocitos T difieren de los linfocitos T pertenecientes a la subpoblación que no expresan una molécula de superficie celular, que no se unen a ligando, o que no tienen una actividad de la subpoblación de linfocitos T.
- 40 Por "complejo" se quiere decir un linfocito T unido a anticuerpo en el que la unión del anticuerpo al linfocito T es suficiente para permitir el aislamiento o la separación del complejo de una muestra.

Por "recuperar las células del complejo" se quiere separar los linfocitos T del anticuerpo usando procedimientos estándar.

- 55 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

- 60 La figura 1 es una ilustración esquemática de la relación entre los linfocitos T NK, linfocitos T invariantes reactivos para CD1d, linfocitos T no invariantes reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$.

- 65 La figura 2A es un histograma de la tinción con un clon de linfocito T de control con los anticuerpos monoclonales anti-bucle CDR3 (3A6 o 6B11) o un control apareado de isótopo $6B11$ (gGg1). La figura 2B es un histograma de la correspondiente tinción de un clon de linfocito T NK invariante.

- 5 Las figuras 3A y 3B son gráficas de puntos que muestran el análisis de FACS del reconocimiento de linfocitos T $V\alpha 24^+$ por el anticuerpo monoclonal 6B11. Los linfocitos T $V\alpha 24^+$ purificados con FACS se expandieron *ex vivo* durante 2 semanas con FA y se analizaron usando anticuerpos monoclonales $V\alpha 24$ -PE y $V\beta 11$ -FITC (figura 3A) o $V\alpha 24$ -PE y 6B11-FITC (figura 3B).
- 10 Las figuras 4A y 4B son gráficas que muestran la expansión de células clasificadas de $V\alpha 24$ que se cultivaron durante tres semanas con anticuerpo monoclonal anti-bucle CDR3 6B11 unido a placa o FA, respectivamente.
- 15 Las figuras 5A y 5B son gráficas que muestran el análisis de FACS de linfocitos T NK invariantes en un paciente antes y durante el tratamiento con IL-12, respectivamente. Se analizó sangre periférica de un paciente con cáncer de células renales avanzado para determinar las células $CD3^+V\alpha 24^+$ inmediatamente antes del tratamiento con IL-12 y a la finalización del primer ciclo de 6 semanas. Se han observado en todos los casos (n=10) fracciones bajas comparables de linfocitos T $V\alpha 24^+$, con ningún incremento significativo después del tratamiento.
- 20 Las figuras 6A-6C son gráficas que muestran la producción de IL-4 por células mononucleares de sangre periférica en masa, linfocitos T $V\alpha 24^+$ e invariantes policlonales ("poli."), respectivamente. Estas células se expandieron con α -GalCer y después se estimularon con tampón, anticuerpo 6B11 unido a la placa, transfectantes cultivados conjuntamente con Hela/CD1d o bien FA. Se determinó la cantidad de IL-4 secretada usando análisis de ELISA estándar.
- 25 Las figuras 7A-7C son gráficas que muestran la expansión comparable de linfocitos T NK invariantes fenotípica y funcionalmente idénticos de la misma muestra de donante sano por 6B11 y α -GalCer. Se expandieron células clasificadas con 'MoFlo' $V\alpha 24$ con células dendríticas autólogas pulsadas con α -GalCer, anticuerpo monoclonal 6b11 o mitógeno (FA) durante una expansión de aproximadamente cuatro semanas con IL-2 sola.
- 30 La figura 8A es una gráfica que muestra el reconocimiento de los linfocitos T en masa a partir de una muestra de sangre periférica por el anticuerpo 3A6. La figura 8D es una gráfica de la dispersión frontal (FSC) y lateral (CDC) de células que muestra el control de paso para las células linfáticas que se analizaron usando el anticuerpo 6B11, 3A6 o de control. Las figs. 8B, 8C y 8E-8I son gráficas que muestran el reconocimiento de clones y líneas de linfocitos T NK invariantes por los anticuerpos 3A6, 6B11 o de control de isotipo. Estos clones y líneas de linfocitos T NK invariantes se purificaron usando el anticuerpo monoclonal anti- $V\alpha 24$ seguido de expansión usando alfa-GalCer. Para las figuras 8B-8I, se analizó la misma línea de células "MT". Este análisis de FACS indirecto (1-color) usando el anticuerpo 3A6 o 6B11 y anti-mIg-FITC muestra el reconocimiento específico de clones y líneas de linfocitos T NK invariantes humanos puros en comparación con linfocitos T de control.
- 35 La figura 9 es una gráfica que muestra el análisis de FACS de líneas de linfocitos T NH invariantes a partir de células mononucleares de sangre periférica completa (PBMC) de un donante sano. Se clasificaron estas células con 6B11-FITC por FACS MoFlo y se expandieron durante aproximadamente seis semanas antes del análisis de FACS de 2-colores. Después de la expansión, un 21 % de las células eran $V\alpha 24^+$, en comparación con un original de ~0.1 %. Estos resultados también se resumen en las figuras 12-17.
- 40 Las figuras 10A-10H son gráficas que muestran el análisis de FACS of líneas de linfocitos T NK invariantes a partir de clasificación de perlas magnéticas de anticuerpo 6B11. Los linfocitos T NK invariantes a partir de PBMC completa de un donante sano se clasificaron con 6B11 mediante purificación por inmunoafinidad de perlas magnéticas de Dynal o Miltenyi a partir de PBMC completa y se expandieron durante aproximadamente seis semanas antes del análisis de FACS de 2-colores. Estos resultados también se resumen en las figuras 12-17.
- 45 Las figuras 11A-11H son gráficas que muestran el análisis de FACS of líneas de linfocitos T NK invariantes a partir de clasificación de perlas magnéticas de anticuerpo 6B11. Los linfocitos T NK invariantes a partir de PBMC completa de un donante sano se clasificaron con 6B11 mediante purificación por inmunoafinidad de perlas magnéticas de Dynal y se trataron como se muestra a partir de PBMC completa y se expandieron durante aproximadamente seis semanas antes del análisis de FACS de 2-colores. Estos resultados también se resumen en las figuras 12-17.
- 50 La figura 12 es una tabla que muestra el porcentaje de linfocitos T que se tiñen con los anticuerpos indicados después una única ronda de expansión de cuatro a ocho semanas en medio de linfocitos T. LA columna de "PBMC" representa células de PBMC que no se clasificaron antes de la expansión. La columna "Dynal@40" representa células de PBMC que se purificaron usando perlas de 6B11-Dynal antes de la expansión. La columna de "Milenyi@20" representa células de PBMC que se clasificaron usando perlas de 6B11 (20 μ g/ml de revestimiento)-Milenyi antes de la expansión. Para la comparación, se enumeran los correspondientes resultados para leukopak 21 (LKP 21) completa no clasificada. Para las figuras 12-17, se usó un medio de linfocitos T estándar, tal como medio RPMI-1640 o BioWhittaker con FBS al 10 % y 100 U/ml de IL-2 recombinante humana.
- 55 La figura 13 es una tabla que muestra el porcentaje de linfocitos T que se tiñen con los anticuerpos indicados después de purificación usando perlas de 6B11-Dynal y una única ronda de expansión de cuatro a ocho semanas en medio de
- 60
- 65

linfocitos T. Para la comparación, se enumeran los correspondientes resultados para leukopak 10 (LKP 10) completa no clasificada. Como se indica en la tabla, algunas de las expansiones de linfocitos T se llevaron a cabo en presencia de medio de linfocitos T ("TCM") que contenía IL-7 a 10 ng/ml, IL-5 a 10 ng/ml, dexametasona ("Dex") a 1 μ M y/o anticuerpo 6B11 a 40 μ g/ml. Los números de la figura enumerados en la derecha de algunas de las filas en la tabla indican las figuras que ilustran los resultados de las expansiones de linfocitos T.

La figura 14 es una tabla que muestra el porcentaje de linfocitos T que se tiñen con los anticuerpos indicados después una única ronda de expansión de cuatro a ocho semanas en medio de linfocitos T. Para la comparación, se enumeran los correspondientes resultados para leukopak 14 (LKP 14) completa no clasificada. Los resultados para las células que se clasificaron con perlas de 6B11-Dynal antes de la ampliación se comparan con células de control sin clasificar. Como se indica en la tabla, algunas de las expansiones de linfocitos T se llevaron a cabo en presencia de anticuerpo 6B11 como anteriormente, FA (1 μ g/ml) y/o números equivalentes de CPA autólogas.

La figura 15 es una tabla que muestra el porcentaje de linfocitos T que se tiñen con los anticuerpos indicados después una única ronda de expansión de cuatro a ocho semanas en medio de linfocitos T. Los resultados para las células que se clasificaron con perlas de 6B11-Dynal antes de la ampliación se comparan con células de control sin clasificar (LKP 13). Algunas de las expansiones de linfocitos T se llevaron a cabo en presencia de anticuerpo 6B11, FA, CPA alogénicas y/o CPA autólogas, como se describe anteriormente.

La figura 16 es una tabla que muestra el porcentaje de linfocitos T que se tiñen con los anticuerpos indicados después de purificación usando perlas magnéticas de 6B11-Miltenyi y una única ronda de expansión de cuatro a ocho semanas en medio de linfocitos T en comparación con células de control no clasificadas (LKP 2). Estas expansiones de linfocitos T se llevaron a cabo en presencia de CPA autólogas, como se describe anteriormente. Durante una de las expansiones de linfocitos T, también estaban presentes 10 ng/ml de IL-7 y IL-15.

La figura 17 es otra tabla que muestra el porcentaje de linfocitos T que se tiñen con los anticuerpos indicados después de purificación usando perlas magnéticas de 6B11-Miltenyi y una única ronda de expansión de cuatro a ocho semanas en medio de linfocitos T. Estas expansiones de linfocitos T se llevaron a cabo en presencia de CPA autólogas y FA y se comparan con células de control no clasificadas (LKP 11,12). Durante las expansiones de linfocitos T, también estaban presentes anticuerpo 6B11 y/o anticuerpo V α 24 como se describe anteriormente y como se indica en la tabla. Durante una de las expansiones de linfocitos T, también estaban presentes 10 ng/ml de IL-7 y IL-15. Los números de la figura enumerados en la izquierda de algunas de las filas en la tabla indican las figuras que ilustran los resultados de las expansiones de linfocitos T.

La figura 18 es una gráfica que muestra el análisis de FACS de una línea de linfocitos T purificada usando el anticuerpo 6B11 biotinilado y perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina.

Las figuras 19A-19E son gráficas que muestran el análisis de citometría de flujo de sangre periférica de un donante sano (figuras 19B y 19E) o de un paciente con cáncer de próstata (figuras 19C y 19F) o una línea de linfocitos T NK (figuras 19A y 19D) analizados por citometría de flujo de dos colores con anticuerpo V α 24-PE y V β 11-FITC (figuras 19A-19C) o bien 6B11-FITC (figuras 19D-19F). La línea de linfocitos T NK se generó por expansión de α -GalCer de células purificadas de V α 24 a partir de un donante sano.

Las figuras 20A y 20B son gráficas que muestran el análisis de citometría de flujo de dos colores con anticuerpo monoclonal V α 24-PE y V β 11-FITC de células clasificadas de V α 24 después de una expansión de tres semanas con FA (figura 20A) o α -GalCer y alimentadores de PBMC autólogos (figura 20B). Las figuras 20C y 20D son gráficas de barras que muestran la producción de IL-4 y IFN- γ , respectivamente, por una línea de linfocitos T NK invariante estimulada con FA o estimulada con linfocitos B transformados con EBV humana de C1R transfectada con CD1d o transfectadas con control en presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD1d (51,1, 10 μ /ml) o bien un anticuerpo de control de isotipo. Los resultados en las figuras 20A-20D son representativos de múltiples donantes sanos, como se muestra a continuación.

Las figuras 21A-21C son gráficas que muestran la disminución de la expansión de linfocitos T NK invariantes en pacientes con cáncer de próstata frente a donantes sanos. Los linfocitos T NK invariantes expandidos con α -GalCer de un donante sano (figura 21A), un paciente con cáncer de próstata avanzado (figura 21B), y un paciente con cáncer de próstata en remisión (figura 21C) se analizaron por tinción con V α 24-PE y V β 11-FITC. La figura 21D es una gráfica de barras del porcentaje de células V α 24⁺ V β 11⁺ (media y desviación estándar) después de la expansión con α -GalCer de una serie (\geq 6) de donantes. Estos resultados también se resumen en las figuras 12-17.

Las figuras 22A-22E son gráficas que muestran la pérdida de respuestas de IFN- γ por linfocitos T NK invariantes de pacientes con cáncer de próstata. Las figuras 22A y 22B muestran la producción de IL-4 y DE IFN- γ , respectivamente, de una línea de linfocitos T NK invariantes derivada de un paciente con cáncer de próstata frente a un donante sano. Las figs. 22C y 22D son gráficas que resumen los resultados de la producción de citocinas por linfocitos T NK invariantes estimulados con CD1d y linfocitos T en masa estimulados con FA, respectivamente, a partir de una serie de pacientes con cáncer de próstata avanzado (●) y donantes sanos (□). La figura 22E es una gráfica de las proporciones

de IFN- γ /IL-4 (media más desviación estándar) de linfocitos T NK invariantes (parte superior) o linfocitos T en masa convencionales (parte inferior) a partir de donantes sanos y pacientes con cáncer de próstata avanzado.

"Cáncer + IL-12" son muestras de pacientes con cáncer de próstata avanzado tratados *in vitro* con IL-12.

5 La figura 23 es una tabla que ilustra el uso del anticuerpo 6B11 para determinar la frecuencia de linfocitos T restringidos para CD1d en pacientes con VIH.

10 La figura 24 es una tabla que ilustra el uso del anticuerpo 6B11 y el anticuerpo anti-V α 24 para determinar la frecuencia de linfocitos T restringidos para CD1d en pacientes con diabetes.

La figura 25A es una tabla que ilustra los genes que se expresan diferencialmente entre clones de linfocitos T NK ME 10 y GW4. Se enumeran los genes que pueblan los seis clústeres de expresión para las once categorías funcionales de genes. Cada gen se identifica por el número de acceso de GenBank (o identificador TIGR para designaciones de HT), seguido de un nombre común y el clúster específico en el que se clasifica (fila, columna). La figura 25B es una ilustración esquemática de un modelo para transcritos identificados cuya expresión discordante está de acuerdo con los fenotipos celulares observados. En un dibujo se representan los genes cuyos transcritos tienen funciones celulares claramente definidas y cuya expresión discordante entre GW4 y ME10 se relaciona con las diferencias fenotípicas establecidas. Los genes están relacionados por estar corriente abajo de PI-3 cinasa, en particular varios genes que regulan la supervivencia celular o bien se requieren para la transcripción génica regulada por calcio o flujo de calcio. Las copias promedio de moléculas de ARNm/millones de genes que se alteraron significativamente por tratamiento con anti-CD3 para GW4 (reposo, activado) y ME10 (reposo, activado), respectivamente, fueron: Itk, (49, 115) y (25, 19); GATA3, (13, 26) y (8, 11); Jun-B, (15, 118) y (14, 30); Jun-D, (107, 291) y (68, 130); NFAT4, (33, 35) y (64, 26); STAT4, (36, 29) y (76, 36); 14-3-3, (24, 45) y (83, 41); Bcl-XL, (11, 50) y (6, 7); y LAP, (14, 211) y (10, 41). Los genes seleccionados cuya expresión fue constitutiva expresada de forma discordante para GW4 frente a MW10 (GW4, ME10) fueron: NKR-P1A, (29, 459); y STAT1, (27, 79).

Las figuras 26A-26D son gráficas que muestran la inducción de la transcripción y la liberación de citocinas y enzimas citolíticas por linfocitos V α 24J α Q activados. Las figs. 26A y 26B comparan los cambios de la expresión de genes para citocinas y quimiocinas entre el clon de linfocito T V α 24J α Q GW4 (IL-4⁺) y el clon ME10 (IL-4-nula). Para cada transcrito individual, se muestra la intensidad de hibridación inducida por anti-CD3. El ARN se aisló, se amplificó y se hibridó a GeneChips que presentaban sondas para 250 genes of interés inmunológico (Affymetrix, San José, CA). Este chip está diseñado personalizado para el análisis cuantitativo incrementando el número de características tratadas para la detección de cada transcrito específico. Los valores para el número de copias de ARNm específico por millón después del tratamiento con control de IgG1 se representan por círculos abiertos: O, y sus correspondientes números de copias después de la activación con el tratamiento anti-CD3 por círculos cerrados: •. Los genes que se denominaron significativamente diferentes por un algoritmo de expresión génica y que cambiaron por al menos 2 veces se indican por una línea en negrita. La letra (A) denota que no se detectó el transcrito, y se debe señalar que los transcritos para MIP-1 α y MIP-1 β se suprimieron por estimulación anti-CD3 en el clon ME10. La figura 26C es una gráfica que muestra la cantidad de citocinas producidas por sobrenadantes a partir de diversos clones de linfocitos T V α 24J α Q, en base al análisis en ELISA cuantitativo. La figura 26D es una gráfica que muestra la expresión de CD40L. El clon de linfocito T BW5 se activó durante cuatro horas con estimulación de PMA/ionomicina y se analizó por citometría de flujo.

45 Las figuras 27A y 27B muestran la restricción para CD1d de la activación de linfocitos T V α 24J α Q. La figura 27A muestra la restricción de la liberación y proliferación de citocina. Los clones de linfocitos T se cultivaron conjuntamente con transfectantes de C1R (que expresaban CD1a, CD1b, CD1c o CD1d) o anti-CD3 unido a placa. IL-4, IFN- γ o la proliferación se sometió a ensayo como se describe en el presente documento. La figura 27B muestra la restricción de citolisis. El panel de transfectantes de C1R se examinó para detectar citolisis por clones de linfocitos T V α 24J α Q en ensayos de liberación de ⁵¹Cr de cuatro horas estándar.

La figura 28 A es una gráfica de la expresión de CD1d en células dendríticas mieloides, en base al análisis por citometría de flujo de células dendríticas cultivadas. La figura 28B es una imagen del análisis de inmunotransferencia de células dendríticas y células transfectantes de C1R de control (que expresaban CD1a o CD1d). Las figuras 28C-28J son imágenes de la tinción inmunohistoquímica de secciones en serie de una biopsia de ganglios linfáticos reactiva representativa (total de 10 biopsias). La figura 28C es una imagen de la tinción con hematoxilina-eosina a baja potencia, y la figura 28D es una imagen de tinción con anti-CD3. El cuadro enmarca la región a través de la que se tomaron secciones en serie para la tinción con los diversos marcadores mostrados en vistas con magnificación superior en las figuras 28E y 28F; (figura 28E) S100; (figura 28F) CD1d; (figura 28G) CD1a; (figura 28H) CD34. Se muestra la tinción de histiocitos sinusales (figuras 28I y 28K), y regiones parafoliculares (figuras 28L y 28M) para: hematoxilina-eosina, (figuras 28I y 28L); CD68, un marcador de macrófagos, (figuras 28J y 28M); y CD1d, (figuras 28K y 28N).

Las figuras 29A-29D son gráficas que caracterizan la citolisis de células dendríticas mieloides por linfocitos T V α 24J α Q. La figura 29A es una gráfica que muestra la lisis alogénica de células dendríticas inmaduras y maduras por

el clon de linfocito T V α 24J α Q GW4 en ensayos de liberación de cromo. Los haplotipos de los donantes fueron: 1) Clon GW4, A2, A24, B8, B38, Cw7, DR3, DQ2; 2) donante DC M, A2, A68, B7, B45, Cw6, Cw15; 3) donante DC O, A2, A24, B46, B60, DR14, DRw52, DQ1; 5) donante B, A1, A3, B7, B8, DRB1*1501, DRB5*0101, DQB1*0601. Las figuras 29B y 29C son gráficas de la citólisis autóloga y alogénica de células dendríticas por clones de linfocito T V α 24J α Q. La figura 29D es una gráfica de la anulación de citólisis por quelación de calcio e inhibición por adición del anticuerpo monoclonal anti-CD1d, 42.1. Los clones BW3 y BW5 se cultivaron conjuntamente con DC BW de sujeto en presencia o ausencia de EGTA y MgCl₂ (4 mM cada uno) o fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo monoclonal 42.1 o IgG de control a 100 μ g/ml. La figura 29E es una gráfica de barras que muestra la secreción de IL-4 y IFN- γ después del cultivo conjunto de clones de linfocito T V α 24J α Q OY3 y BW5 con DC autólogo.

La figura 30 es una ilustración esquemática de un modelo que demuestra la interacción de linfocitos T restringidos para CD1d con células dendríticas mieloides. La activación de linfocitos T V α 24J α Q invariantes da como resultado la secreción de citocinas y quimiocinas importantes para el reclutamiento y la activación de células dendríticas mieloides. Además, también se expresan moléculas coestimuladoras de la superficie celular importantes. Durante la maduración de las células dendríticas mieloides, CD1d está regulado por aumento y activa los linfocitos T restringidos para CD1d. Además de la secreción de citocinas y quimiocinas, los linfocitos T V α 24J α Q activados regulan por aumento perforina, granzima B y granulosisina. La secreción dependiente de CD1d de estas da como resultado entonces la lisis de las células dendríticas mieloides.

Descripción detallada

Se han desarrollado métodos para generar anticuerpos para los receptores de antígeno de linfocitos T (TCR) de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ (figura 1). La invención también proporciona anticuerpos purificados (como se define en las reivindicaciones) para TCR de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ que son útiles para aplicaciones de diagnóstico, de obtención de imágenes y terapéuticas para enfermedades o afecciones que están afectadas por el número y/o la actividad de linfocitos T o subpoblaciones de linfocitos T específicas. Los ejemplos de estas enfermedades o afecciones incluyen enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo y cáncer. La expansión *ex vivo* o *in vivo* de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ usando los anticuerpos de la invención se puede realizar sola junto con la administración de otros productos terapéuticos, tales como citocinas o vacunas tumorales.

El uso de un anticuerpo monoclonal anti-bucle CDR3 para la expansión de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ en lugar del uso de un antígeno, tal como α -GalCer, eliminaría el requisito de CPA autólogas, retirándolas como fuentes potenciales de variabilidad y simplificando en gran medida el procedimiento para ensayos clínicos. Además, el uso de un anticuerpo monoclonal (anticuerpo monoclonal) permitiría T la expansión específica de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T J α Q⁺ a diferencia de la expansión de linfocitos T policlonales no específicos de múltiples tipos celulares.

El receptor de antígeno de casi todos los clones individuales de linfocitos B y T es el producto de un reordenamiento somático aleatorio único. Estos reordenamientos provocan incluso que gemelos idénticos tengan millones de receptores que difieren entre sí. En contraste, el TCR invariante reactivo y selectivo para CD1d utilizado por la invención representa una diana universal única. Debido a que la secuencia del bucle CDR3 del TCR- α invariante es idéntica en todos los individuos, esta región se usa para generar anticuerpos monoclonales y policlonales novedosos que reconocen la cadena TCR- α invariante humana. Los anticuerpos monoclonales pueden identificar y expandir preferencialmente linfocitos T invariantes *ex vivo* a partir de donantes normales. Los métodos de expansión celular usando anticuerpos monoclonales de la presente invención proporcionan tamaños de población de aproximadamente $> 10^8$ linfocitos T invariantes en cultivos en masa y $> 10^7$ células para clones individuales empezando con 10-20 ml de sangre periférica. Sólo unas decenas de miles de linfocitos T invariantes han demostrado ser funcionales en experimentos de transferencia celular realizados en ratones (Sonoda *et al.*, *supra*). Por tanto, los ensayos clínicos de fase 1 humanos pueden incorporar un brazo de escalada de dosis, tal como, comenzar aproximadamente con 10^6 células, y dirigir una dosis máxima de 10^9 células. Se espera que las infusiones de este intervalos sean bien toleradas. Por ejemplo, las infusiones de leucocitos del donante emplear de manera rutinaria del orden de 10^{10} células no purificadas sin efectos secundarios significativos.

Además de su efecto antitumoral, los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺ pueden contribuir a las respuestas inmunitarias protectoras frente a patógenos intracelulares. Por ejemplo, descubrimos se descubrió que la respuesta inmunitaria a un virus citopático agudo (virus de la encefalomiocarditis, EMCV-D) es defectuoso en ratones inactivados con CD1d (Exley *et al.*, *J. Leuk Biol.* 69:713,2001). Estos resultados sugieren que los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en la prevención o tratamiento de una enfermedad infecciosa, incluyendo enfermedades provocadas por virus, bacterias, parásitos, hongos, protozoos u otros patógenos eucariotas.

Debido a que los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T J α Q⁺ pueden aumentar las respuestas

de desviación inmunitaria o Th1, Th2, dependiendo de las condiciones de estímulo, la respuesta de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$ se puede modular por la administración *in vivo* de una citocina antes, durante o después de la infusión de los linfocitos T NK expandidos *ex vivo* linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$ o bien conduciendo la expansión *ex vivo* de las células en presencia de una citocina, o una combinación de ambos métodos. Usando una citocina, tal como IL-12, IL-15 o IL-18, que se sabe que influye en los linfocitos T hacia las respuestas de Th1 se espera que incremente la eficacia de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y los linfocitos T $J\alpha Q^+$ en la prevención o tratamiento de cáncer, enfermedad infecciosa, alergia, asma, embarazo e inflamación. De forma alternativa, se puede usar cualquier otra citocina, tal como IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IFN- α/β , IFN- γ y GM-CSF, para influir en los linfocitos T hacia respuestas de Th2 para la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedad de injerto contra huésped para las que las respuestas de Th2 son protectoras. De forma alternativa, se puede usar la citocina para influir en los linfocitos T en contra de las respuestas de Th1 y Th2 y hacia las respuestas de desviación inmunitaria, lo que puede contribuir al mantenimiento del embarazo. Las respuestas de desviación inmunitaria incluyen la supresión de una respuesta inmunitaria en curso, tal como una respuesta en un sitio inmunitario privilegiado. TGF- β e IL-10 son ejemplos de citocinas que pueden participar en respuestas de desviación inmunitaria (Sonoda *et al.*, *supra*).

Además de su uso en la expansión de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ *ex vivo*, los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un mamífero, tal como un ser humano, para incrementar el número de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos $J\alpha Q^+$ *in vivo* para la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, alergias, asma, afecciones inflamatorias, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo o cáncer. Por ejemplo, se encontró una reducción en los niveles de determinados linfocitos T, tales como los linfocitos T NK invariantes en pacientes con cáncer de próstata, esclerosis múltiple, VIH y diabetes de tipo 1 (ejemplos 9, 11 y 12). Adicionalmente, se ha notificado previamente una reducción en el número de linfocitos T $V\alpha 24^+ CD161^+$ para pacientes con melanoma (Kawano *et al.*, Cancer Res. 59:5102, 1999) Por Tanto, la pérdida de la función de los linfocitos T NK invariantes puede ser un hallazgo general en el cáncer avanzado. De forma alternativa, se pueden usar anticuerpos que se unen e inhiben la expansión o una actividad de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$, tal como la producción de citocina o citotoxicidad, para inhibir la patogénesis de linfocitos T en un mamífero. Por ejemplo, una alergia puede estar provocada o exacerbada por la respuesta de Th2 de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$, y por tanto, la inhibición de la expansión o la respuesta de Th2 de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ puede ser útil en la prevención o tratamiento de esta afección. De forma similar, la reducción de la respuesta de Th1 de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ puede mejorar, estabilizar o prevenir enfermedades autoinmunitarias o prevenir los abortos espontáneos. La respuesta de Th1 inducida por agentes infecciosos, tales como los virus de la hepatitis, también puede provocar daños que se pueden minimizar por la inhibición de estas células. Ejemplos de algunos de los anticuerpos que pueden inhibir estas células incluyen moléculas monovalentes o Fab o anticuerpos que se conjugan con una toxina o radiomarcador que daña las células después de la unión del anticuerpo a las células. Los anticuerpos también se pueden unir a un TCR expresado en las células y prevenir la unión de un ligando al TCR.

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para aplicaciones de obtención de imágenes. En particular, los anticuerpos se pueden acoplar a un marcador fluorescente o radiomarcador para su uso en la visualización de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ o en muestras de biopsias, sangre y otro material o fluidos corporales. Los anticuerpos también se pueden usar para purificar los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ de estas muestras. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden unir a otros linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ que sean linfocitos T no invariantes y que sean más abundantes que los linfocitos T invariantes en algunos lugares, tales como la médula ósea y el hígado. El uso de un anticuerpo de la presente invención para purificar linfocitos T invariantes de una muestra de sangre periférica, en la que aproximadamente un 0,1 % de las células son linfocitos T invariantes, ha permitido el aislamiento de células que sean un 90-95 % linfocitos T invariantes. Se puede lograr una pureza incluso mayor usando múltiples rondas de purificación o usando múltiples anticuerpos por ronda.

Además, se puede lograr una pureza mayor o un mayor número de células poniendo en contacto también los linfocitos T con un antígeno y células presentadoras de antígeno (CPA). Se puede usar cualquier antígeno (por ejemplo, una proteína, péptido, lípido, carbohidrato, ácido nucleico, agente infeccioso o molécula pequeña) para los linfocitos T de interés. Ejemplos de posibles antígenos para los linfocitos T reactivos para CD1d incluyen antígenos de lípidos o glucosil-fosfatidilinositol de un patógeno infeccioso y α -GalCer. Otros posibles antígenos incluyen antígenos de péptidos y proteínas, tales como los presentados por una molécula de MHC de clase I o clase II.

Adicionalmente, se puede presentar un antígeno a un linfocito T de interés en ausencia de CPA. Por ejemplo, se puede usar una forma soluble, asociada a liposomas o inmovilizada de una molécula presentadora de antígeno (por ejemplo, CD1d, MCH de clase I o MCH de clase II) para presentar un antígeno (por ejemplo, un lípido o un péptido) a un linfocito T o una muestra que contiene un linfocito T de interés bajo condiciones que permitan la activación o expansión del linfocito T sin la presencia de una CPA. La molécula presentadora de antígeno que se usa puede ser una molécula natural o puede ser una molécula modificada química o genéticamente como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la molécula se puede expresar como una proteína de fusión, tal como una GST, proteína de unión a maltosa,

hexa-histidina, o proteína de fusión de región de Fc. Una molécula presentadora de antígeno expresada como una proteína de fusión que contiene un dominio de unión a membrana, dominio transmembrana o región hidrófoba se puede mezclar con moléculas de lípidos para formar un liposoma o micela que contenga la proteína de fusión. Este liposoma o micela que tiene una célula presentadora de antígeno sobre su superficie imita la capacidad de una CPA de presentar un antígeno a un linfocito T. De forma alternativa, se puede inmovilizar una molécula presentadora de antígeno sobre un soporte sólido, tal como cualquier superficie rígida o semirrígida. El soporte puede ser cualquier material insoluble en agua poroso o no poroso, incluyendo, sin limitación, membranas, filtros, chips, portaobjetos, láminas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, tiras, placas, barras, polímeros, partículas, micropartículas y capilares. Si se desea, el soporte puede tener una variedad de formas de superficie, tales como pozos, zanjas, alfileres, canales y poros, a los que se unen las proteínas.

Una molécula presentadora de antígeno que está en solución, inmovilizada sobre un soporte sólido o bien contenida en un liposoma o micela puede estar en contacto con un antígeno para la subpoblación de linfocitos T de interés bajo condiciones que permitan que la molécula presentadora de antígeno se una al antígeno. Después, este antígeno puede interactuar con los linfocitos T de interés, dando como resultado a la expansión y/o activación de los linfocitos T. Estos métodos en los que un linfocito T de interés se expande o se activa por un antígeno en ausencia de CPA pueden ser deseables en un marco clínico en el que las células adicionales, tales como las CPA pueden no ser deseables.

El uso de los anticuerpos de la invención para la cuantificación de linfocitos T invariantes por citometría de flujo tiene muchas ventajas sobre los métodos actuales. Los métodos actuales incluyen la citometría de flujo con menos anticuerpos específicos o bien un método basado en PCR, que implica sintetizar y amplificar ADNc correspondiente al ARNm que codifica la cadena TCR- α y comparar este ADNc amplificado con el de un clon de linfocito T invariante y un clon de linfocito T de control, como se describe en el ejemplo 6. El método de citometría de flujo tiene la ventaja de determinar el número total de linfocitos T invariantes; mientras que el método basado en PCR sólo determina la frecuencia relativa de los linfocitos T invariantes en una muestra. Además, la citometría de flujo permite la determinación de los marcadores que se expresan en los linfocitos T invariantes. El método de citometría de flujo también es un método más sencillo y rápido que se puede realizar aproximadamente en una hora en comparación con aproximadamente un día para el método de PCR y que no requiere habilidad en las técnicas de biología molecular. Por tanto, el método de citometría de flujo que usa los anticuerpos de la presente invención puede ser más deseable en un marco clínico. También se pueden usar métodos similares para cuantificar otros linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ usando los anticuerpos de la presente invención.

Adicionalmente, se pueden usar los anticuerpos en el diagnóstico de un sujeto que tiene o que corre el riesgo de una enfermedad. Como se describe en los ejemplos 6, 9 y 10, se pueden usar los anticuerpos para cuantificar el número de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ y para aislar estas células para la medida de sus actividades de producción de citocina y citotoxicidad. Estos parámetros se pueden comparar entre los sujetos y los sujetos que tienen y/o que no tienen la condición para diagnosticar el riesgo de, la presencia de, la gravedad de, el estadio de, la recuperación de, o la remisión de una afección.

Se debe entender que los métodos descritos en los siguientes ejemplos se pueden aplicar a linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d, linfocitos T $J\alpha Q^+$ y/o linfocitos T invariantes.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos para una cadena alfa de receptor de antígeno de linfocitos T NK humanos

Debido a que todos los linfocitos T TCR⁺ invariantes de todos los individuos tienen la misma secuencia de aminoácidos en el bucle CDR3, se usó esta región en el diseño de péptidos para la generación de anticuerpos anti-bucle CDR3. Debido a que la secuencia murina y la humana del bucle CDR3 son casi idénticas (CVVSDRGST y CVVGDRGSA; SEQ ID N.º 2 y 3, respectivamente), un péptido con la secuencia de bucle CDR3 humana que se administra a ratones podría ser reconocido por el sistema inmunitario murino como un péptido propio y, por lo tanto, no inducir la producción de anticuerpos.

Para solucionar este problema potencial, se usaron ratones inactivados en CD1d (Sonoda *et al.*, *supra*) que carecen de linfocitos T TCR⁺ como el huésped para la producción de anticuerpos anti-bucle CDR3. Dado que estos ratones carecen de la cadena TCR- α invariante pueden reconocer péptidos que contienen la secuencia de bucle CDR3 humana como exógena y, por tanto, generar anticuerpos contra este epítipo.

Para la producción de anticuerpos e hibridomas, se usó un péptido (CVVSDRGSTLGRLADCG, SEQ. ID N.º 1) con una secuencia de aminoácidos correspondiente a una porción del bucle CDR3 de la cadena TCR- α invariante humana. Se cicló este péptido por reacción del grupo amino N terminal con el grupo carboxilo C terminal. Se acopló el péptido cíclico a un transportador de hemocianina de lapa de california y se administró a ratones inactivados en CD1d, usando técnicas estándar. Se administró el péptido acoplado a seroalbúmina bovina como inyecciones de refuerzo. Después, se administraron linfocitos T TCR⁺ invariantes a algunos ratones para estimular adicionalmente el sistema inmunitario. Se sometió a prueba el suero de los para determinar los anticuerpos que se unieron al péptido acoplado a

5 ovoalbúmina, usando un ensayo de ELISA estándar. Se generaron hibridomas de bazos de ratones seropositivos usando técnicas estándar. Además se sometieron a prueba pocillos de hibridoma positivos de ELISA por FACS para comparar la unión de los anticuerpos a clones $V\alpha 24J\alpha Q$ frente a los controles negativos. Las células productoras de anticuerpos que se unieron a los clones $V\alpha 24J\alpha Q$ pero no a los controles negativos se clonaron y fusionaron a células de bazo inmunitarias usando técnicas estándar. Después, se identificó un grupo de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales que reconocieron específicamente el péptido usando el ensayo de ELISA. Exámenes selectivos posteriores de los clones que reconocieron la cadena TCR- α invariante expresada en linfocitos T NK intactos implicaron la clonación repetitiva del hibridoma, el ensayo por FACS para determinar la unión a células que expresaban la cadena TCR- α invariante pero no los controles negativos, y la confirmación de la unión específica al péptido por ELISA. Se pueden usar estos clones de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales estables por un experto en la técnica para la producción y purificación de la calidad y cantidad en el ensayo clínico de estos reactivos de anticuerpos monoclonales.

15 Se identificaron dos anticuerpos (3A6 y 6B11) que reconocen preferencialmente linfocitos T invariantes humanos (figura 2). 6B11 es una IgG1, y 3A6 es una IGM. Para demostrar que 6B11 no era exclusivamente un anticuerpo monoclonal $V\alpha 24$, se usó FA para expandir linfocitos T $V\alpha 24^+$ en masa purificados por FACS. Después, se analizaron estas células con anticuerpos monoclonales $V\alpha 24$, $V\beta 11$ y 6B11 (figura 3). Los resultados demuestran que 6B11 reconoce una pequeña fracción de linfocitos T $V\alpha 24^+$, similar al anticuerpo monoclonal $V\beta 11$. Adicionalmente, se realizó una clasificación celular individual de múltiples donantes y dio como resultado el establecimiento de clones de linfocitos T $6B11^+$. También se demostró que 6B11 inducía respuestas de citocinas idénticas a las dianas de $CD1d^+$.

25 Este método para la producción de anticuerpos reactivos con un bucle CDR3 también se puede realizar para cualquier TCR de interés. Se puede determinar la secuencia del bucle CDR3 de una cadena TCR- α o de una cadena de interés en base a un alineamiento de secuencias con otras cadenas de TCR- α o cadenas β o en base a una estructura tridimensional determinada experimentalmente de la cadena TCR- α o la cadena β de interés (Johnson y Wu, Nuc. Acid. Res. 29 (I): 205-206,2001; <http://immuno.bme.nwu.edu>). Se puede usar un péptido cíclico que contenga la secuencia de este bucle CDR3 como el péptido antigénico para la producción de anticuerpos reactivos con el bucle CDR3, como se describe anteriormente. Se puede administrar este péptido cíclico a un animal (por ejemplo, un animal de laboratorio o un animal de interés veterinario) en una o más dosis. Para potenciar adicionalmente la producción de anticuerpos, también se pueden administrar los linfocitos T de interés al animal. Ejemplos de mamíferos que se pueden usar para la producción de anticuerpos incluyen ratones, ratas, conejos, cerdos, cabras, ovejas, caballos y ganado vacuno. Ejemplos de aves que se pueden usar incluyen pollos y pavos. Los animales huésped pueden ser animales genéticamente intactos, o pueden ser animales que tengan un nivel reducido o que carezcan de la subpoblación de linfocitos T para la que se genera el anticuerpo. Otros animales que se pueden usar incluyen animales que, de forma natural, a través de modificación genética, o por disminución, carecen de los linfocitos T. También se puede usar cualquier otro animal que pueda producir anticuerpos para la producción de anticuerpos de la invención.

40 Se pueden usar los anticuerpos resultantes para aplicaciones de diagnóstico o clínicas que implican otros animales del mismo género o especie que el animal huésped usado para la producción de anticuerpos. Adicionalmente, se pueden usar los anticuerpos de la invención en aplicaciones que impliquen animales de un género diferente del animal huésped. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos que se produzcan en pollos para el tratamiento o prevención de enfermedad en otros pollos o en otras aves.

45 Para generar anticuerpos para el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección particular, se puede usar el bucle CDR3 de una subpoblación de linfocitos T que esté asociado con esa enfermedad o afección (véase, por ejemplo, la tabla 1). Por ejemplo, se pueden usar subpoblaciones de linfocitos T que estén presentes en niveles incrementados o disminuidos o que tengan una actividad incrementada o disminuida en sujetos con una enfermedad o afección relacionada con la correspondiente subpoblación de linfocitos T en sujetos de control sin la enfermedad o afección para la generación de anticuerpos de la invención. Adicionalmente, se pueden aislar linfocitos T a partir de una muestra (tal como una muestra de biopsia) obtenida de un sujeto con una enfermedad o afección. Se puede determinar la identidad de las subpoblaciones de linfocitos T en la muestra usando técnicas estándar, tales como por análisis de FACS usando anticuerpos reactivos con diversos marcadores de linfocitos T o por secuenciación de las cadenas de TCR- α o cadenas β . Se puede usar el bucle CDR3 de una subpoblación de linfocitos T aislada para la producción de anticuerpos. Se pueden administrar estos anticuerpos a sujetos con la enfermedad o afección (incluyendo el sujeto original a partir del que se aisló la subpoblación de linfocitos T así como otros sujetos con la afección) para modular el número y/o actividad de linfocitos T relevantes *in vivo*. También se pueden usar los anticuerpos para la expansión *ex vivo* de los linfocitos T relevantes seguido de una readministración de los linfocitos T expandidos al sujeto.

60 También se pueden generar los anticuerpos de la invención para cualquier subpoblación de linfocitos T oligoclonalmente expandida específica de antígeno en animales (por ejemplo, seres humanos, otros mamíferos y aves) en respuesta a los retos antigénicos dados. Estos subgrupos de linfocitos T incluyen los linfocitos T oligoclonalmente expandidos en respuesta a un componente inmunodominante del antígeno en múltiples individuos. Por ejemplo, se puede administrar un antígeno de interés a un animal, y se pueden aislar los subgrupos de linfocitos T oligoclonalmente expandidos que se generan por esta administración y usar para la producción de anticuerpos como

se describe en el presente documento.

Tabla 1. Citas de los receptores de linfocitos T que se pueden usar para generar anticuerpos para aplicaciones clínicas que implican la enfermedad o afección indicada.

Enfermedad/Afección	Cita
Esclerosis múltiple	Wucherpfennig <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 175:993-1002 (1992).
Patógenos medioambientales/Promoción de tolerancia oral	Blumberg <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 150:5144- 5153 (1993).
Colitis ulcerosa	Chott <i>et al.</i> , <i>J. Immunol</i> 156:3024:3035, (1996).
Colitis ulcerosa	Shigematsu <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Lab. Immunol.</i> 48:177-186(1996).
Enfermedad inflamatoria intestinal crónica	Probert <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 157:3183-3191 (1996).
Antígenos	Porcelli <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 178:1-16 (1993).
Artritis reumatoide	Fitzgerald <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 154:3538- 3547 (1995).
Artritis reumatoide	Sottini <i>et al.</i> , <i>J. Autoimmun.</i> 6:621-637 (1993).
Artritis reumatoide	Hingorani <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 156:852-858 (1996).
Polimiositis	Bender <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 181:1863-1868 (1995).
Arteritis de células gigantes	Grunewald <i>et al.</i> , <i>Arthritis Rheum.</i> 37:1221-1227 (1994).
Trasplante de médula ósea	Gorochov <i>et al.</i> , <i>Blood</i> 83:587-595 (1994).
Esclerosis sistémica	Kuwana <i>et al.</i> , <i>J. Immunol</i> 158:485-491 (1997).
Leishmaniosis humana	Uyemura <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 151:7095- 7104(1993).
Leucemia linfocítica crónica B	Farace <i>et al.</i> , <i>J. Immunol</i> 153:4281-4290 (1994).
Mieloma múltiple y paraproteinemia	Moss <i>et al.</i> , <i>Blood</i> 87:3297-3306 (1996).

5

Ejemplo 2: Aislamiento y expansión de linfocitos T invariantes humanos con anticuerpo monoclonal

La figura 4 muestra que se puede usar anticuerpo monoclonal 6B11 unido a la plaza para lograr una expansión selectiva de linfocitos T invariantes. El análisis de más de 20 clones y 15 líneas derivadas de 15 donantes sanos usando 6B11 DE de este modo ha producido resultados totalmente consistentes: 100 % de estos fueron $V\alpha 24^+ V\beta 11^+ CD161^+$, altamente reactivos para CD1d, productores altos de IL-4 y productores modestos de IFN- γ (tabla 2). Este resultado demuestran además la especificidad de estos anticuerpos monoclonales y su uso como una alternativa más definitiva y de un solo color que no requiere CPA autólogas, lo que no sería deseable en el contexto de un ensayo clínico.

10

15

Tabla 2. Porcentaje de células que expresan marcadores de linfocitos T NK invariantes y que producen citocinas después de la expansión de líneas de linfocitos T o de clones de linfocitos T con el anticuerpo 6B11.

Donantes	Células	$V\alpha 24^+$	$V\beta 11^+$	$CD161^+$	reactivo para CD1d	IL-4	IFN- γ
12 líneas de linfocitos T	15	10-100	10-100	10-100	100	100	10-100
3 clones de linfocitos T	20	100	100	100	100	100	65

El anticuerpo monoclonal 6B11⁺ también se usó solo (2 donantes, 10 clones) o emparejado con el anticuerpo anti- $V\alpha 24$ (9 donantes, 87 clones) para clonar linfocitos T invariantes adicionales por clasificación celular individual. Se confirmó que todos los clones eran linfocitos T restringidos para CD1d invariantes. Todos estos clones también contenían la cadena TCR- α invariante, en base al análisis de secuencia de la cadena TCR- α . Adicionalmente, todos los clones estaban restringidos para CD1d (Exley *et al.*, *J. Exp. Med.* 186:109,1997). En algunos donantes hay un número muy pequeño de linfocitos T 6B11⁺ y CD3⁺. Los dos donantes para los que se usó el anticuerpo 6B11 para purificación de linfocitos T no tenían esta población. Uno de estos donantes tenía un 0,01 % de células $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ en su sangre periférica. La generación de 6/6 linfocitos T restringidos para CD1d $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ de este individuo pone de relieve la especificidad de 6B11. La probabilidad de 6/6 clones $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ basada en el azar es de $(10^{-4})^6$. Como se ilustra en las figuras 6A-6C, el anticuerpo 6B11 también estimula la secreción de IL-4 de las líneas de linfocitos T restringidos para CD1d.

20

25

30

Adicionalmente, el uso del anticuerpo 6B11 en una etapa de clasificación de FACS o bien de purificación por inmunoafinidad de perlas magnéticas seguido de la expansión en presencia de un mitógeno dio como resultado el aislamiento de linfocitos T NK invariantes (véase, por ejemplo, las figuras 8, 9, 10A-10H y 11A-11F). Empezando con PBMC en las que aproximadamente un 0,05 % de los linfocitos T en las PBMC son linfocitos T invariantes,

aproximadamente un 5 - 30 % de las células purificadas y expandidas fueron linfocitos T invariantes.

5 El anticuerpo 6B11 ha reconocido clones y líneas de linfocitos T NK invariantes de todos los donantes que se han sometido a prueba, incluyendo más de 100 sujetos de distintas etnias y grupos de edad (véase, por ejemplo, las figuras 8B-8I). Este anticuerpo también ha reconocido los linfocitos T NK invariantes en ambos sujetos hombres y mujeres, incluyendo sujetos diagnosticados con cáncer y sujetos no diagnosticados con cáncer. Estos resultados demuestran que la capacidad del anticuerpo 6B11 para reconocer linfocitos T NK invariantes no se limita a una población particular de pacientes.

10 Se comparó la capacidad del anticuerpo 6B11 para expandir linfocitos T NK invariantes con la de células dendríticas autólogas pulsadas con α -GalCer. Para esta comparación, se expandieron células clasificadas con 'MoFlo' V α 24 con células dendríticas autólogas pulsadas con α -GalCer, anticuerpo monoclonal 6b11 o mitógeno (FA) durante una expansión de aproximadamente cuatro semanas en presencia de IL-2. Como se ilustra en las figuras 7A-7C, la expansión de linfocitos T NK invariantes usando el anticuerpo 6B11 fue similar a la lograda usando α -GalCer. Sin embargo, la expansión usando el anticuerpo 6B11 tiene la ventaja de que no requiere CPA.

Ejemplo 3: Métodos ejemplares para el aislamiento y la expansión de linfocitos T de interés

20 Para la purificación de una subpoblación de linfocitos T de interés, se puede realizar una etapa de selección positiva y/o negativa. Los ejemplos de anticuerpos que se pueden usar en una etapa de selección positiva incluyen los anticuerpos 6B11, 3A6, anti-V α 24, anti-V β 11 y anti-CD161.

25 Los linfocitos T de interés también se pueden enriquecer usando una etapa de selección negativa que retira algunos de los linfocitos T no deseados o que retira otros contaminantes de una muestra. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo anti-CD8 y/o un anticuerpo anti-CD4 para enriquecer a una muestra de linfocitos T NK invariantes. Se puede realizar una etapa de selección negativa antes de, simultánea a o posterior a una etapa de selección positiva.

30 Se puede realizar una etapa de selección positiva y/o negativa antes de o después de una etapa de expansión de linfocitos T. En un posible método, en primer lugar se purifican los linfocitos T de interés y después se expanden de forma selectiva. En otro posible método, se purifican los linfocitos T expandidos usando una columna de alta capacidad (por ejemplo, 10^{10} células mononucleares de sangre periférica de paciente de cáncer expandidas (PBMC) podrían proporcionar 10^6 linfocitos T NK invariantes después de Miltenyi a gran escala u otras etapas de purificación de columna).

35 Los ejemplos de posibles etapas de purificación positivas se enumeran a continuación. Estos métodos se pueden usar con anticuerpos de la invención que son reactivos con cualquier subpoblación de linfocitos T de interés.

Procedimiento de FACS ejemplar

40 Se bloquea PBMC u otra fuente de tejido con suero autólogo a 4 °C. Se añade un anticuerpo reactivo con linfocitos T invariantes (por ejemplo, anticuerpo 6B11 o 3A6) en una proporción de aproximadamente 1 - 10 μ g de anticuerpo/ 10^{7-8} PBMC y se incubó durante 20 minutos a 4 °C. El anticuerpo usado en este método se puede marcar directamente con un conjugado, tal como FITC o biotina, o el anticuerpo se puede marcar indirectamente con un segundo reactivo (por ejemplo, anti-IgG-fluorocromo o estreptavidina-fluorocromo). También se pueden añadir uno o más anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos (figuras 7A-7C y 9). Después se lava la solución de células y anticuerpos usando PBS o cualquier otro tampón fisiológico para retirar el anticuerpo no unido.

50 Si se desea, se pueden ajustar los ajustes del clasificador celular FACS usando un anticuerpo de control positivo (por ejemplo, anticuerpo anti-linfocito T general) o bien negativo. Se puede analizar la muestra de interés a una tasa de aproximadamente 100 millones de células por hora usando un clasificador de FACS de alta velocidad (por ejemplo, clasificador FACS 'MoFlo'). Se pueden expandir los linfocitos T purificados en medio de linfocitos T [por ejemplo, 10 % de suero fetal bovino o suero autólogo humano o combinado AB en RPMI-1640 o medio equivalente complementado con tampón (por ejemplo, Hepes), glutamina y antibiótico (por ejemplo, gentamicina)] en presencia de un mitógeno, tal como FA, un anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo 6B11, el anticuerpo 3A6 y/o anticuerpo monoclonal CD3 con estímulo antigénico de α -GalCer (Exley *et al.* 1997 y 1998, *supra*; Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998). El anticuerpo puede estar en solución o unido a la placa. También se pueden añadir inmediatamente alimentadores autólogos irradiados e IL-2 (10 - 100 U/ml) o añadir en cualquier momento durante la expansión. La IL-7 (~1-10 ng/ml) y/o IL-15 (~1-10 ng/ml) pueden incrementar los rendimientos de los linfocitos T NK invariantes (por ejemplo, Wilson *et al.* 1998, *supra*; van der Vliet *et al.* Journal of Immunological Methods 247:61-72, 2000). La dexametasona o un agente inmunosupresor selectivo relacionado (~1 μ M) puede potencial preferentemente el crecimiento de linfocitos T NK invariantes mientras que inhibe el crecimiento de linfocitos T convencionales (por ejemplo, Milner *et al.*, J. Immunol. 163 (5): 2522-25229, 1999). El medio se reemplaza aproximadamente dos veces por semana con medio recién preparado. Durante o posterior a la expansión (por ejemplo, 2-4 semanas después de que la expansión haya comenzado), los linfocitos T se pueden analizar fenotípicamente por FACS. Este análisis se puede realizar por tinción con anticuerpos 6B11, 65 anti-V α 24, anti-V β 11, anti-CD4, anti-CD8 $\alpha\beta$ o anti-CD161.

Procedimiento de perlas magnéticas ejemplar

Se bloquea PBMC u otra fuente de tejido con suero autólogo al 1 - 10 % mezclando a 4 °C en PBS u otro tampón fisiológico. Se añaden uno o más anticuerpos que son reactivos con linfocitos T invariantes (por ejemplo, anticuerpos 6B11 o 3A6) en una proporción de aproximadamente 1-10 µg de anticuerpo monoclonal/10⁷⁻⁸ PBMC se incuban durante 20 minutos a 4 °C. El anticuerpo usado en este método se puede marcar directamente con un conjugado, tal como FITC o biotina, o el anticuerpo se puede marcar indirectamente con un segundo reactivo (por ejemplo, anti-IgG-fluorocromo o estreptavidina-fluorocromo). También se pueden añadir uno o más anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos (figuras 7A-7C y 9). Después se lava la solución de células y anticuerpos usando PBS o cualquier otro tampón fisiológico. Se añaden perlas magnéticas, tales como ~ 10 - 100 µl de microperlas de MACS de IgG anti-ratón de Miltenyi n.º 484 o microperlas de estreptavidina de MACS n.º 481 por 10⁷⁻⁸ PBMC; 10⁵⁻⁷ perlas anti-IgG de Dynal n.º M450 por 10⁷⁻⁸ PBMC, y se mezcla la solución a 4 °C. Se aíslan las perlas usando imanes y después se lavan de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes (por ejemplo, usando columnas de separación de tipo MS de Miltenyi, tales como el producto número 130-042-201 y MACS multistand, o perlas de Dynal directamente en tubos en Dynal o imanes comparables). Se colocan las células purificadas, lavadas, dentro de multi-pocillos con medio de linfocitos T [10 % de suero fetal bovino o autólogo humano o combinado AB en RPMI-1640 o medio equivalente complementado con tampón (por ejemplo, Hepes), glutamina y antibióticos (por ejemplo, gentamicina)]. Se pueden expandir las células usando un anticuerpo monoclonal que se une directamente a las perlas o en solución.

Adicionalmente o de forma alternativa, se pueden expandir las células usando medio que está complementado con un mitógeno, tal como FA, un anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo 6B11, el anticuerpo 3A6 o el anticuerpo monoclonal CD3 con estímulo antigénico con α -GalCer. El anticuerpo puede estar en solución o unido a la placa, perla u otra superficie sólida. Como se describe anteriormente, otros diversos reactivos, tales como IL-7, IL-15 y dexametasona, pueden mejorar el rendimiento del producto y/o la pureza. Los linfocitos T expandidos se pueden analizar fenotípicamente como se describe anteriormente.

Ejemplo 4: Purificación con perlas magnéticas de linfocitos T invariantes

Las figuras 10A-17 Ilustran la capacidad de estos métodos de purificación de perlas magnéticas para generar un gran número de linfocitos T invariantes purificados. En particular, se unió el anticuerpo 6B11 a (1) perlas de poliestireno, superparamagnéticas de Dynal con IgG antirratón de cabra purificada con afinidad unida covalentemente a la superficie (IgG antirratón de cabra M-450 Dynabeads®, producto número 110.05) o bien (2) microperlas superparamagnéticas coloidales MACS de Miltenyi conjugadas con IgG antirratón de cabra (producto número 484-02, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (prospecto de IgG antirratón de cabra M-450 Dynabeads®; instrucciones de microperlas de IgG antirratón de cabra de MACS). Se enriquecieron las células PBMC por linfocitos T invariantes por purificación usando perlas 6B11-Dynal o 6B11-Miltenyi. Después se expandieron las células purificadas durante de cuatro a ocho semanas bajo diversas condiciones. Por ejemplo, se expandieron los linfocitos T en presencia de uno o más de los siguientes como se indica en las figuras 12-17: FA, el anticuerpo 6B11, IL-5, IL-7, CPA alogénica y CPA autóloga. La columna de "PBMC" representa células de PBMC que no se clasificaron antes de la expansión. La columna "Dynal@40" representa células de PBMC que se purificaron usando perlas de 6B11-Dynal antes de la expansión. La columna "Miltenyi @ 20" representa células de PBMC que se clasificaron usando perlas de 6B11-Miltenyi antes de la expansión.

En los experimentos descritos en las figuras 12-17, la adición de IL-7 e IL-15 incrementó el rendimiento de linfocitos T invariantes. A las concentraciones sometidas a prueba, IL-7, IL-15 y dexametasona no incrementaron la pureza de los linfocitos T invariantes. La expansión usando α -GalCer después de la expansión usando 6B11 no mejoró la pureza de los linfocitos T invariantes pero sí incrementó el número de linfocitos T invariantes. Ni limitando (6B11⁺ CD161) o (CD3⁺ CD161) se incrementó el rendimiento de linfocitos T NK invariantes (figuras 12-17).

También se purificaron los linfocitos T invariantes usando 6B11 biotinilado. Para este procedimiento, se incubaron PBL purificados con ficoll con 6B11-biotina. Después, se lavaron las células para retirar el anticuerpo no unido y se incubaron con estreptavidina conjugada con microesferas de Miltenyi. Se aislaron las células 6B11⁺ por selección de perlas magnéticas de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se generaron un total de 6 líneas usando el anticuerpo 6B11 en combinación con IL-2 e IL-1. Se expandieron tres de las seis líneas y tuvieron un fenotipo de superficie consistente con linfocitos T restringidos para CD1d V α 24⁺ invariantes. Las líneas variaron desde 76 % - 99 % invariante después de la expansión. Se muestra un perfil de FACS de la línea pura en la figura 18. Esta clonación y expansión exitosa de linfocitos T invariantes demuestra que se puede usar 6B11 en combinación con la tecnología MACS™ para aislar linfocitos T restringidos para CD1d directamente de la sangre sin necesidad de protocolos de clonación basada en FACS ni alimentadores irradiados.

Ejemplo 5: Tratamiento con citocina *ex vivo* o *in vivo* para alterar la proporción de respuesta de desviación inmunitaria/Th1/Th2 de linfocitos T NK

65

Aunque no se pretende limitar la invención a una teoría particular, una hipótesis de trabajo es que los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ que producen niveles altos de IL-4 (posiblemente junto con otras citocinas "Th2") influyen hacia respuestas inmunitarias de Th2, mientras que la IL-12 alta (inducida a partir de CPA por linfocitos T reactivos para CD1d activados) y/o IFN- γ (producido por los propios linfocitos T) con relación a IL-4 conducirán (o al menos serán un marcador de linfocitos T invariantes que conducirán) a respuestas inmunitarias contra tumores o patógenos infecciosos.

Los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ pueden influir hacia la citotoxicidad de tipo células asesinas activadas por linfocina (LAK) o NK de tipo Th1 de linfocitos T invariantes, así como la producción de IFN- γ para aumentar potencialmente su actividad antipatógena o antitumoral in vivo. La viabilidad de este enfoque se demuestra por el hallazgo de que la influencia de IL-4 inicial de los linfocitos T invariantes se puede alterar por expansión *ex vivo* en IL-12, lo que da como resultado niveles notablemente superiores de IFN- γ con relación a IL-4, haciendo de éste un método sencillo prometedor para la generación de linfocitos T invariantes influenciados por Th1 (tabla 3). Recientemente se han publicado resultados confirmatorios que muestran que el cultivo en IL-12 aumenta tanto la producción de IFN- γ como, de manera significativa, la citotoxicidad de tipo NK/LAK de linfocitos T invariantes (van der Vliet *et al.*, Immunology 98:557-63, 1999).

Tabla 3. Producción de IFN- γ potenciada por linfocitos T NK invariantes incubados con IL-12.

		Proliferación	IL-4	IFN- γ	IFN- γ /IL-4
línea 1	sin IL-12	36239	1,4	60,4	43,1
	+IL-12	56593	4,8	>500	>100
línea 2	sin IL-12	21858	1,1	18,1	16,5
	+IL-12	42499	1,6	331,8	207

Se establecieron líneas de linfocitos T $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ reactivos para CD1d con y sin IL-12 y se estimularon con anticuerpo CD161 en exceso y anti-CD3 unido a la placa limitante para estimular específicamente linfocitos T NK invariantes.

Por tanto, se pueden repolarizar linfocitos T invariantes para el fenotipo Th1 cultivando en IL-12 0,3 nM (Exley *et al.*, *supra* (1998)) durante expansión *ex vivo* con un anticuerpo de la presente invención. IL-15, IL-18 e INF de tipo 1 también son conocidos por potenciar la polarización Th1 de linfocitos T humanos. Otras citocinas o combinaciones de citocinas que pueden influir en los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ hacia respuestas de desviación inmunitaria, Th1 o Th2, incluyen IL-2, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL 15, IL-18, IFN- α/β , IFN- γ y GM-CSF. La respuesta Th2 puede ser deseable para la prevención o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. De forma alternativa, para el mantenimiento del embarazo, se pueden usar citocinas para influir en linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ hacia respuestas de desviación inmunitaria en lugar de respuestas Th1 o Th2. Los anticuerpos anti-IL-4 o anti-IL-12 que se unen a las citocinas producidas por los linfocitos T durante la expansión también pueden favorecer la desviación inmunitaria o la respuesta Th2 de estos linfocitos T. Estas citocinas se pueden presentar durante todo el período de tiempo de la expansión de linfocitos T o pueden estar presentes sólo durante una parte del período de tiempo de la expansión de linfocitos T, tal como durante los últimos días de la expansión de linfocitos T.

Después de la expansión en presencia de una o más de estas citocinas, los linfocitos T se pueden someter a prueba funcionalmente para determinar la secreción de L-4, IL-10, GM-CSF e IFN- γ . También se puede determinar la regulación de la citotoxicidad contra CD1d⁺ (CIR, CD1d), dianas 'NK' (JY, K562,721.221 y YAC-1), dianas LAK por suplementación con citocinas (Exley *et al.*, *supra* (1997); Exley *et al.*, J. *supra*, (1998)).

De forma alternativa, se pueden administrar *in vivo* una o más de las citocinas a los pacientes antes, durante o después de la reintroducción de los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ expandidos *ex vivo* para influir a las células reintroducidas hacia respuestas de desviación inmunitaria, Th1 o Th2.

Ejemplo 6: Determinación del cambio en el número o la actividad de linfocitos T invariantes inducidos por un tratamiento para el tratamiento o prevención de enfermedad

Se pueden usar los anticuerpos monoclonales de la presente invención en un método sensible y específico para determinar si un tratamiento para el tratamiento o prevención de una enfermedad incrementa el número y/o una preferencialmente o modula la función de linfocitos T invariantes. En contraste, el análisis usado previamente para determinar el efecto del tratamiento anti-cáncer de IL-12 in vivo sobre linfocitos T invariantes se ha realizado con el método relativamente insensible de citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal $V\alpha 24$, en algunos casos junto con el anticuerpo monoclonal $V\beta 11$, lo que no ha detectado un incremento en linfocitos T invariantes (n = 10) (figura 5). Dado el bajo número de linfocitos T invariantes en donantes sanos y el número incluso menor que se ha encontrado en

pacientes con cáncer avanzado, se puede usar el método descrito a continuación para determinar con más precisión el efecto del tratamiento con IL-12, u otros tratamientos, sobre linfocitos T invariantes. Se pueden determinar los efectos de dosis acumulativas en linfocitos T invariantes realizando este análisis después de cada dosis.

5 Los pacientes pueden servir como sus propios controles en estos experimentos. Se pueden obtener aproximadamente 20 ml de sangre periférica de los pacientes antes de que se inicie el tratamiento y posteriormente durante el tratamiento. Se puede usar una pequeña alícuota de estas células (aproximadamente 10^6 células) para la síntesis de ADNc, correspondiente a ARNm que codifica la cadena TCR- α , y la amplificación por PCR usando cebadores de Ca y $V\alpha 24$ para determinar la frecuencia de las células que expresan la cadena de TCR- α invariante. Se puede determinar
10 la fracción de TCR invariante en la población total por calibración con un clon de linfocito T invariante diluido en serie en un clon de linfocito T de control.

Como alternativa al análisis de PCR anterior, se puede usar citometría de flujo para determinar la frecuencia y el número de linfocitos T invariantes. Debido al bajo número implicado, en particular en pacientes con cáncer, se usa un número mínimo de condiciones y un gran número de acontecimientos analizados (100.000) para cada muestra. Se pueden anticuerpos monoclonales anti-bucle CDR3 6B11 y/o 3A6, que se han conjugado exitosamente con fluoresceína usando métodos estándar, en un análisis de FACS de 1 ó 2-colores sencillo. Adicionalmente, se puede usar FACS multi-color para el análisis simultáneo de la cadena de TCR- α invariante usando uno o más anticuerpos monoclonales de la presente invención y anticuerpos para otros marcadores de linfocitos T invariantes ($V\alpha 24$, CD4, CD8, CD56, CD161, $V\beta 11$). Se pueden comparar estos resultados para las muestras de pacientes antes y después del tratamiento para determinar el efecto del tratamiento sobre el número de linfocitos T invariantes. Se puede evaluar la producción de citocinas y la citotoxicidad por células activadas, como se describe en el ejemplo 5. S pueden normalizar los resultados para el número de linfocitos T invariantes, permitiendo comparaciones directas para pacientes antes y después del tratamiento.
25

De forma alternativa, se puede requerir una ronda de expansión para la cuantificación. La muestra del paciente se pueden someter directamente a la expansión de anticuerpo monoclonal o la muestra se puede enriquecer por linfocitos T invariantes por clasificación de FACS de alta velocidad o purificación de perlas magnéticas antes de la ampliación, usando procedimientos estándar. Para el enriquecimiento por clasificación de FACS, se puede realizar la clasificación de un color usando anti- $V\alpha 24$, 6B11 o 3A6 o clasificación de 2 colores usando 6B11 o 3A6 y anti- $V\alpha 24$, $V\beta 11$ o CD161. De forma alternativa, para el enriquecimiento de la purificación por inmunofluorescencia, se pueden llevar a cabo una o más selecciones negativas o positivas. Por ejemplo, se puede usar una disminución negativa para retirar monocitos y/o linfocitos B. Después, se pudo realizar una selección positiva usando el anticuerpo monoclonal $V\alpha 24$ y/o un anticuerpo monoclonal anti-bucle CDR3.
30

Se pueden cultivar las células con un anticuerpo monoclonal anti-bucle CDR3 soluble o unido a la placa (6B11 o 3A6) o con CPA alogénicas o autólogas pulsadas con antígeno. Aunque las expansiones de una sola ronda de linfocitos T son ampliamente representativas de proporciones iniciales, las células se pueden cultivar de forma alternativa durante aproximadamente una semana antes de la expansión para que descansen las células activadas que responden mal a la expansión en comparación con las células en reposo.
35

Aproximadamente 3-4 semanas después de la estimulación primaria, se puede analizar una parte de las células por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales $V\alpha 24$, $V\beta 11$ y 6B11 para determinar la fracción de linfocitos T invariantes. Se puede comparar la producción de citocinas y la citotoxicidad normalizada para el número de linfocitos T invariantes para los pacientes antes y después del tratamiento, como se describe anteriormente. Además, se puede usar el análisis de PCR o el análisis de FACS de las células antes de la estimulación primaria para determinar en qué medida el incremento en la recuperación de linfocitos T invariantes (después de la estimulación primaria) refleja la expansión in vivo debida al tratamiento frente al incremento en la respuesta a la estimulación *ex vivo*.
40

Este análisis llevado a cabo en 8-10 pacientes (con un promedio de dos puntos de tiempo después del tratamiento) debe ser adecuado para determinar si el tratamiento tiene el potencial de para incrementar el número o modular la actividad de linfocitos T invariantes. Si se demuestran estos efectos positivos sobre los linfocitos T invariantes, entonces se pueden realizar otros estudios que correlacionen las respuestas de linfocitos T invariantes con la dosis, el programa y otras funciones inmunológicas. Por ejemplo, los cambios en los números de linfocitos T invariantes y/o respuestas se pueden correlacionar con los parámetros inmunitarios clave, incluyendo IFN- γ de suero, TNF e IL-15; expresión de IL-12 y otros receptores de quimiocinas y citocinas Th1; y cambios en linfocitos T, mieloides, y otros marcadores celulares (Fas, FasL, Linfotoxina- β , CD3, CD4, CD8, LFA-1, CD80, CD86, CD161).
45

Este método para determinar el cambio en el número o actividad de linfocitos T invariantes también se puede aplicar a linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$. Si se requiere una etapa de preenriquecimiento para cuantificar estos linfocitos T, se puede usar cualquier anticuerpo que se una a estas células, incluyendo los anticuerpos de la presente invención, en la etapa de purificación inicial o se puede usar una selección negativa para retirar las células que no sean linfocitos T o células que no sean linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$.
50

65

Ejemplo 7: Expansión y reintroducción de linfocitos T invariantes expandidos *ex vivo* en mamíferos

Los linfocitos T invariantes de una muestra de sangre periférica (20 ml o del producto de leucoféresis) de un mamífero se pueden enriquecer antes de la expansión *ex vivo* usando clasificación de FACS o purificación por inmutofinidad o expandir directamente usando un anticuerpo de la presente invención, como se describe en los ejemplos anteriores. Como se menciona en el ejemplo 5, las células se pueden expandir en presencia de una citocina para influir las hacia respuestas de desviación inmunitaria, Th1 o Th2. Además, se puede añadir IL-2, IL-7, o un mitógeno para estimular la expansión celular. Si es necesario, se puede llevar a cabo una expansión *ex vivo* secundaria, posiblemente después de una segunda etapa de enriquecimiento, bajo condiciones usadas para la expansión primaria para incrementar tanto el número de células como la pureza. Después de la estimulación, se pueden someter a ensayo las células para determinar la pureza y la producción de citocinas y citotoxicidad, como se describe anteriormente. Se debe señalar que los inventores y otros han podido establecer líneas y clones de linfocitos T humanos a largo plazo a partir de donantes normales por múltiples rondas de estimulación; por tanto, se esperan resultados similares en otros pacientes. De forma deseable, se obtienen al menos 10^6 , de forma más deseable, al menos 10^8 , y de la forma más deseable al menos 10^9 linfocitos T invariantes después la expansión. De forma deseable, los linfocitos T invariantes son al menos un 60 %, 80 ó 90 % puros, en base a la presencia de marcadores de linfocitos T invariantes $V\alpha 24$, $V\beta 11$ y $CD161$, y mantienen la producción de $IFN\gamma$ y citotoxicidad contra dianas $CD1d^+$ y 'NK'.

Si las estimulaciones secundarias no proporcionan números celulares adecuados, entonces se pueden usar rondas adicionales de estimulación. De forma alternativa, el número de células de partida se puede incrementar usando muestras de sangre más grandes o a través de leucoféresis. En este caso, se puede realizar un enriquecimiento inicial de linfocitos T invariantes por selección positiva usando el anticuerpo monoclonal $V\alpha 24$ o 6B11 conjugado con perlas, como se describe anteriormente. Para incrementar la pureza, también se pueden purificar los linfocitos T invariantes por FACS o anticuerpo conjugado con perlas antes de la reinfusión. Adicionalmente, el potencial terapéutico de la reinfusión celular de líneas de linfocitos T invariantes policlonales expandidos se puede comparar con el de los clones de linfocitos T invariantes expandidos, o mezclas de los mismos.

No se desea que la administración de linfocitos T invariantes expandidos *ex vivo* se limite a un modo particular de administración, dosificación o frecuencia de dosificación; el presente modo contempla todos los modos de administración, incluyendo la vía intramuscular, intravenosa, intraarticular, intralesional, subcutánea, o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, aborto espontáneo, embarazo o cáncer. De forma deseable, las células se reintroducen en el mamífero a partir del que se tomó la muestra de sangre. También se contempla que se pueden administrar las células a un mamífero diferente. Se pueden administrar las células al mamífero en una dosis única o en múltiples dosis. Cuando se administra en múltiples dosis, la dosis se pueden separar entre sí, por ejemplo, durante de una semana a un mes. Como se menciona en el ejemplo 5, también se pueden administrar una o más citocinas antes, durante o después de la administración de las células para influir las hacia respuestas de desviación inmunitaria, Th1 o Th2. Se debe entender que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Adicionalmente, los linfocitos T se pueden reintroducir como células en reposo o activadas, dependiendo de la aplicación. Las células en reposo requerirían una activación *in vivo*.

Ejemplo 8: Expansión y reintroducción de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para $CD1d$ o linfocitos T $J\alpha Q^+$ expandidos *ex vivo* en mamíferos

Otros linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para $CD1d$ o linfocitos T $J\alpha Q^+$ se pueden expandir *ex vivo* como se describe en el ejemplo 7. Este método se puede modificar expandiendo linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para $CD1d$ o linfocitos T $J\alpha Q^+$ de médula ósea, hígado, cordón umbilical u otras muestras. De forma deseable, la muestra contiene un mayor porcentaje de linfocitos T no invariantes reactivos para $CD1d$ que la sangre periférica. Adicionalmente, se puede usar la coestimulación (usando $CD1d$, lípidos, otros antígenos o anticuerpos) o la inhibición de la coestimulación para expandir una subpoblación deseada de linfocitos T. Por ejemplo, la estimulación de $CD28$ puede favorecer la expansión de linfocitos T no invariantes reactivos para $CD1d$ sobre los linfocitos T invariantes. Los anticuerpo anti- $CD161$ solubles que bloquean la estimulación de $CD161$ también pueden favorecer la expansión de linfocitos T no invariantes que son menos dependientes de la estimulación de $CD161$ que los linfocitos T invariantes. La cantidad de anticuerpo unido a la placa también se puede reducir, lo que puede incrementar la dependencia sobre la coestimulación por expansión de los linfocitos T.

Adicionalmente, se puede usar la presencia de diferentes citocinas o combinaciones de citocinas para favorecer la expansión de una subpoblación deseada de linfocitos T. Por ejemplo, los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para $CD1d$ o linfocitos T $J\alpha Q^+$ se pueden incubar con IL-4, IL-7 o IL-12 durante la expansión.

Los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para $CD1d$ o linfocitos T $J\alpha Q^+$ expandidos se pueden reintroducir en mamíferos como se describe en el ejemplo 7.

Ejemplo 9: Reducción en el número de linfocitos T NK invariantes en pacientes con cáncer

5 Como se describe adicionalmente a continuación, los pacientes con cáncer de próstata tienen menos linfocitos T NK invariantes que los pacientes sanos. Por tanto, los anticuerpos de la invención que incrementan el número o la actividad de linfocitos T NK invariantes se pueden usar como productos terapéuticos para la prevención, estabilización o tratamiento de cáncer de próstata. Además, se pueden administrar linfocitos T NK invariantes expandidos *ex vivo* a los sujetos para prevenir, estabilizar o tratar cáncer de próstata.

10 Los linfocitos T NK invariantes también pueden estar presentes en niveles reducidos en sujetos con otros tipos de cáncer; por tanto, estos métodos se pueden usar para tratar otras formas de cáncer.

Pacientes con cáncer analizados en este estudio

15 Los pacientes con cáncer en este estudio tenían cáncer de próstata independiente de los andrógenos avanzado (Catalona, N. Engl. J. Med. 331:996,1994; Bubley y Balk, Hematol. Oncol.Clin. North. Am. 10:713, 1996). Todos los pacientes se trataron previamente con tratamiento de ablación de andrógenos por orquiectomía o administración de un agonista de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH). En el momento del estudio, todos los pacientes tenían gammagrafías óseas positivas y un aumento en los niveles de antígeno específico de próstata (PSA) (> 50 ng/ml), indicativo de enfermedad metastásica progresiva. Todos menos uno de estos pacientes no habían recibido quimioterapia citotóxica. Los pacientes con cáncer de próstata en remisión se trataron de forma similar con tratamiento de ablación de andrógenos, pero tuvieron gammagrafías óseas negativas y niveles estables bajos (< 10 ng/ml) de PSA.

25 *Métodos usados para la expansión ex vivo de linfocitos T positivos para V α 24*

Se obtuvo sangre periférica (10-20 ml) en tubos que contenían heparina de donantes sanos y pacientes con cáncer de próstata que habían dado su consentimiento informado. Se aislaron PBMC usando Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se tiñeron los linfocitos T positivos para V α 24 con un anticuerpo monoclonal anti-V α 24 (C15) (Coulter, Miami, FL) seguido de un conjugado FITC de IgG antiratón de cabra (H⁺L) (KPL, Gaithersburg, MD) y se clasificaron por FACS de alta velocidad (Modular Flow FACS, Cytomation, Boulder, CO) (Dellabona *et al.*, J. Exp. Med. 180:1171, 1994). Se irradiaron PBMC autólogas (5000 rad) y se usaron como CPA. Inicialmente, se cocultivaron las células V α 24⁺ purificadas con FACS en placas de fondo plano de 96 pocillos (aproximadamente 20.000 por pocillo) con el mismo número PBMC irradiadas autólogas en presencia de α -GalCer (50 ng/ml, KRN7000, Kirin Brewery Co., Gunma, Japón) e IL-2 recombinante (100 U/ml) (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Después, se expandieron gradualmente los cultivos en placas de 24 pocillos usando el mismo medio. En algunos cultivos, se añadió IL-12 recombinante humana (1 ng/ml) (Genetics Institute, Cambridge, MA) durante la última semana de cultivo.

40 *Métodos usados para el análisis de citometría de flujo de linfocitos T expandidos*

Se realizó el análisis fenotípico células expandidas con α -GalCer por citometría de flujo de dos o tres colores después de tres a cuatro semanas en cultivo. Informes anteriores han demostrado que la doble tinción para V α 24 y V β 11 es un marcador de linfocitos T NK invariantes, ya que V α 24 y V β 11 se usan muy poco por linfocitos T en masa (Dellabona *et al.*, J. Exp. Med. 180:1171, 1994; Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109, 1997; Prussin y Foster J. Immunol. 159:5862,1997). Los anticuerpos usados fueron anti-V α 24 PE, anti-V β 11 FITC, anti-CD8p PE (Immunotech), anti-CD3 Cychrome, anti-CD161 PE y anti-CD4 Cychrome (PharMingen, La Jolla, CA). Como se describe previamente (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, J. Exp. Med. 188:867, 1998), se suspendieron aproximadamente 1x10⁶ células en 50 μ l de tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato con un 1 % de suero fetal bovino y un 0,1 % de NaN₃) en pocillos individuales de placas de 96 pocillos (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109,1997; Exley *et al.*, J. Exp. Med. 188:867,1998). Se bloqueó la unión a anticuerpo no específica preincubando células con un 10 % de suero humano durante 15 minutos en hielo. Después, se añadieron los anticuerpos a suspensiones celulares y se incubó durante 20 minutos en hielo. Se lavaron las células dos veces con tampón FACS y se analizó usando un FACScan (Becton Dickinson) con el programa informático Cell Quest.

55 El análisis de los linfocitos T NK invariantes en PBMC recién aisladas de donantes sanos y pacientes con cáncer también usó el anticuerpo monoclonal 6B11. En estos experimentos, se tiñeron las células con 6B11-FITC y anti-V α 24-PE (que no competían de forma cruzada) para detectar células que expresan el TCR invariante. Debido a la baja frecuencia de estas células en pacientes con cáncer, se analizaron entre 10⁵ y 10⁶ células totales.

60 *Resultados que muestran un descenso del número de linfocitos T NK invariantes en pacientes con cáncer*

Se cuantificaron los linfocitos T NK invariantes en la sangre periférica de donantes sanos y pacientes con cáncer por citometría de flujo de 2 colores con un anticuerpo monoclonal V α 24 y un anticuerpo monoclonal V β 11 o el anticuerpo monoclonal 6B11 contra el receptor de V α 24-J α Q invariante. Las líneas de linfocitos T NK invariantes, generadas por la expansión de α -GalCer de linfocitos T V α 24⁺ de donantes sanos, fueron reactivas con los anticuerpos monoclonales

V α 24, V β 11 y 6B11 (figuras 19A y 19D). La observación de que V β 11 se expresó por casi todos los linfocitos T V α 24⁺ expandidos con α -GalCer de este y otros muchos donantes sanos, indicó además que este V β era necesario para generar linfocitos T NK invariantes reactivos para α -GalCer.

- 5 Se hallaron linfocitos T doble positivos V α 24⁺ V β 11⁺ en la sangre periférica de donantes sanos en números que eran comparables a las células V α 24⁺ 6B11⁺, consistente con una gran fracción de células V α 24⁺ V β 11⁺ que son linfocitos T NK invariantes (figuras 19B y 19E). La fracción promedio de células V α 24⁺ 6B11⁺ en una serie de donantes sanos fue de un 0,11 %. Se hallaron pequeños números de linfocitos T V α 24⁺ V β 11⁺ en la sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata avanzado (tablas 4 y 5). Además, no hubo células α 24⁺ B11 detectable en 5 de 6 pacientes examinados (figuras 19C y 19F). Estos resultados indicaron que los linfocitos T NK invariantes se disminuyeron en pacientes con cáncer de próstata avanzado.

Tabla 4. Número de linfocitos T NK invariantes en PBMC en base a la tinción con anticuerpos 6B11 y anti-V α 24

Donante		V α 24 ⁺ 6B11 ⁺ (invariante)	
Sano (n = 3)	media	41 x 10 ⁵	
	intervalo	14 x 10 ⁵ a 90 x 10 ⁵	
Cáncer de próstata (n = 7)	media	4x 10 ⁵	
	intervalo	0 a 20 x 10 ⁵	

- 15 Tabla 5. Porcentaje de células V α 24⁺ que son linfocitos T invariantes en base a la tinción con el anticuerpo V α 24 y el anticuerpo anti-V β 11 o bien 6B11

Donante		V α 24 ⁺ V β 11 ⁺ V α 24 ⁺	V α 24 ⁺ 6B11 ⁺ (invariante) V α 24 ⁺
Sano n = 3	media (intervalo)	4.8 % (2-7 %)	4.3 % (1.4-6.5 %)
	Cáncer de próstata n = 6	media (intervalo)	2.3 % (0-8.0 %)
			0.4 % (0-2.3 %)

Resultados de la expansión de linfocitos T NK invariantes de donantes sanos

- 20 Debido al pequeño número de linfocitos T NK invariantes en sangre periférica, se llevó a cabo una ronda de expansión *ex vivo* para evaluar adicionalmente la frecuencia y la función de estas células. Se aislaron linfocitos T NK invariantes de donantes sanos y pacientes con cáncer de próstata avanzado a partir de sangre periférica a través de una purificación FACS inicial con un anticuerpo monoclonal específico V α 24, seguido de una expansión selectiva *in vitro* durante de tres a cuatro semanas, con α -GalCer y PBMC irradiadas autólogas como fuente de CPA. Después, se analizaron los linfocitos T por tinción doble con los anticuerpos monoclonales V α 24 y V β 11 o 6B11.

- 30 Los linfocitos T V α 24⁺ purificados con FACS estimulados *in vitro* con un mitógeno de linfocitos T, FA, proporcionó sólo una pequeña población de linfocitos T V α 24⁺ V β 11⁺ que variaba en número con diferentes donantes (figura 20A). En contraste, la estimulación de los linfocitos T V α 24⁺ purificados de donantes sanos con α -GalCer y PBMC irradiadas autólogas proporcionó una gran población de V α 24⁺ V β 11⁺ (figura 20B, 94,4 % del células totales). El análisis fenotípico adicional de estos linfocitos T V α 24⁺ V β 11⁺ expandidos con α -GalCer de una serie de donantes sanos demostró grandes poblaciones de CD4⁺ y CD4⁺CD8⁻ y mostró que la mayoría de cada donante (> 70 %) expresó CD161.

- 35 Se evaluaron los linfocitos T V α 24⁺ V β 11⁺ expandidos con α -GalCer de donantes sanos para determinar el reconocimiento de CD1d y la producción de citocinas. En consonancia con muchas de las células que eran linfocitos T NK invariantes reactivos para CD1d, las células produjeron cantidades sustanciales tanto de IL-4 como de IFN- γ en respuesta a las células C1R transfectadas con CD1d, pero no a células C1R transfectadas con control (figura 20C). La especificidad para CD1d de este reconocimiento se demostró además bloqueando con un anticuerpo monoclonal anti-CD1d, 51.1, pero no un Ab de control apareado con isotipo. Las respuestas de citocinas a CD1d fueron equivalentes a las obtenidas después de la estimulación policlonal de estos linfocitos T con FA, confirmando que la mayoría de las células eran efectivamente linfocitos T reactivos para CD1d. Estas respuestas eran todas comparables a las obtenidas previamente con clones de linfocitos T NK invariantes de donantes sanos (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, J. Exp. Med. 188:867, 1998), indicando que estos últimos clones establecidos *in vitro* reflejaron el estado funcional de las células *in vivo*.

Disminución de la expansión de linfocitos T NK invariantes de pacientes con cáncer de próstata avanzado

Los linfocitos T NK invariantes de pacientes con cáncer de próstata independiente de los andrógenos avanzado se examinaron de forma similar. Con relación a los donantes sanos, se produjo una disminución en el número total de células cultivadas recuperado de pacientes con cáncer de próstata resistente a la ablación androgénica y una marcada disminución en la fracción de células expandidas que eran linfocitos T NK invariantes $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ (figuras 21A y 21B, 98,5 % frente a un 13,6 % de linfocitos T NK invariantes en un donante sano y un paciente con cáncer de próstata resistente a ablación androgénica, respectivamente). También se muestran linfocitos T $V\alpha 24^+$ expandidos con α -GalCer de un paciente con paciente con cáncer de próstata tratado con ablación androgénica en remisión (75 % de linfocitos T NK invariantes), indicando que el tratamiento de ablación androgénica no tiene en cuenta la disminución en la expansión de los linfocitos T NK invariantes (figura 21C).

Los datos de una serie de pacientes con cáncer de próstata independiente de los andrógenos avanzado, todos con enfermedad metastásica y un aumento en los niveles de antígeno específico de próstata (PSA), confirmó la recuperación marcadamente disminuida de linfocitos T NK invariantes $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ (media de un 10 % de pacientes con cáncer de próstata frente a > 80 % de donantes sanos) (figura 21D). Estos resultados fueron consistentes con la disminución del número de linfocitos T NK invariantes detectado por la tinción de $V\alpha 24$ y $V\beta 11$ o 6B11 en sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata avanzado. Otros factores, incluyendo una disminución en la proliferación o un incremento en la apoptosis durante las estimulaciones *in vitro* también podrían haber contribuido a la disminución en la recuperación. En contraste, la recuperación de linfocitos T NK invariantes $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ de pacientes con cáncer de próstata que recibían tratamiento de ablación androgénica, pero que se encontraban en remisión, estaba más cercana a los donantes sanos (figura 21D).

Ejemplo 10: Reducción en la actividad de linfocitos T NK invariantes en pacientes con cáncer

Además de estar presentes en niveles reducidos, los linfocitos T NK invariantes presentan una reducción en la actividad en pacientes con cáncer de próstata. En particular, estos linfocitos T NK invariantes produjeron menos IFN- γ (un efector de Th1). Como se describe a continuación, la incubación con IL-12 incrementó la actividad de estos linfocitos T NK invariantes para producir IFN- γ . Estos resultados apoyan la capacidad de IL-12 para influir los linfocitos T NK invariantes hacia respuestas Th1, tales como la actividad citotóxica que es deseable para el tratamiento de cáncer.

Métodos usados para la medida de la producción de citocinas y la reactividad de CD1d

Para la producción de citocinas, se cocultivaron 1×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos con un número equivalente de de placas cultivados conjuntamente con un número igual de células C1R transfectadas con CD1d o con control en medio RPMI 1640 con un 10 % de FBS, 20 U/ml de IL-2 y 1 ng/ml de PMA, como se describe previamente (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109, 1997). Se bloquearon las respuestas celulares para CD1d con un anticuerpo anti-CD1d, 51.1, a 10 μ g/ml (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, Immunology 100:37,2000). Se recogieron los sobrenadantes a las 48 horas y a las 72 horas para las medidas de IL-4 e IFN- γ , respectivamente. Se determinaron los niveles de citocinas liberadas por triplicado por ELISA de captura con pares de anticuerpos apareados con relación a los estándares de citocinas (Endogen, Inc. Cambridge, MA). El límite del intervalo de detección de estos ensayos, tanto para IFN- γ como IL-4 fue de 10-50 pg/ml.

Resultados que demuestran la pérdida de producción de IFN- γ por linfocitos T NK invariantes de pacientes con cáncer

Los linfocitos T NK invariantes derivados de pacientes de cáncer de próstata proliferaron y produjeron niveles similares de IL-4 en respuesta a células transfectadas con CD1d de como linfocitos T NK invariantes de un donante sano (figura 22A). Sin embargo, su producción de TNF- α se redujo notablemente con relación a los linfocitos T NK invariantes del donante sano (figura 22B). El análisis de la producción de IL-4 frente a IFN- γ por linfocitos T NK invariantes expandidos con α -GalCer de una serie de pacientes con cáncer de próstata avanzado y donantes sanos confirmó una pérdida notable de la producción de IFN- γ por las células derivadas de pacientes con cáncer de próstata (figura 22C escala logarítmica para IFN- γ). Esta pérdida de IFN- γ con relación a IL-4 fue más evidente cuando se compararon las proporciones de producción de IFN- γ /IL-4, con una diferencia aproximada de 50 veces entre líneas de linfocitos T NK derivados de cáncer de próstata y donantes sanos (figura 22E).

Para determinar si esta pérdida de producción de IFN- γ era frecuente para otras poblaciones de linfocitos T, se estimularon linfocitos T de sangre periférica en masa de pacientes con cáncer de próstata independiente de los andrógenos avanzado y donantes sanos *in vitro* con FA. Los resultados mostraron que la producción de IFN- γ por linfocitos T en masa de pacientes con cáncer de próstata estaba intacta (figura 22D), con proporciones IFN- γ /IL-4 similares observados en las células de de pacientes con cáncer de próstata frente a donantes sanos (figura 22E). En conjunto, estos datos demostraron una pérdida selectiva de la producción de IFN- γ en la población de linfocitos T NK invariantes de pacientes con cáncer de próstata avanzado.

Ya que los linfocitos T NK invariantes pueden contribuir a los efectos antitumorales de IL-12, a continuación se determinó si estas células derivadas de paciente con cáncer podían responder a IL-12. Se trataron linfocitos T NK invariantes derivados de cáncer de próstata con IL-12 (1 ng/ml) durante la última semana de cultivo para determinar si podían responder a esta citocina. Las células tratadas con IL-12 mostraron un incremento notable en la producción de IFN- γ , y presentaron proporciones de producción de IFN- γ /IL-4 que eran comparables a las de los donantes sanos (figura 22E, cáncer + IL-12).

Ejemplo 11: Niveles reducidos de linfocitos T NK en pacientes con esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM), es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) que implica una probable respuesta autoinmunitaria dirigida contra antígenos asociados a la propia mielina. Para determinar si los pacientes con EM tienen un menor número de linfocitos T NK, se compararon los porcentajes de linfocitos T NK ($V\alpha 24J\alpha Q^+$) en muestras de sangre periférica en pacientes con EM con enfermedad progresiva primaria (n = 6) o remitente recidivante (n = 8) con donantes sanos (n = 6). El porcentaje de linfocitos T NK en donantes normales fue similar a los informes previos ($0,114 \pm 0,020$), mientras que el porcentaje de linfocitos T NK en pacientes con BM con enfermedad progresiva primaria ($0,010 \pm 0,007$) o remitente recidivante ($0,027 \pm 0,071$) fue significativamente menor. El menor número de linfocitos T NK en pacientes con EM sugiere que el incremento en el número y/o actividad de linfocitos T NK puede ser útil para el tratamiento o prevención de EM, tal como EM remitente recidivante, progresiva primaria o progresiva Crónica. Adicionalmente, las muestras de pacientes con EM se pueden tomar a varios puntos temporales para determinar si el número de linfocitos T NK en la periferia de estos pacientes con EM fluctúa en función del tiempo y se correlaciona con el estado de sus síntomas de enfermedad.

Ejemplo 12: Uso de 6B11 como herramienta de diagnóstico para el estudio de cohortes clínicas

Los linfocitos T restringidos para CD1d pueden desempeñar un papel inmunorregulador en múltiples trastornos inmunológicos. Para someter a prueba la utilidad diagnóstica del anticuerpo 6B11 para controlar el estado clínico de pacientes infectados con VIH y con prediabetes de alto riesgo, se usaron el anticuerpo 6B11-FITC en combinación con el anticuerpo $V\alpha 24$ -PE para determinar la frecuencia de linfocitos T restringidos para CD1d circulantes en pacientes diabéticos el día de diagnóstico y en la cohorte MACS de VIH seguidos en el centro médico de UCLA. Se tiñeron PBL y se analizó por FACS como se describe anteriormente. Además, se determinaron subtipos de células dendríticas (DC) para la cohorte MACS de VIH. Los resultados se representan en las figuras 23 y 24.

Ejemplo 13: Expresión génica en linfocitos T invariantes de gemelos idénticos discordantes para diabetes de tipo 1

Una identificación del patrón de genes activado en un tipo de linfocitos T particular puede proporcionar información predictiva de la función de la subpoblación de linfocitos T. Por ejemplo, los cambios en los patrones de expresión génica en la familia de citocinas/quimiocinas son particularmente relevantes dada la asociación de la secreción de citocinas y la función in vivo para linfocitos T. Como se describe a continuación, se determinó el patrón de expresión génica para linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ para entender mejor el papel de estas células en la autoinmunidad y en la diabetes de tipo 1. Este método también se puede usar para determinar el papel de cualquier otra subpoblación de linfocitos T de interés en el desarrollo y/o progresión de cualquier enfermedad o afección.

Para estudiar las consecuencias transcripcionales de la activación del receptor de linfocitos T en clones de linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ humanos, se usaron microchips de ADN se usa para cuantificar los cambios en los niveles de ARNm después de la estimulación con anti-CD3 de clones derivados de gemelos idénticos discordantes para diabetes de tipo 1 y secreción de IL-4 (Wilson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97 (13): 7411-7416, 200). La activación dio como resultado la modulación significativa de 226 transcritos en el clon de secreción de IL-4 y 86 en el clon de IL-4-nula. Sólo veintiocho de estos genes estaban en común. Las diferencias observadas sugieren tanto una diferenciación ineficaz de linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ de diabetes como un papel de los linfocitos T invariantes en el reclutamiento y activación de células del linaje mieloide.

Debido a que el defecto en la secreción de IL-4 fue probablemente el resultado de múltiples diferencias, se eligió un par de clones representativos para el análisis intensivo usando microchips de ADN que controlan la expresión de aproximadamente 6800 genes (colección Unigene). Los microchips de ADN proporcionan un enfoque práctico y reproducible para un estudio a gran escala de diferencias complejas en la expresión génica (Lockhart *et al.*, Nature Biotechnology 14, 1675-1680, 1996; Holstege *et al.*, Science 283, 83-87, 1999; Cho *et al.*, Molecular Cell 2, 65-73, 1998). Se determinaron los perfiles de expresión después de cuatro horas de estimulación con anti-CD3 o IgG de control. Se seleccionó este punto de tiempo porque se usó en un análisis previo de secreción de citocinas en clones derivados de los pares de gemelos monoigóticos discordantes para diabetes de tipo 1. El número de genes con expresión detectable antes o bien después de la estimulación fue casi idéntico para los clones que secretan IL-4 nula e IL-4 (1523 y 1558, respectivamente). Como se esperaba, la frecuencia de la mayoría de los transcritos se mantuvo sin cambios. Sólo se compartió aproximadamente 2/3 de este conjunto (988) entre los dos clones. El número de genes cuya expresión después de esta estimulación con anti-CD3 se encontró que se incrementaba o disminuía en al menos 2 veces con relación a los no estimulados fue de 86 (6%) y 226 (15%) en los clones IL-4-nula e IL-4⁺,

respectivamente. Para analizar más a fondo las diferencias en la expresión génica entre los clones que secretaban IL-4 nula e IL-4, se agruparon los genes en seis patrones de expresión distintos, usando el algoritmo de mapas autoorganizativos (Tamayo *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 96, 2907-2912, 1999).

5 Cuando se examina sobre los microchips de ADN, la activación de clones de linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ por anti-CD3 dio como resultado cambios significativos en los transcritos de la familia de citocinas/quimiocinas. Se encontraron diferencias notables en la expresión de genes en esta categoría cuando se compara el clon IL-4⁺ con el IL-4-nula (figura 25A). Cada uno de los cambios transcripcionales observados en MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , IL-5, IL-13, y GM-CSF se ha verificado en el nivel de proteínas por ELISA. Cuando se compararon los clones de los gemelos discordantes para la enfermedad, se detectaron cambios fuertes en varios transcritos en el clon IL-4-nula incluyendo los que están en común con el clon de secreción de IL-4, un total de 1523 los transcritos estaban presentes en niveles significativos, de los que 535 eran únicos del clon IL-4-nula. Además, los pares de clones secretaron cantidades equivalentes de IFN- γ en respuesta a anti-CD3. De forma importante, si una parte significativa de la función efectora de los linfocitos T CD161⁺ $V\alpha 24J\alpha Q$ se produce a través de la secreción de citocinas, entonces el clon de IL-4 nula no ha participado en el espectro completo de la función diferenciada. Recientemente, también se han destacado defectos en la capacidad tanto de responder a la activación como posteriormente de secretar citocinas se ha mencionado en los linfocitos T NK de ratones NOD (Falcone, J. of Experimental Medicine 190, 963-972, 1999). Además, esta combinación de citocinas/quimiocinas sugiere que los linfocitos T CD161⁺ también pueden reclutar y regular células dendríticas inmaduras y monocitos.

20 Cuando se comparan los clones IL-4⁺ e IL-4-nula, se destacan diferencias significativas en la expresión en otros genes importantes para la supervivencia celular, la secreción de citocinas y el flujo de calcio que en parte se activan a través de la señalización de PI 3-cinasa, tal como BCLxL, IAP, PLC γ 1 y la familia tec cinasa, Itk. Estos transcritos se encontraron en una abundancia significativamente mayor en el clon IL-4⁺. También se destacaron diferencias en los ARNm de expresión que codifican factores de transcripción y moduladores de señalización importantes para la secreción de citocinas y Th-fenotipo. Estos incluyeron GATA3, STAT1, STAT4, JunB, JunD y NFAT4. En particular, recientemente se ha informado de que JunB y GATA3 se expresan preferencialmente en los linfocitos T Th2. La activación transcripcional de GATA3, JunB, así como de JunD, se encontró de forma selectiva en el clon IL-4⁺. Los transcritos para STAT1 (señalización de IFN- γ), STAT4 (señalización de IL-12) y CD161 (un coactivador de la proliferación de linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ y secreción de IFN- γ) se sobreexpresaron en el clon IL-4-nula con relación al clon IL-4⁺. De forma importante, el factor de transcripción NFAT4 que se pensó que actuaba en parte como un supresor de la transcripción de IL-4 se sobreexpresó en el clon IL-4-nula con relación al clon IL-4⁺. Según estos datos, la regulación discordante de otros genes, tales como factores de transcripción se podría predecir que es importante para controlar el Th-fenotipo. Un modelo para genes regulados cuya expresión coincide con las observaciones biológicas independientes se presenta en la figura 25B.

40 El perfil transcripcional de clones de linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ activados reveló que el defecto en la secreción de IL-4 observada en el clon de un paciente diabético (en comparación con el gemelo idéntico no diabético) solo es una de un gran número de diferencias en la expresión génica. De forma importante, se encontraron diferencias en la expresión de productos génicos cuya activación se regula en parte por PI3-cinasa y parece que son necesarias para la generación de un linfocito T $V\alpha 24J\alpha Q$ completamente diferenciado.

Ejemplo 14; CD1d en células dendríticas mieloides estimula la secreción de citocinas de y la actividad citolítica de linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$

45 DC son una población diferenciada de células presentadoras de antígeno derivadas de la médula ósea que desempeñan un papel clave en la iniciación de las respuestas de linfocitos T. En seres humanos, se encuentran tres poblaciones de DC en frecuencias muy bajas (0,03-0,3 %) en la sangre periférica. Las DC humanas incluyen dos poblaciones mieloides (precursores de células de Langerhans (Lin⁻/CD11c⁺/CD1a⁺/IL-3R⁻) y DC de tejido (Lin⁻/CD11c⁺/CD1a⁻/IL-3R⁻)) y una población de DC "plasmacitoide" (PDC) (Lin⁻/CD11c⁻/CD1a⁻/IL-3R⁺). La población de PDC también expresa CXCR3 y CD62L que facilita la vuelta a las vénulas endoteliales altas y el movimiento en los tejidos linfáticos. Las DPC sufren la activación linfática a través de la unión de CD40 o por exposición a LPS y producen una variedad de citocinas y regulan por aumento la capacidad estimuladora de linfocitos T. Las MDC ocupan la epidermis o bien la dermis y otros sitios tisulares, respectivamente. Las MDC residen en tejidos periféricos en un estado inmaduro y captan fácilmente antígenos hasta el momento en el que reciben una señal proporcionada por infección o daño tisular. En este punto se activan y migran a los ganglios linfáticos de drenaje en los que producen fácilmente citocina, tal como IL-12p70 y activan linfocitos T naturales. Estudios recientes apoyan un papel diferencial para las poblaciones de MDC y PDC en la dirección del desarrollo de las respuestas Th1 y Th2. Los estudios en ratones y seres humanos también sugieren que la maduración y función de MDC defectuosas pueden desempeñar una función en la patogénesis de diabetes de tipo 1.

65 El papel fundamental de las células dendríticas mieloides en la inducción de respuestas inmunitarias celulares Th1 aumenta la posibilidad de que los linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ puedan ejercer sus efectos inmunomoduladores a través de la interacción con estas células. Para someter a prueba esta hipótesis, se evaluaron los patrones de expresión para CD1d encontrados en DC in vivo e *in vitro* y se examinaron las consecuencias funcionales de una interacción entre los

clones de linfocitos T V α 24J α Q y las células DC.

Clones de linfocitos T V α 24J α Q usados para este estudio

- 5 La derivación de clones de linfocitos T V α 24J α Q se ha descrito previamente (Wilson *et al.*, Nature 391:177,1998). En resumen, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes normales se sometieron a clasificación celular individual para determinar las células doble positivas para V α 24/V β 11, que después se cultivaron con PBMC alimentadoras irradiadas (50.000 células/pocillo), 721.221 células linfoblastoides irradiadas (500 células/pocillo), FA-P (1 μ g/ml), IL-2 (10 U/ml), y IL-7 (10 U/ml) en RPMI 1640 (Sigma) que contenía un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, 100 U/ml de penicilina, y 10 μ g/ml de estreptomycin (R10). Después, se propagaron los clones resultantes, con reestimulación periódica por anticuerpo anti-CD3 en presencia de PBMC alimentadora alogénica irradiada y anticuerpo anti-CD3. Se confirmó que los clones eran positivos para V α 24 y NKR-P1A por citometría de flujo y que tenían el TCR V α 24J α Q CDR3 por secuenciación.

15 *Métodos usados para el perfil transcripcional de linfocitos T*

- Se realizó el análisis transcripcional de clones de linfocitos T V α 24J α Q usando matrices de oligonucleótidos de alta densidad desarrollados por Affymetrix. En resumen, se activaron las células durante cuatro horas con 10 μ g/ml de anti-CD3 soluble o IgG de control, después de lo cual se aisló el ARN total y se transcribió de forma inversa. Se usó el ADNc resultante para la transcripción *in vitro* con nucleótidos biotinilados para producir ARN antisentido marcado que después se hibridó a microchips de ADN (GenechipsTM, Affymetrix, San José, CA). Después de la tinción con estreptavidina PE, se cuantificó la fluorescencia de ARN unido usando un lector de Genechip (microscopio confocal modificado).

25 *Ensayos para determinar la secreción y proliferación de citocinas*

- Se estimularon clones de linfocitos T V α 24J α Q (25.000/pocillo) con anticuerpo anti-CD3 unido a la placa o anticuerpo de isotipo de control durante 4, 8 ó 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar IL-4, IFN- γ , proteína inflamatoria de macrófagos 1- α (MIP-1- α), MIP-1- β , TNF- α y GM-CSF por ELISA cuantitativa (kits Quantikine, R & D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.). Después de 24 horas, se añadió 1 μ Ci/pocillo de [³H]-timidina (Dupont NEN, Boston, MA) y se midió la incorporación como se describe (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998). También se realizaron experimentos de restricción usando isoformas CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y vector pSR- α -neo solo) en células C1R transfectadas como se describe previamente (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998; Exley *et al.*, The Journal of Experimental Medicine 186:1,1997).

35 *Preparación de células dendríticas mieloides*

- Se generaron células dendríticas derivadas de monocitos a partir de PBMC recién preparadas usando una adaptación de métodos previamente publicados (O'Doherty *et al.*, Journal of Experimental Medicine 178:1067, 1993), o se seleccionaron positivamente por enriquecimiento de microesferas de anti-CD14 como se describe en los protocolos de los fabricantes (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE. UU.). En resumen, se enriquecieron PBMC recién aisladas preparadas de donantes alogénicos y singénicos para determinar los monocitos por adherencia y lavado. Inmediatamente después de lavar, se cultivaron los monocitos restantes en RIO complementado con IL-4 recombinante humana (rhIL-4; Genzyme) y rhGM-CSF a 1000 U/ml cada uno durante un periodo adicional de 7 días, proporcionando una población de células no adherentes que fue al menos un 90 % de CD1a⁺/DR⁺/CD3⁺/CD14⁻ por análisis citométrico de flujo.

Ensayos citolíticos

- 50 Se determinó la actividad citolítica por clones de linfocitos T V α 24J α Q midiendo la liberación específica de ⁵¹Cr a las cuatro horas. Se marcaron las células diana con 50 uCi Na₂ ⁵¹Cr (New England Nuclear, North Billerica MA) durante una hora y se lavó dos veces. Se determinó la actividad citolítica en ensayos de liberación de cromo estándar con placas de microlitro de 96 pocillos de fondo en U que contenían 10⁴ células diana marcadas, con las proporciones indicadas de células efectoras. Después de 4 horas de incubación a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes y se contaron en un contador gamma (Cobra, Packard, Downer's Grove IL). Se calculó la lisis específica en porcentaje como [(liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea)] x 100. Para algunos experimentos, se sometió a prueba la citolisis bajo condiciones de quelación de calcio, en presencia de EGTA y MgCl₂ cada uno a 4 mM.

60 *Anticuerpos usados para este estudio*

- El anticuerpo monoclonal anti-CD1d 42.1 fue un amable regalo del Dr. Steven Porcelli (Brigham & Women's Hospital). Se prepararon fragmentos F(ab')₂ de 42.1 y anticuerpos de control de IgG1 con un kit de F(ab')₂ de Immunopure, Pierce (Rockford, IL). Se obtuvo un IgG-FITC anti-ratón F(ab')₂ de cabra, adsorbido humano, de Caltag (Burlingham, CA, EE. UU.) reactivo de bloqueo de FcR TM IgG humana se obtuvo de Miltenyi Biotec (Auburn, CA, EE. UU.). Se

obtuvo NOR3.2 de Biosource International (Camarillo, CA, EE. UU.). Se obtuvieron TCR anti-V α 24, anti-V β 11, anti- $\alpha\beta$ TCR, y anti-CD83 de Immunotech (Coulter/Beckman, Fullerton, CA, EE. UU.). Se obtuvieron anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD40L, anti-CD80, anti-CD86 y HLA-DR de Pharmingen (San Diego, CA, EE. UU.). Se obtuvo anti-CD3, clon UCHT1, de Ancell (Bayport, MN, EE. UU.) y el control de IgG1 de Sigma (San Luís, MO).

5 *Métodos usados para citometría de flujo.*

Se analizaron células teñidas en un citómetro FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE. UU.) y se realizó una clasificación celular individual usando un citómetro MoFlo (Cytomation, Fort Collins, NJ, EE. UU.). Para la expresión de CD1d de CD40L, se activaron los clones de linfocitos T con PMA e ionomicina como se describe previamente (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998; Exley *et al.*, Journal of Biological Chemistry 269:15140, 1994).

Análisis de inmunotransferencia Western para CD1d

15 Se prepararon inmunoprecipitados de CD1d de lisados de 5x10⁵ células C1R/CD1d, 4x10⁷ células dendríticas y 4x10⁷ células C1R/neo de control usando el anticuerpo monoclonal 42.1 acoplado a perlas de proteína A. Se resolvieron los inmunoprecipitados por SDS-PAGE (5-15 %), y se sonde  con un anticuerpo policlonal anti-CD1 de conejo purificado por afinidad (Exley *et al.*, Journal of Experimental Medicine 188:867, 1998). Se visualizaron bandas por quimioluminiscencia.

20 *Métodos de inmunohistoquímica*

Se usó el anticuerpo monoclonal NOR3.2 para determinar la expresión de CD1d en tejido incrustado en parafina, fijado, por tinción con inmunoperoxidasa (kit Vectastain ABC elite con visualización usando NovaRed, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se realizó la tinción con las especificaciones del fabricante con NOR3.2 usado a una dilución de 1:100. Se confirmó la especificidad de la señal bloqueando experimentos usando una proteína de fusión GST-CD1d en comparación con la proteína de GST sola.

Resultados que muestran la activación de linfocitos T V α 24J α Q restringidos para CD1d por tratamiento con anti-CD3.

30 Se realizó un análisis detallado del perfil transcripcional de linfocitos T V α 24J α Q usando matrices de oligonucleótidos de alta densidad. La activación de clones derivados de donantes normales dio como resultado la expresión de numerosas moléculas efectoras que se cree que son importantes para el reclutamiento y la diferenciación de células dendríticas mieloides (figuras 26A y 26B). Entre éstas se examinaron cuatro de dieciseis quimiocinas y se incluyó MIP-1 α y MIP-1 β , que se cree que reclutan macrófagos y células dendríticas inmaduras in vivo. También se produjeron GM-CSF, IL-4 y TNF- α , citocinas implicadas en la diferenciación y maduración de células dendríticas mieloides y su posterior maduración. La activación también indujo la expresión de ocho de veintiseis citocinas sometidas a prueba. Estas citocinas, así como el ligando CD40 y 4-1BB, se produjeron por cada uno de los clones de linfocitos T V α 24J α Q examinados (figuras 26A-26D, 27A y 27B). Además, los linfocitos T V α 24J α Q activados expresaron niveles potenciados de perforina y granzima B, proteínas normalmente asociadas con linfocitos T citotóxicos clásicos. Por tanto, sus funciones inmunomoduladoras podrían no estar limitadas a la liberación de citocinas, sino que podrían implicar actividades citolíticas.

45 *Activación tanto de la secreción de citocinas como de la actividad citolítica de linfocitos T V α 24J α Q por expresión de CD1d en células d ana*

Para investigar las interacciones de linfocito T V α 24J α Q/DC en un sistema completamente autólogo, se generó una nueva serie de clones. Se sometieron a prueba estos clones para determinar las respuestas específicas de CD1d contra un panel de células C1R linfoblastoides transfectadas con diversas moléculas CD1. La liberación de citocinas, como se muestra para IL-4 e IFN- γ , y la proliferación de estos clones se restringió específicamente por CD1d (figura 27A). Se indujo la activación por CD1d, pero no por CD1a, CD1b ni CD1c, de acuerdo con los resultados publicados previamente. Adicionalmente, se encontró que los clones de linfocitos T V α 24J α Q lisaron específicamente células C1R que expresaban CD1d, pero no las otras moléculas de la familia CD1 (figura 27B). Por tanto, el desencadenamiento restringido para CD1d del TCR invariante activa la secreción de citocinas y una respuesta citolítica concurrente, una situación similar a la observada para linfocitos T citotóxicos desencadenados por MHC de clase I y epítopos de péptidos.

CD1d se expresa en células dendríticas de linaje mieloides

60 La combinación de citocinas y proteínas citolíticas producidas por clones de linfocitos T V α 24J α Q sugirió un papel efector más allá de una simple inducción de Th2 por secreción de IL-4, como se propuso previamente. Teniendo en cuenta dichas observaciones, la regulación inmunitaria por linfocitos T V α 24J α Q podría implicar la interacción con células dendríticas mieloides, que son importantes para la generación de respuestas de tipo Th1. Las células dendríticas inmaduras se derivaron de monocitos de sangre periférica diferenciados *in vitro* con IL-4 y GM-CSF y posteriormente madurados con medio condicionado de monocitos (O'Doherty *et al.*, Journal of Experimental Medicine

178:1067, 1993). Se sabe que los monocitos de sangre periférica expresan niveles bajos de CD1d, que se pierde de inmediato en el cultivo *in vitro*. El análisis de células dendríticas mieloides maduras (DC1) derivado de monocitos periféricos demostró la readquisición de la expresión de CD1d en la superficie celular (figuras 28 A y 28B), mientras que los linfocitos B y T activados no expresaron CD1d. El análisis inmunohistoquímico confirmó que CD1d se expresó preferencialmente in vivo en células dendríticas en las zonas de linfocitos T paracorticales de ganglios linfáticos (figuras 28C-28P). La inmunotinción de secciones en serie confirmó que la CD1d se expresa en células dendríticas que también expresan CD1a y S100. No se encontró que CD1d se expresara por células dendríticas foliculares o macrófagos de cuerpo tingible del folículo, ya que estuvo en gran medida ausente de los histiocitos sinusales, es decir La expresión de CD1d se dirigió a regiones linfáticas dependientes de linfocitos T. Mientras se estudiaban otras poblaciones histiocíticas/monocíticas en otras formas de procesos de ganglios linfáticos reactivos, se encontró una tinción de CD1d sorprendente sobre histiocitos epitelioides tanto en granulomas caseosos de infecciones por *M. tuberculosis* como en otros granulomas no micobacterianos. Se ha demostrado que se requieren linfocitos T V α 14J α 281 murinos para la formación de granulomas después del reto con extractos de lípidos de *M. tuberculosis*. Además, varios tumores que se asemejan mucho a las células dendríticas y que pueden ser sus equivalentes neoplásicos, a saber, histiocitosis de células de Langerhans y tumores de células dendríticas interdigitales, también expresan de forma consistente CD1d. Por tanto, la expresión de CD1d en células dendríticas tanto *in vitro* como in vivo sugiere su potencial como una diana fisiológica para linfocitos T V α 24J α Q.

Lisis restringida para CD1d de células dendríticas mieloides por linfocitos T V α 24J α Q

Se confirmó la capacidad de linfocitos T V α 24J α Q para interactuar con células dendríticas sometiendo a prueba varios clones de linfocitos T V α 24J α Q para citolisis de DC de múltiples donantes sanos de haplotipos de MHC diferentes (figuras 29A y 29B). Se lisaron células dendríticas tanto alogénicas como autólogas por los clones, indicando que la destrucción no era alorreactiva ni restringida por MHC. Además, se anuló completamente la citolisis por quelación de calcio y se inhibió notablemente por el anticuerpo monoclonal anti-CD1d 42.1 (figura 29C). Estos datos sugieren que la destrucción estaba mediada por la ruta de perforina/granzima y que requirió CD1d. La comparación de células dendríticas de fenotipo inmaduras (CD83⁻) frente a maduras (CD83⁺) demostró que no había una diferencia consistente en el reconocimiento por linfocitos T V α 24J α Q (figura 29A). La activación de linfocitos T V α 24J α Q por células dendríticas también dio como resultado la secreción tanto de IL-4 como de IFN- γ (figura 29D). Por tanto, la exposición de linfocitos T V α 24J α Q a células dendríticas que expresan CD1d desencadenó ambas funciones citolíticas y de liberación de citocinas.

Mecanismo de retroalimentación para la regulación inmunitaria

Después de la activación por anti-CD3, se encontró que los linfocitos T V α 24J α Q podían secretar una amplia gama de citocinas, quimiocinas y proteínas coestimuladoras importantes para el reclutamiento y la diferenciación de células dendríticas mieloides, incluyendo IL-4 y GM-CSF. Las células dendríticas mieloides cultivadas en presencia de estos productos génicos expresaron CD1d y se convirtieron en dianas específicas para la destrucción restringida para CD1d por linfocitos T V α 24J α Q. Además, CD1d se expresó preferencialmente en células dendríticas mieloides en las zonas de linfocitos T paracorticales de ganglios linfáticos corroborando los datos de expresión *in vitro*.

Debido a que las células dendríticas derivadas de mieloides (DC1) y las células dendríticas derivadas de tejido linfático (DC2) regulan las respuestas de linfocitos T auxiliares CD4⁺, la lisis específica de células DC1 por linfocitos T V α 24J α Q sugiere que su función inmunomoduladora no se limita a la influencia de Th2 inducida por la secreción de IL-4 (Maldonado-López *et al.*, J Exp Med 189:587, 1999; Risoan *et al.*, Science 283:1183, 1999; Reid *et al.*, Curr Opin Immunol 12:114, 2000). Cuando se cocultivaron con linfocitos T, las células DC1 secretaron niveles altos de IL-12 e indujeron linfocitos T con un fenotipo Th1. El cocultivo con células DC2 indujo una respuesta Th2 marcada (Risoan *et al.*, Science 283:1183, 1999). Por tanto, la lisis específica de células dendríticas mieloides (DC1) por linfocitos T V α 24J α Q puede servir como mecanismo de retroalimentación negativo para limitar las respuestas de linfocitos T Th1 (figura 30).

Los informes anteriores han mostrado resultados de lisis similares para células NK. Las células NK activadas lisaron células dendríticas, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación negativo similar al propuesto para linfocitos T V α 24J α Q. Además, la activación in vivo de linfocitos T restringidos para CD1d por tratamiento con α -GalCer dio como resultado la activación marcada de células NK murinas (Carnaud *et al.*, J Immunol 163:4647, 1999). Aunque este mecanismo para la activación de células NK pueden desempeñar un papel en la regulación de las células dendríticas in vivo, la interacción directa entre los linfocitos T reactivos para CD1d y DC demostró aquí que hace esta etapa innecesaria.

El sitio de interacción entre los linfocitos T V α 24J α Q y las células dendríticas se desconoce actualmente. La escasez de linfocitos T V α 24J α Q en un ganglio linfático típico sugiere que se puede producir de forma extranodal y que las células dendríticas positivas para CD1d presentes dentro de los ganglios linfáticos pueden ser las que escapan de la destrucción periférica (Bendelac *et al.*, Annual Review of Immunology 15:535, 1997; Porcelli *et al.*, Annu Rev Immunol 17:297, 1999). El las distribuciones de tejido paralelas de linfocitos T V α 24J α Q dentro del sistema reticuloendotelial y el patrón de expresión in vivo de CD1d son una fuerte evidencia de un papel clave para su interacción en la regulación

de la generación de respuestas inmunitarias celulares. Los linfocitos T restringidos para CD1d se distribuyen en el hígado, intestino, bazo, ganglios linfáticos y timo (Bendelac *et al.*, Annual Review of Immunology 15:535, 1997; Porcelli *et al.*, Annu Rev Immunol 17:297, 1999), sitios de muestreo y presentación de antígenos activos por células presentadoras de antígenos profesionales. Las células dendríticas no reguladas también han mostrado previamente que pueden iniciar y mantener la autoinmunidad por la presentación de autoantígenos específicos de tejido. Además, las DC se quedaron en las zonas de los linfocitos T de ganglios linfáticos como consecuencia de mutaciones con pérdida de sentido en el gen de la caspasa 10 de pacientes con síndrome linfoproliferativo autoinmunitario de tipo II (ALPES II), un hallazgo principal en este trastorno autoinmunitario. La disfunción de los linfocitos T restringidos para CD1D se ha correlacionado claramente con el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T tanto en roedores como en seres humanos. Además, se ha demostrado que la activación o transferencia directa de linfocitos T restringidos para CD1d inhibe directamente el desarrollo de autoinmunidad en estos modelos murinos de autoinmunidad.

En resumen, los datos actuales sugieren que los linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ se activan por CD1d sobre células dendríticas mieloides (DC1) para secretar quimiocinas y citocinas importantes para el reclutamiento y la diferenciación de células dendríticas y, por lo tanto, desempeñan un papel importante en la modulación de la función de las células dendríticas (figura 30). Esta interacción también activa las funciones citolíticas de los linfocitos T $V\alpha 24J\alpha Q$ dando como resultado la regulación negativa de respuestas inmunitarias celulares Th1 a través de la citólisis de células dendríticas. Este sistema puede ser recíproco para la regulación negativa de células dendríticas linfáticas (DC2) por linfocitos T maduros, lo que sirve para limitar las respuestas celulares Th2 (Rissoan *et al.*, Science 283:1183, 1999).

Un posible mecanismo por el que la maduración y la función de DC deficientes puede contribuir a la enfermedad autoinmunitaria, tal como diabetes de tipo 1, incluye una actividad de células presentadoras de antígeno insuficiente para la generación de células reguladoras (células Th2, linfocitos T $CD4^+/CD25^+$) o para la inducción de la destrucción en linfocitos T efectores. Es posible que los defectos intrínsecos en la maduración de MDC puedan contribuir a defectos en el número o la función de los linfocitos T NK. Asimismo, los defectos en los linfocitos T NK pueden limitar de forma recíproca la maduración de DC o conducir a un fallo en la destrucción de estas células presentadoras de antígeno, permitiendo así una respuesta inmunitaria persistente y perjudicial.

Ejemplo 15: Métodos para determinar el efecto de los anticuerpos sobre la subpoblación de linfocitos T dirigidos in vivo

Cualquiera de los anticuerpos de la invención se puede someter a prueba en un modelo animal in vivo para determinar las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de los anticuerpos. Por ejemplo, se puede determinar la semivida, la biodistribución y la eficacia del anticuerpo.

Un posible método implica la administración de linfocitos T invariables humanos o cualquier otra población de linfocitos T de interés a un SCED u otro animal inmunodeficiente, tal como un ratón y la administración de un anticuerpo anti-linfocito T invariante o cualquier otro anticuerpo de la invención al animal para determinar si el anticuerpo modula la actividad o el número de linfocitos T administrados in vivo.

En particular, una población de linfocitos T que contiene 1-10 millones de linfocitos T de interés (por ejemplo, linfocitos T invariables o cualquier otra subpoblación de linfocitos T) se administra i.v. o en cualquier sitio de interés. Se administran uno o más anticuerpos antes de, simultáneamente con o después de la administración de los linfocitos T. Por ejemplo, se puede administrar el anticuerpo en cualquier momento durante el período de vida de los linfocitos T administrados en el animal huésped. Se administra aproximadamente 1 - 100 μ g del anticuerpo en el mismo sitio o en un sitio diferente al sitio de administración de los linfocitos T. Si se usan anticuerpos marcados de forma detectable, la localización y la cantidad de anticuerpo y/o linfocitos T administrados se puede monitorizar in vivo en base a la fluorescencia o la radiactividad. Adicionalmente, se pueden realizar medidas histológicas, inmunológicas y/o bioquímicas *ex vivo* sobre tejidos del animal. Se puede medir la actividad biológica del anticuerpo o subpoblación de linfocitos T analizando la cantidad o actividad de citocinas en una muestra de suero o tejido. Además, se puede medir la activación de otras células, tales como otros linfocitos T, por la subpoblación de linfocitos T administrada. Por ejemplo, se puede medir el número de linfocitos T $CD69^+$ por clasificación de FACS con un anticuerpo anti- $CD69$.

Ejemplo 16: Administración de anticuerpos para la expansión in vivo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ o para la obtención de imágenes de estas células

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un mamífero, posiblemente junto con la administración de una citocina, para la expansión in vivo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo o cáncer. Como se describe en el ejemplo 7, se contemplan todos los modos de administración, dosificación y frecuencia.

Las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más anticuerpos de la invención se pueden preparar como se

describe previamente en Remington's Pharmaceutical Sciences de E.W. Martin. Se pueden usar compuestos estabilizadores farmacéuticos, vehículos de administración o vehículos transportadores. Por ejemplo, se puede usar seroalbúmina humana u otras proteínas animales o humanas. Las vesículas de fosfolípidos o suspensiones liposómicas son vehículos de administración o transportadores farmacéuticamente aceptables posibles. Estas composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Se puede usar un anticuerpo de la invención que esté unido covalentemente a un marcador fluorescente o radiomarcador para visualizar la distribución, cantidad o migración in vivo de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$. Se puede usar esta obtención de imágenes de linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$ para identificar sujetos que están en riesgo de o que tienen una enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo o cáncer. De forma alternativa, se puede usar este método para determinar el efecto de un tratamiento para una de las enfermedades anteriores sobre los linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d o linfocitos T $J\alpha Q^+$.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo purificado, o un fragmento o derivado del mismo, en el que dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo:
- 5 - reconoce y se une al bucle CDR3 de un receptor de antígeno de linfocitos T invariantes (TCR),
- (i) se une y (ii) expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de: linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$, y
- 10 - no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas;
- en el que dicho derivado es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado químicamente, a través de tecnología de fusión génica, o a través de síntesis química, de modo que esté covalentemente unido a una toxina, compuesto terapéuticamente activo, enzima, citocina, radiomarcador, marcador fluorescente o etiqueta de afinidad.
- 15 2. El anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de la reivindicación 1, en el que dicho bucle CDR3 es un bucle CDR3 humano.
- 20 3. El anticuerpo, o fragmento del mismo, de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, se une a linfocitos T NK.
4. Una composición que comprende:
- 25 (a) un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- (b) un transportador farmacéuticamente aceptable.
5. Un anticuerpo bifuncional, o fragmento o derivado del mismo, que comprende:
- 30 (a) un primer anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; en el que dicho primer anticuerpo, o fragmento del mismo se une a un primer epítipo; y
- (b) un segundo anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, que se une a un segundo epítipo expresado en un linfocito T que expresa dicho TCR invariante o expresado en un linfocito T NK, un linfocito T reactivo para CD1d, o un linfocito T $J\alpha Q^+$, en el que dicho segundo anticuerpo se une a dicho primer anticuerpo o fragmento o derivado del mismo.
- 35 6. Un hibridoma estable que produce un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 7. Un método de generación de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho método:
- 45 (a) acoplar un péptido cíclico que comprende una secuencia correspondiente al menos a una región del bucle CDR3 de un TCR invariante a un transportador;
- (b) inmunizar un mamífero no humano con dicho péptido acoplado; y
- (c) aislar un anticuerpo que se une a un bucle CDR3 de un TCR invariante y que se une a y expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de: linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$.
- 50 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho péptido cíclico tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 60 % idéntica a una región de SEQ ID N.º: 1 que es al menos de 10 aminoácidos consecutivos.
- 55 9. Un método de generación de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho método:
- 60 (a) inmunizar un mamífero no humano deficiente de CD1 o linfocitos T invariantes con linfocitos T invariantes; y
- (b) aislar un anticuerpo que se une a un bucle CDR3 de un TCR invariante y que se une y expande o activa al menos una subpoblación de linfocitos T seleccionada del grupo de: linfocitos T NK, linfocitos T reactivos para CD1d y linfocitos T $J\alpha Q^+$.
- 65 10. El método de las reivindicaciones 5, 7 ó 9, en el que dicho mamífero no humano es un ratón inactivado para CD1d, un mamífero no humano tolerante a linfocitos T NK, un mamífero no humano tolerante a linfocitos T reactivos para

CD1d, un mamífero no humano tolerante a linfocitos T $J\alpha Q^+$, un mamífero no humano tolerante a TCR invariantes, un mamífero no humano en el que se han retirado los linfocitos T invariantes, un mamífero no humano que carece de parte de la cadena α de dicha cadena α de TCR o un mamífero no humano que carece de parte de la cadena β de dicho TCR.

5 11. Un método de visualización o de medida de la cantidad de TCR NK o del número de linfocitos T NK en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.

10 12. Un método de visualización o de medida de la cantidad de TCR reactivos para CD1d o de la cantidad de linfocitos T reactivos para CD1d en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.

15 13. Un método de visualización o de medida de la cantidad de TCR $J\alpha Q^+$ o de la cantidad de linfocitos T $J\alpha Q^+$ en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.

20 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, comprende además un marcador fluorescente, radiomarcador o etiqueta detectable magnética.

25 15. Un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra que comprende dichos linfocitos T con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos linfocitos T expresan un TCR invariante que tiene un bucle CDR3; y en el que dicha subpoblación de linfocitos T se une por dicho anticuerpo en el que dicho contacto se produce bajo condiciones que dan como resultado un incremento en el número de dichos linfocitos T en dicha subpoblación de linfocitos T.

30 16. El método de la reivindicación 15, que comprende además poner en contacto dicha muestra con un antígeno y células presentadoras de antígeno bajo condiciones que permitan dicho contacto para incrementar el número de dichos linfocitos T; en el que dicho antígeno es α -galactosilceramida.

35 17. El método de la reivindicación 15, que comprende además poner en contacto dicha muestra con un antígeno y células presentadoras de antígeno bajo condiciones que permitan dicho contacto para incrementar el número de dichos linfocitos T; en el que dicho antígeno no es α -galactosilceramida.

40 18. El método de la reivindicación 16 ó 17, en el que dicho antígeno es un antígeno de lípidos o glucosil-fosfatidilinositol de un patógeno infeccioso, un antígeno de una célula cancerosa o un propio lípido.

45 19. Un método de incremento del tamaño de una subpoblación de linfocitos T, comprendiendo dicho método:

(a) poner en contacto una muestra que comprende dichos linfocitos T con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, llevando a cabo dicho contacto bajo condiciones que permitan la formación de complejos entre dichos linfocitos T y dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo;

(b) aislar dicho complejo; y

(c) poner en contacto dichos linfocitos T en dicho complejo o linfocitos T recuperados de dicho complejo con un antígeno y células presentadoras de antígenos bajo condiciones que permitan dicho contacto para incrementar el número de dichos linfocitos T.

50 20. El método de la reivindicación 19, que comprende además poner en contacto dichos linfocitos T de la etapa (c) con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, bajo condiciones que permitan un incremento en el número de dichos linfocitos T.

55 21. El método de la reivindicación 19, que comprende además poner en contacto dichos linfocitos T de la etapa (c) con una citocina seleccionada del grupo que consiste en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IFN- α/β , IFN- γ y GM-CSF.

60 22. El método de la reivindicación 19, en el que dicho antígeno es α -galactosilceramida.

23. El método de la reivindicación 19, en el que dicho antígeno no es α -galactosilceramida.

24. El método de la reivindicación 19, en el que dicho antígeno es un antígeno de lípidos o glucosil-fosfatidilinositol de un patógeno infeccioso, un antígeno de una célula cancerosa o un propio lípido.

65

25. Un método de purificación de una subpoblación de linfocitos T de una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; en el que se usa dicho contacto para purificar dicha subpoblación de linfocitos T de dicha muestra.
- 5 26. El método de la reivindicación 25, que comprende además poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo anti-V α 24, CD4, CD8, CD56, CD161 o V β 11.
- 10 27. El método de la reivindicación 25, en el que dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, está unido covalentemente a un marcador fluorescente, en el que dicho complejo se aísla en base a la señal de fluorescencia de dicho complejo.
- 15 28. El método de la reivindicación 25, en el que dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, está unido covalentemente a un marcador magnético, en el que dicho complejo se aísla en base al magnetismo de dicho complejo.
- 20 29. El método de la reivindicación 15 ó 19, que comprende además poner en contacto dicha muestra con una citocina seleccionada del grupo que consiste en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IFN- α/β , IFN- γ y GM-CSF.
- 30 30. El método de la reivindicación 29, en el que dicha citocina altera la proporción de respuestas de desviación inmunitaria/Th1/Th2/ por dichos linfocitos T.
- 35 31. El método de la reivindicación 15, 19 ó 25, en el que dicho contacto da como resultado una modulación de la actividad de dicha al menos una subpoblación de linfocitos T, en el que dicha actividad se selecciona del grupo que consiste en: producción de citocinas, secreción de quimiocinas, incremento en el tamaño de la subpoblación de linfocitos T y expresión de proteínas coestimuladoras de superficie celular.
- 40 32. El método de la reivindicación 31, en el que dicha actividad de dichos linfocitos T se mide después de poner en contacto dichos linfocitos T con un antígeno o células presentadoras de antígenos.
- 45 33. Un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo, o cáncer en un mamífero.
- 50 34. El anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 33, en el que la administración del anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, da como resultado una modulación del número de linfocitos T en dicha al menos una subpoblación de linfocitos T.
- 55 35. El anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 33, en el que la administración del anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, da como resultado una modulación de la actividad de dicha al menos una subpoblación de linfocitos T, en el que dicha actividad se selecciona del grupo que consiste en producción de citocinas, secreción de quimiocinas, incremento en el tamaño de la subpoblación de linfocitos T y expresión de proteínas coestimuladoras de superficie celular.
- 60 36. El anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 34 ó 35, en el que dicha administración modula el número o la actividad de dichos linfocitos T después de la activación por un antígeno o células presentadoras de antígeno.
- 65 37. Un método de diagnóstico de un sujeto con una afección o un riesgo incrementado por una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmunitaria, infección vírica, infección bacteriana, infección parasitaria, infección por un patógeno eucariota, alergia, asma, afección inflamatoria, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, enfermedad de inmunodeficiencia, aborto espontáneo, embarazo y cáncer; comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- (b) cuantificar la cantidad de dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, unido a dicho TCR invariante o dichos linfocitos T; determinando de este modo la cantidad de linfocitos T de interés en dicha muestra; y
- (c) comparar la cantidad de dichos linfocitos T de interés en dicha muestra con la cantidad de dichos linfocitos T de intereses hallados en sujetos diagnosticados con dicha afección o en sujetos no diagnosticados con dicha afección.
38. El método de la reivindicación 37, que comprende además:

(d) comparar el número de un tipo de linfocitos T diferente de los linfocitos T de interés de la etapa (c) en dicha muestra con el número de dicho tipo de linfocitos T hallado en sujetos diagnosticados con dicha afección o en sujetos no diagnosticados con dicha afección.

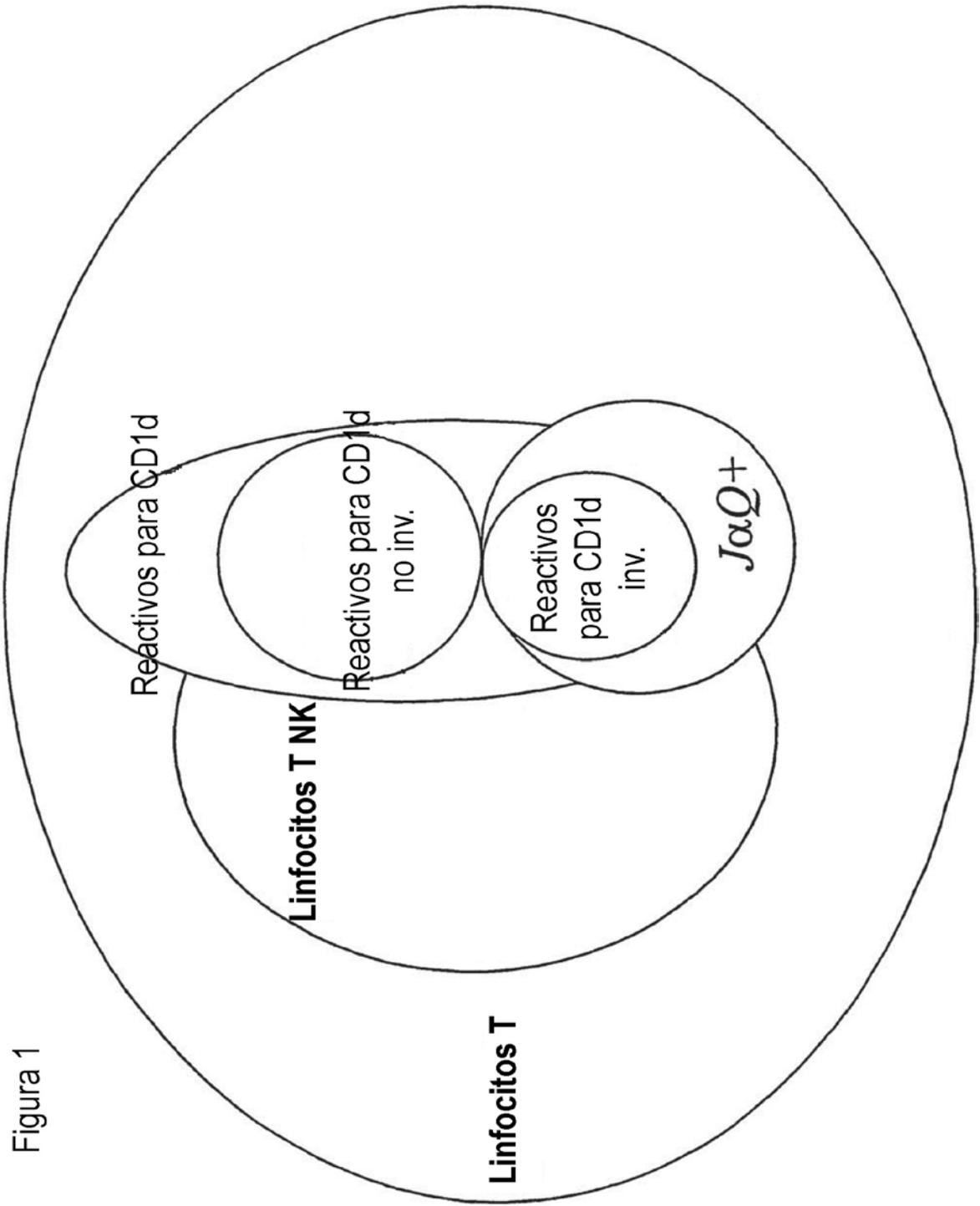
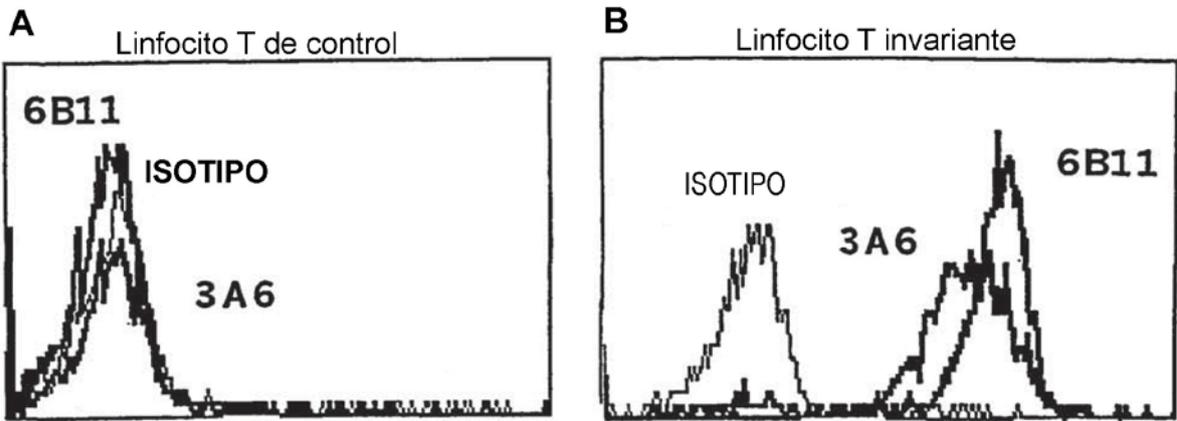


Figura 1

Figuras 2A y 2B



Figuras 3A y 3B

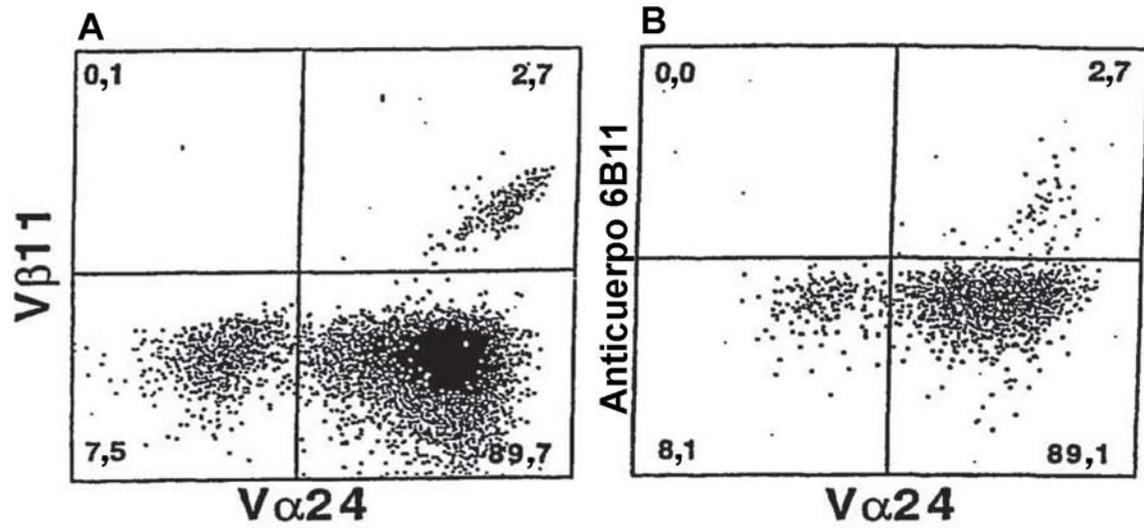
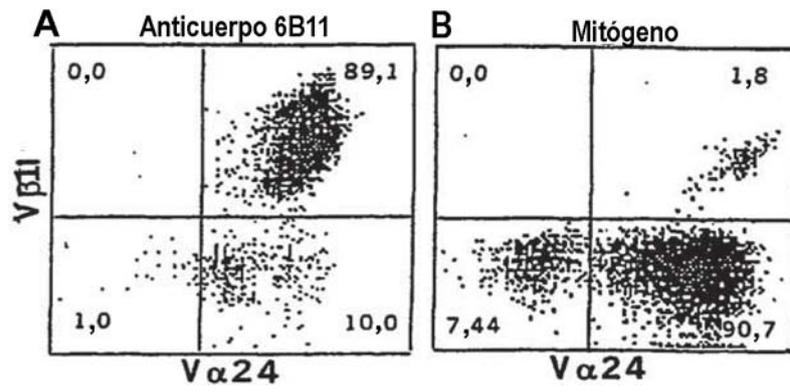
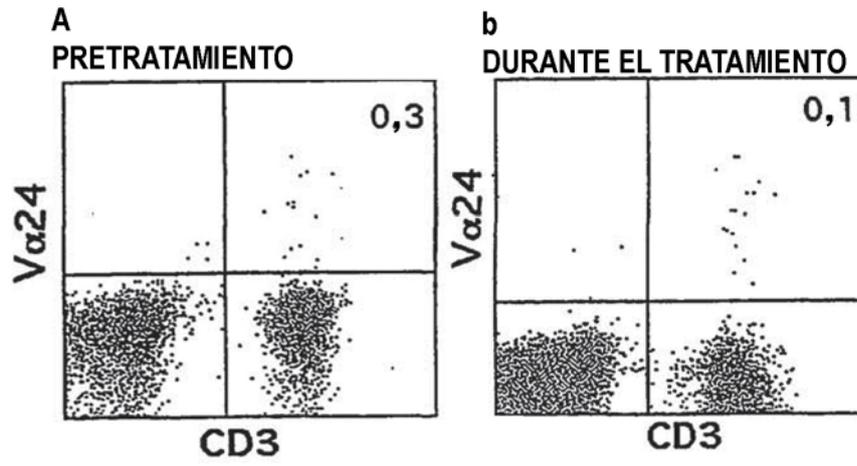


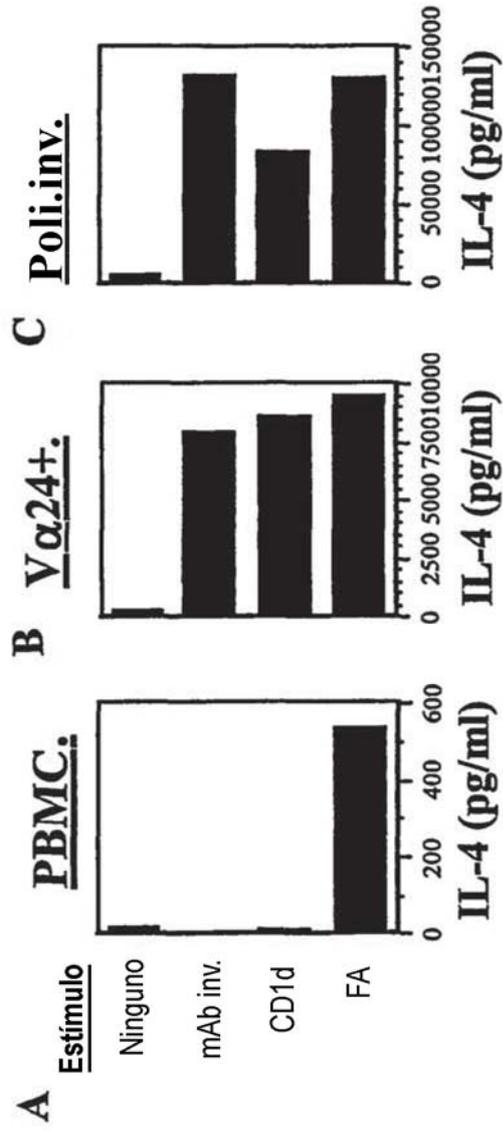
Figura 4A y 4B



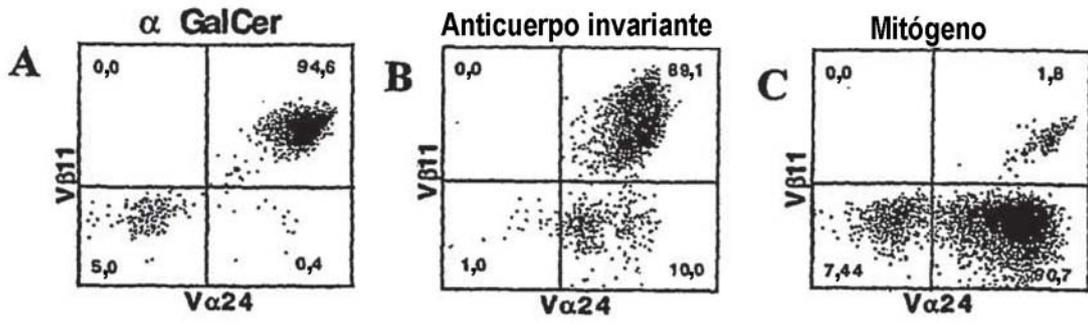
Figuras 5A y 5B



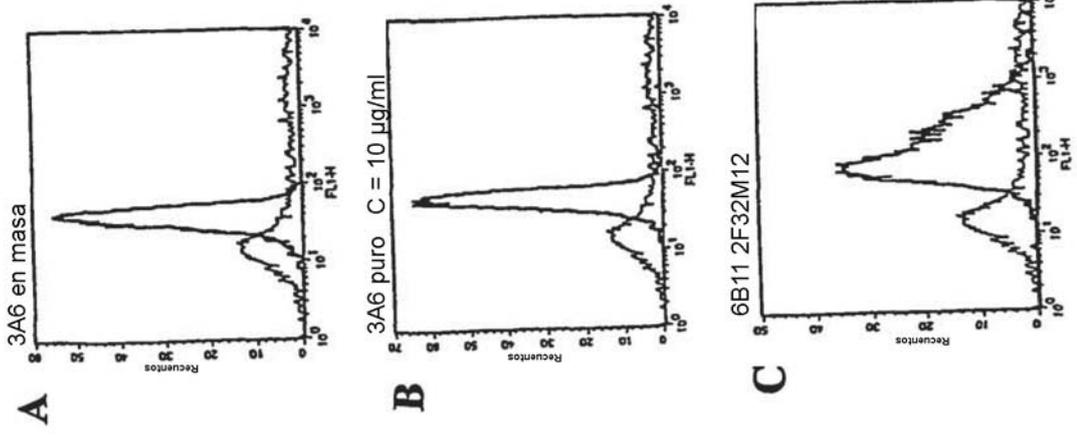
Figuras 6A-6C



Figuras 7A-aC



Figuras 8A-8C



Figuras 8D-8I

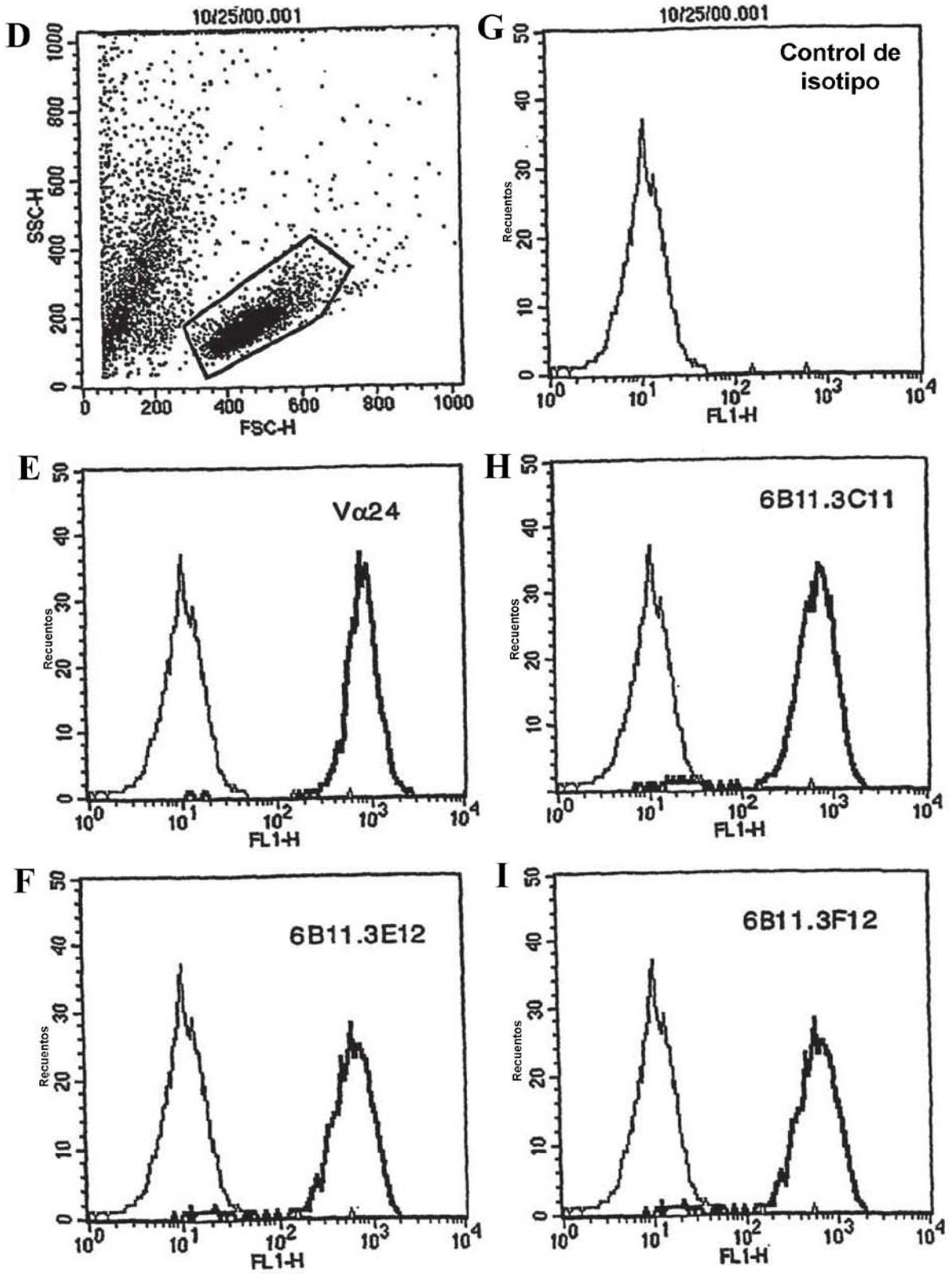
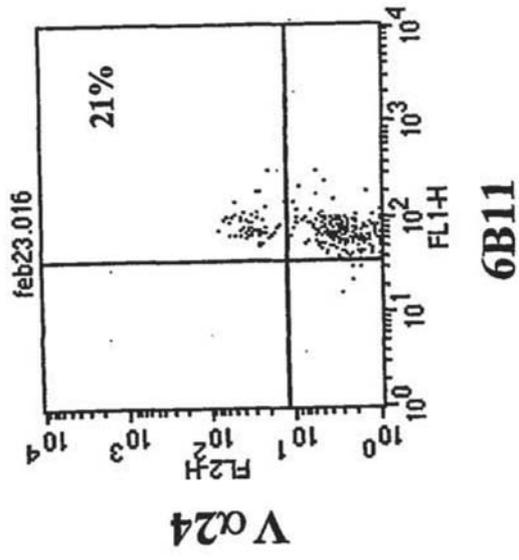
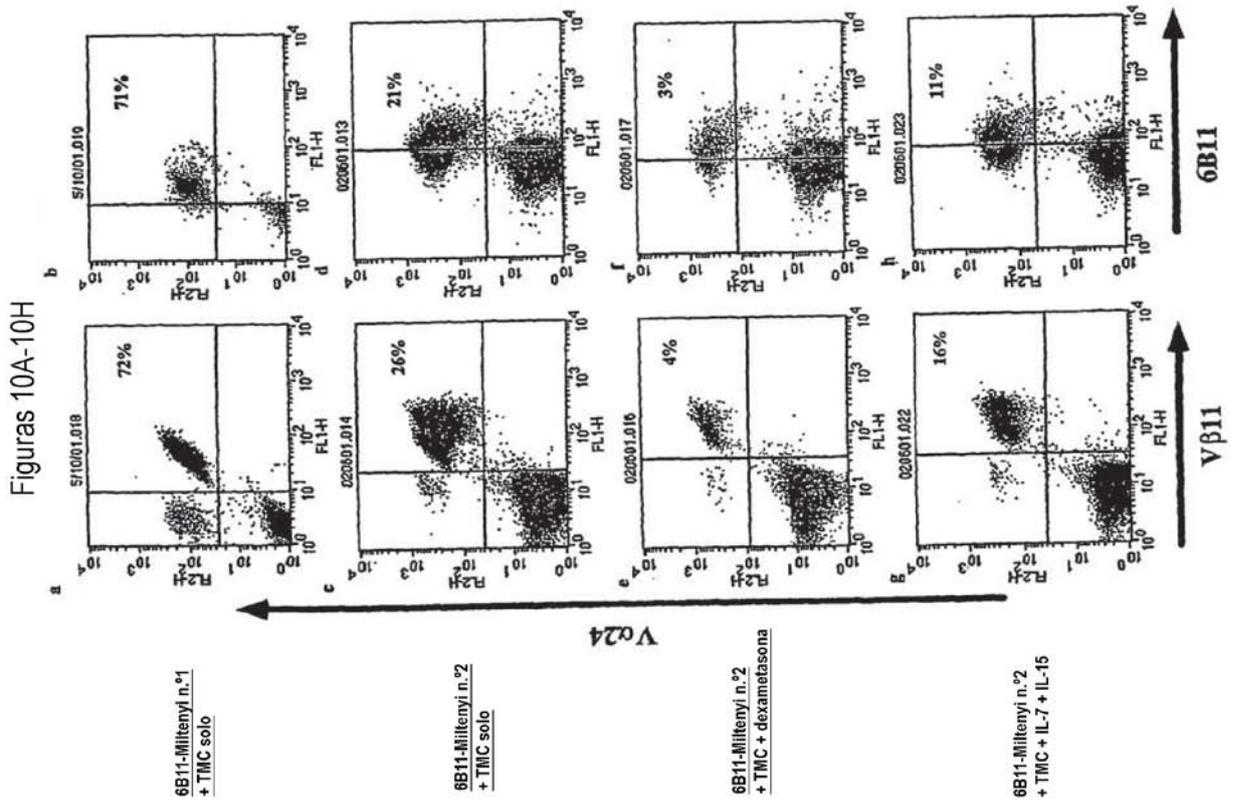


Figura 9





Figuras 11A-11F

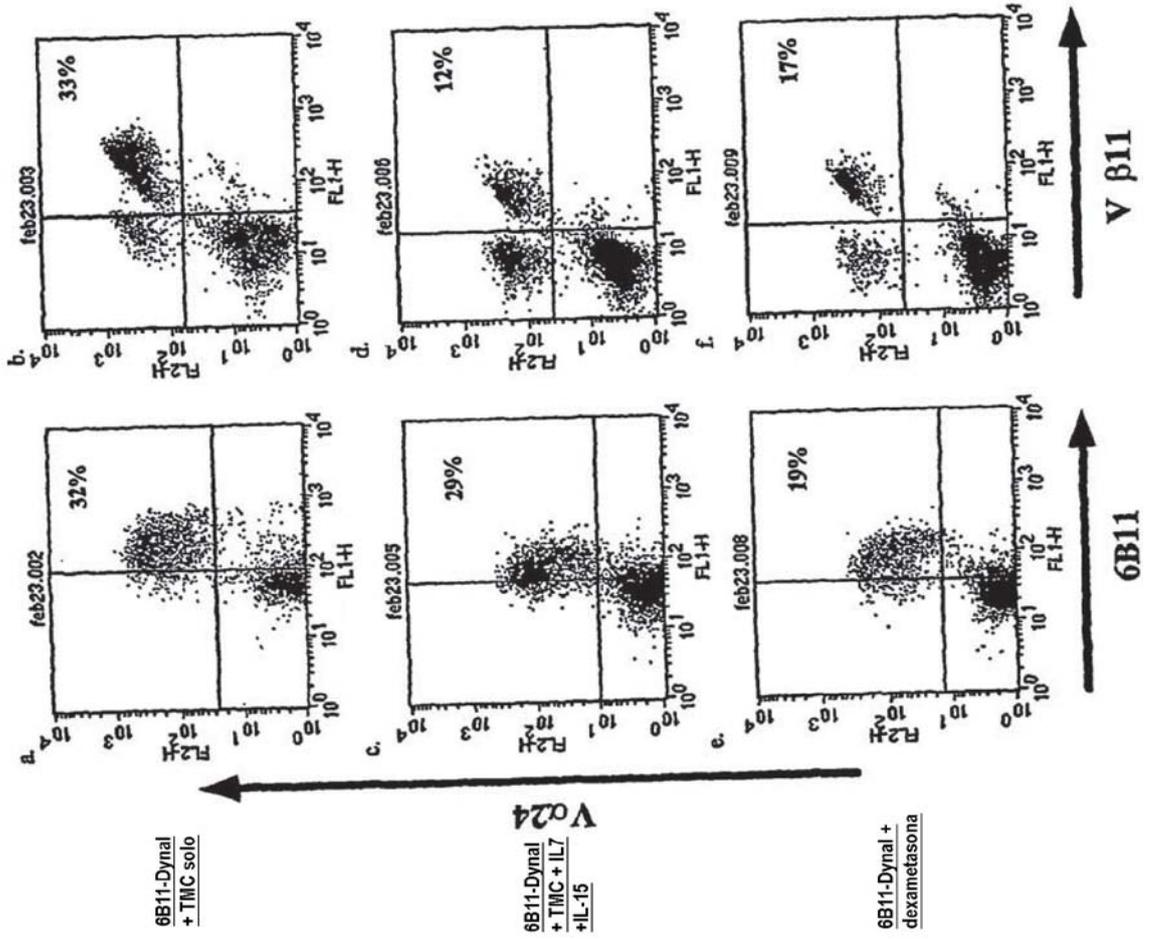


Figura 12

Miltenyi frente a Dynal 4/11/01			
	PBMC	Dynal @ 40	Miltenyi @ 20
Donante 1			
V α 24/6B11	0	8,46	4,53
V α 24/V β 11	0,01	4,85	4,71
V α 24		3,9	
Donante 2			
V α 24/6B11	0,01	0,99	5,91
V α 24/V β 11	0,01	1,47	6,16
V α 24		0,33	
Donante 3			
V α 24/6B11	0	N/A	71
V α 24/V β 11	0,03	N/A	72
V α 24			5,98
Control no clasificado de LKP 21			
V α 24/6B11	0,01		
V α 24/V β 11	0		

Figura 13

Perla de Dynal 1/19/01			
LKP 10 en 40 ug/ml 6B11 en TCM			
	V α 24/V β 11	32,98	Fig. 11 b
	V α 24/6B11	32	Fig. 11 a
LKP 10 en TCM + IL15/1L7			
	V α 24/V β 11	12,46	Fig. 11 d
	V α 24/6B11	29	Fig. 11 c
LKP 10 en TCM + dex			
	V α 24/V β 11	17,08	Fig. 11 f
	V α 24/6B11	19	Fig. 11 e
LKP 10 en TCM + IL15/IL7+dex			
	V α 24/Vp11	4,93	Fig. 10 b
	V α 24/6B11	13,81	Fig. 10 a

Figura 14

Prep. de perla de Dynal 6B11 3/9/01		
Control sin clasificar de LKP 14		
3/20/01	V α 24/V β 11	0,02 %
	V α 24/6B11	0,01 %
LKP 14 6B11 + PHA + auto APC		
3/20/01	V α 24/V β 11	0,09 %
	V α 24/6B11	0 %
4/20/01	V α 24/V β 11	0,13 %
	V α 24/6B11	0,00 %
	V α 24	0,01 %
LKP 14 6B11 + auto APC		
3/20/01	V α 24/V β 11	0,68 %
	V α 24/6B11	0,02 %
4/20/01	V α 24/V β 11	0,15 %
	V α 24/6B11	0,00 %
	V α 24	0,73 %
4/27/01	alfa Gal Cer estim.	
5/10/01	V α 24/V β 11	2,73 %
	V α 24/6B11	2,94 %
Control sin clasificar		
	V α 24/V β 11	0,01 %
	V α 24/6B11	0,01 %
6B11 + PHA + auto APC		
4/20/01	V α 24/V β 11	3,64 %
	V α 24/6B11	3,75 %
5/10/01	V α 24/V β 11	5,01 %
	V α 24/6B11	4,92 %

Figura 15

Prep. de perla de Dynal 6B11 3/9/01		
Control sin clasificar de LKP 13		
	V α 24/V β 11	0,07 %
	V α 24/6B11	0,06 %
LKP 13 6B11 + PHA + alo APC		
4/20/01	V α 24/V β 11	1,85 %
	V α 24/6B11	0 %
	V α 24	1,16 %
5/10/01	V α 24/V β 11	14,29 %
	V α 24/6B11	
Control sin clasificar		
	V α 24/V β 11	0,01 %
	V α 24/6B11	0,00 %
6B11 + PHA + auto APC		
4/20/01	V α 24/V β 11	0,05 %
	V α 24/6B11	0,06 %
	V α 24	3,22 %
6B11 + auto APC		
4/20/01	V α 24/V β 11	0,78 %
	V α 24/6B11	0,00 %
	V α 24	1 %

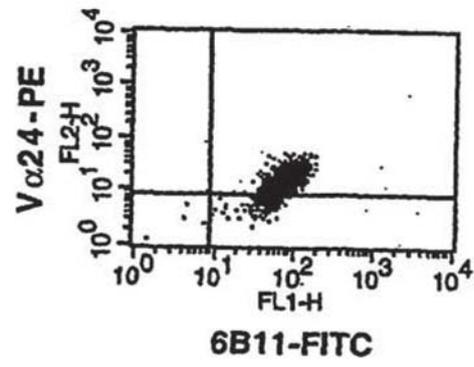
Figura 16

Prep. nº. 1 de Miltenyi 6B11		1/01
LKP2 +auto APC en TCM		
2/6/01	V α 24/V β 11	26,07 %
	V α 24/6B11	21 %
2/23/01	V α 24/6B11	10,79 %
3/26/01	alfa Gal Cer estim.	
4/20/01	V α 24/V β 11	73,40 %
	V α 24/6B11	74,66 %
4/27/01	alfa Gal Cer estim.	
5/14/01	V α 24/V β 11	80,87 %
	V α 24/6B11	79,98 %
LKP2 +auto APC en TCM + IL7/IL15		
2/6/01	V α 24/V β 11	16 %
	V α 24/6B11	11 %
3/26/01	alfa Gal Cer estim.	
4/20/01	V α 24/V β 11	54,28 %
	V α 24/6B11	56,89 %
4/27/01	alfa Gal Cer estim.	
5/14/01	V α 24/V β 11	68,05 %
	V α 24/6B11	68,85 %
	V α 24	1,66 %

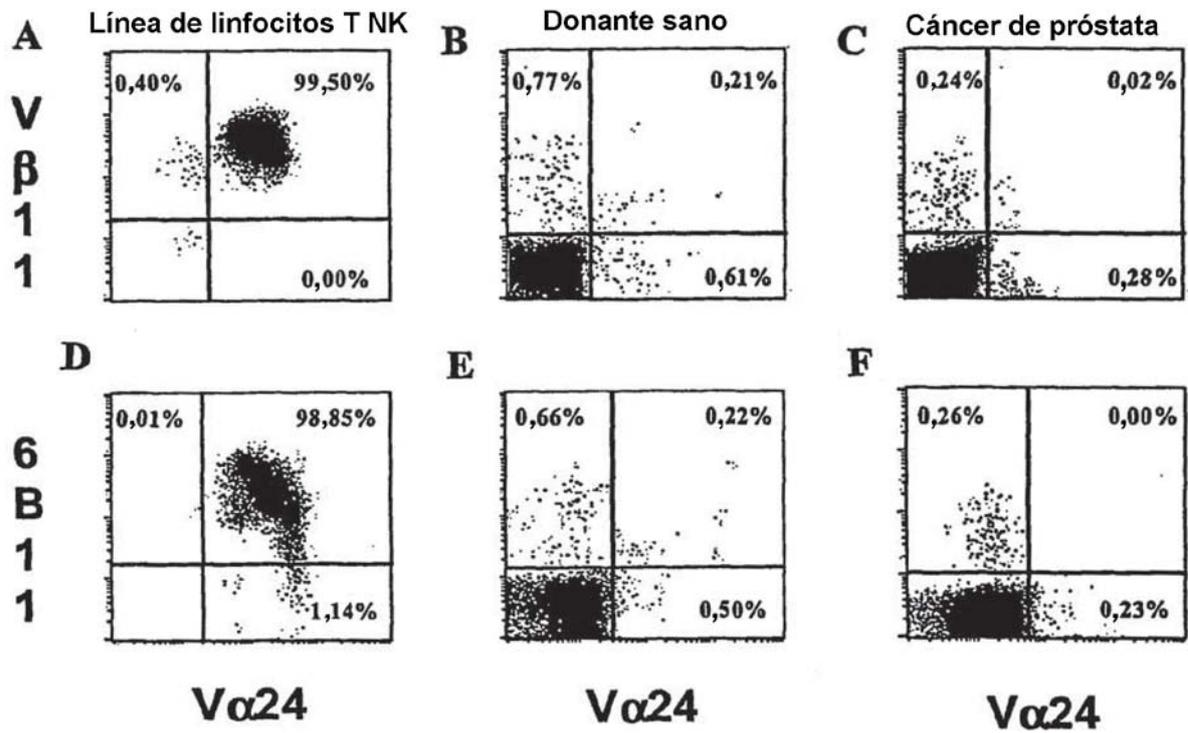
Figura 17

	Prep. n.º 2 de Miltenyi	1/01	
	LKP 11 en V α 24 + auto APC + PHA		
Fig. 10c	2/23/01	V α 24/6B11	63,75 %
Fig. 10d	3/20/01	V α 24/V β 11	1,43 %
		V α 24/6B11	0,07 %
	4/27/01	alfa Gal Cer estim.	
	5/10/01	V α 24/V β 11	24,78 %
		V α 24/6B11	14,94 %
	LKP 11 en 6B11 + auto APC + PHA		
	2/23/01	V α 24/6B11	45,27 %
	LKP 12 en V α 24 + auto APC + PHA		
Fig. 10g	2/23/01	V α 24/6B11	33,51 %
Fig. 10h	3/20/01	V α 24/V β 11	0,25 %
		V α 24/6B11	0,25 %
	4/27/01	alfa Gal Cer estim.	
	5/14/01	V α 24/V β 11	0,00 %
		V α 24/6B11	0,00 %
		V α 24	55,00 %

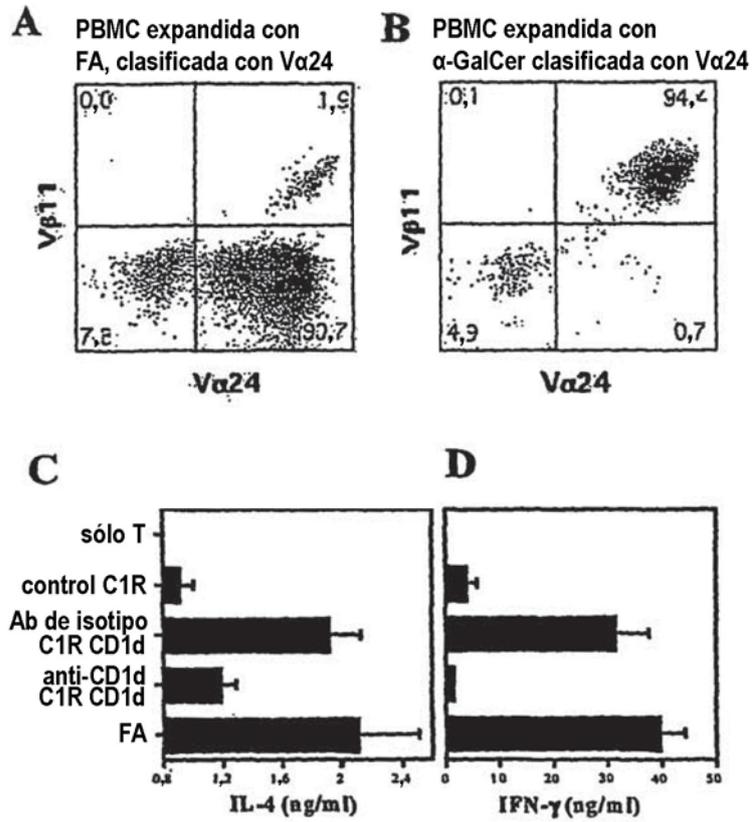
Figura 18



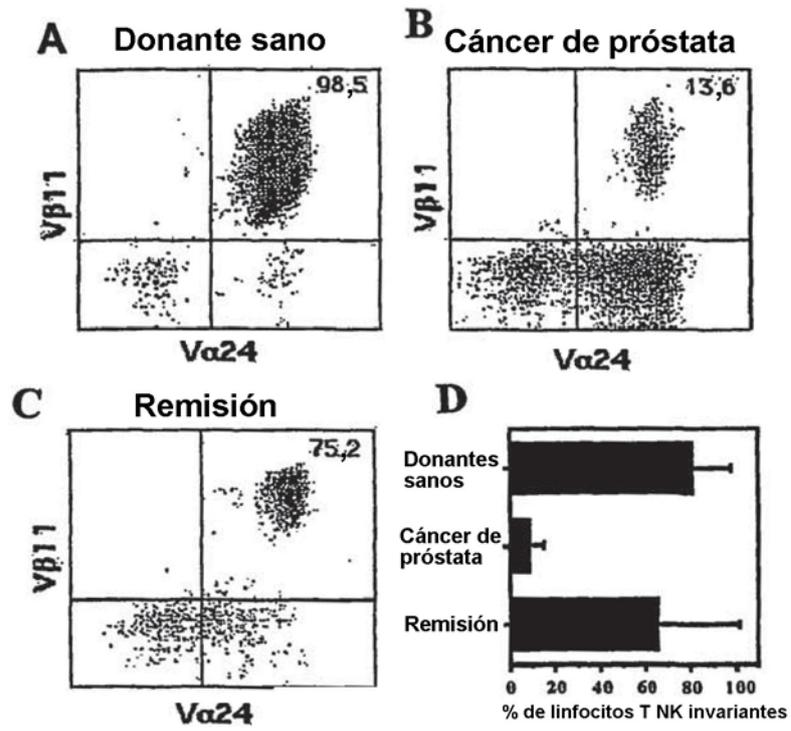
Figuras 19A-19F



Figuras 20A-20D



Figuras 21A-21D



Figuras 22A-22E

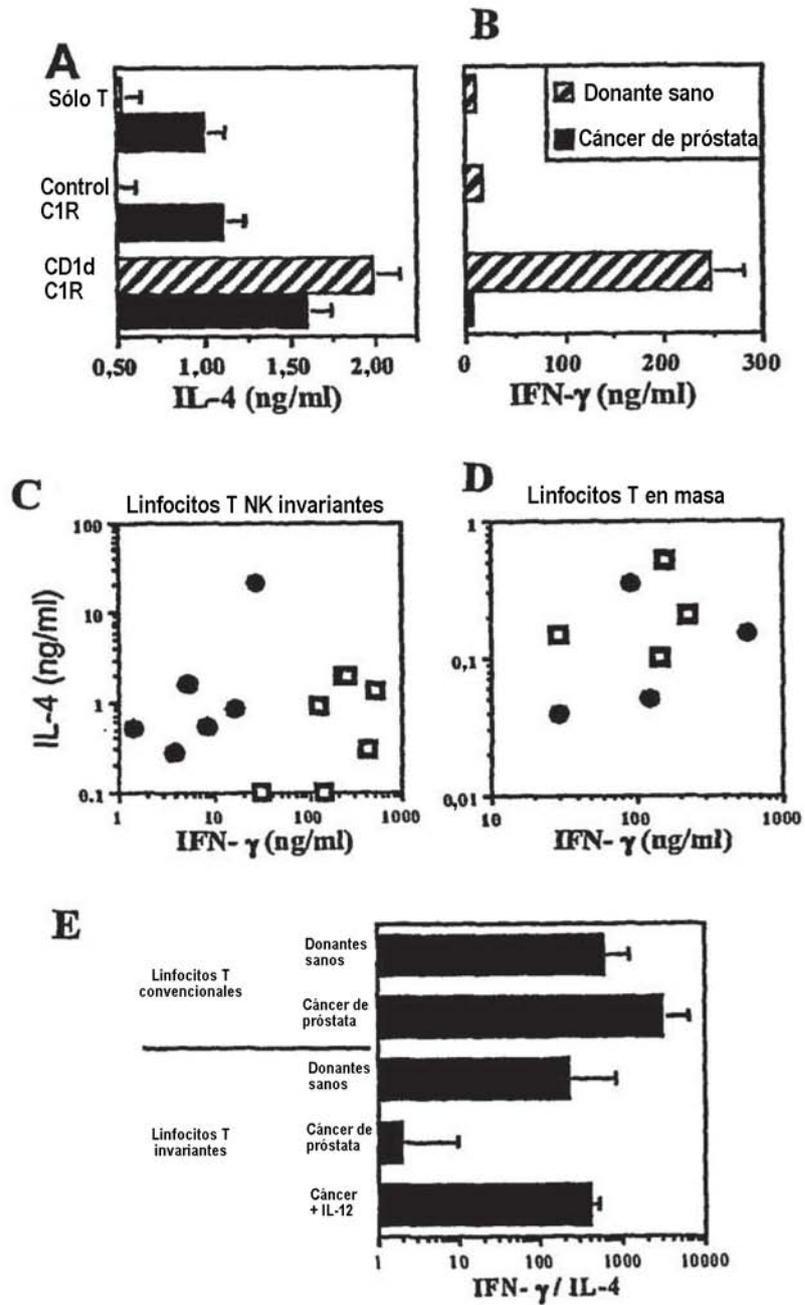


Figura 23
Estudio celular dendrítico NK-T sero-negativos

Fecha	ID de paciente	Nombre	Estado serológico	CD4 ABS	VIH copias/ml	Recuento gangl.	Recuento linfocitos T	Recuento NK-T	% Gangl. NK-T II	Gangl. ABS	ABS NK-T	% NK-T II CD3	% CD123+ DC II Leuc.	% CD11c+ DC II Leuc.	WBC	ABS CD123+DC	ABS CD11c+DC
05/03/00	Yang		0			4472S	27503	44	0,0984		0,0000	0,1600	***	***		***	***
05/09/00	91841		0	927		79175	64673	74	0,0935	1782	16,655	0,1144	***	***	5400	***	***
05/11/00	42893		0			67709	47828	1	0,0015		0,0000	0,0021	***	***		***	***
5/18/00	91B21		0	787		47660	32443	4	0,0084	1749	0,1468	0,0123	***	***	5300	***	***
5/24/00	91960		0	821		33001	26942	166	0,5030	1150	57,847	0,6161	***	***	5000	***	***
5/25/00	91960*		0	621		33855	27347	206	0,6085	1150	69,975	0,7533	***	***	5000	***	***
5/30/00	92001		0	898		85330	46830	48	0,0735	1632	11,991	0,1029	***	***	4800	***	***
06/06/00	92065		0	735		61812	50967	15	0,0243	1634	0,3965	0,0294	***	***	3800	***	***
6/14/00	92145		0	796		94897	56717	26	0,0308	1768	0,5415	0,0458	***	***	5200	***	***
8/24/00	92673		0	821		76582	51494	45	0,0588	2160	12,692	0,0874	0,170	0,320	4000	6,80	12,80
09/08/00	40211		0	1040		98769	78779	56	0,0579	2040	11,805	0,0711	0,057	0,027	5100	2,93	1,37
09/08/00	92800		0	957		62627	63397	31	0,0375	1740	0,9528	0,0489	0,043	0,084	5800	2,47	4,85
1/24/01	42959		0	0		153419	112395	19	0,0124		0,0000	0,0169	0,032	0,051		0,00	0,00
1/25/01	40545		0	653		79252	44870	15	0,0189	1452	0,2748	0,0334	0,135	0,358	3300	4,47	11,81
1/25/01	40834		0	583		44101	36543	1	0,0023	1122	0,0254	0,0027	0,050	0,086	5100	2,55	4,39
1/31/01	41214		0	***		***	***	***	***	***	***	***	0,088	0,084		0,00	0,00
1/31/01	42868		0	***		***	***	***	***	***	***	***	0,073	0,062		0,00	0,00
02/01/01	400B6		0	850		76313	67231	42	0,0550	1700	0,9356	0,0625	0,086	0,240	5000	4,31	11,98
02/01/01	40128		0	689		61816	47823	22	0,0356	1377	0,4901	0,0460	0,030	0,043	5100	1,54	2,21
2/22/01	40059		0			111766	B5872	5	0,0045		0,0000	0,0056	0,040	0,085		0,00	0,00
2/28/01	41842		0			62325	48159	12	0,0193		0,0000	0,0249	0,111	0,264		0,00	0,00

Estado serológico: 0=seronegativo, 1=infestado con VIH-1, 2=Seroconversión VIH-1, 3=sida
>0,02 % Linfocitos T NK- II ganglios considerados positivos
*5/25/00 (91960) la sangre tiene 24 h

Estudio celular dendrítico NK-T sero-negativos

Figura 23 (continuación)

Fecha	ID de paciente	Nombre	Estado serológico	CD4 ABS	VIH copias/ml	Recuento linf.	Recuento linfocitos T	Recuento NK-T	% linf. NK-T II	Linf. ABS	ABS NK-T	% NK-T II CD3	% CD123+ DC II Leuc	% CD11c+ DC II Leuc	WBC	ABS CD123+DC	ABS CD11c+DC
05/25/00	40263		1	635	2257	79350	50332	6	0,0076	1813	0,1371	0,0119	***	***	3700	***	***
06/01/00	41989		1	699	0	81811	63503	250	0,3056	2254	6,8878	0,3937	***	***	4600	***	***
06/14/00	40846		3	559	0	98766	74485	3	0,0030	242	0,0739	0,0040	***	***	7600	***	***
06/15/00	45555		1	668	30300	93116	8959	11	0,0118	2088	0,2467	0,0197	***	***	7200	***	***
06/15/00	41400		3	199	167000	50249	43105	6	0,0119	1107	0,1322	0,0139	***	***	4100	***	***
08/28/00	42946		1	768	212000	76925	63905	12	0,0156	2193	0,3421	0,0188	0,070	0,260	5100	3,57	13,26
09/08/00	20461		1	671	308	181054	111247	3	0,0017	3726	0,0617	0,0027	0,023	0,023	8100	1,82	1,87
09/08/00	40177		1	658	0	73001	54950	8	0,0110	1530	0,1677	0,0146	0,027	0,090	5100	1,37	4,56
01/24/01	41411		2	977		108212	88856	34	0,0314	2640	0,8295	0,0383	0,151	0,266	6000	9,03	15,98
01/26/01	40360		2	***	***	**	***	***	***	***	***	***	0,083	0,132		0,00	0,00
02/07/01	41266		1	354		48310	35405	1	0,0021	1219	0,0252	0,0028	0,040	0,137	5300	2,14	7,28
02/07/01	40646		2	0		55088	46321	2	0,0036		0,0000	0,0043	0,078	0,139		0,00	0,00
02/07/01	41329		1	0		86792	78696	5	0,0058		0,0000	0,0064	0,072	0,075		0,00	0,00
02/08/01	42964*		(desconocido)	0		62696	52449	10	0,0159		0,0000	0,0191	0,031	0,038		0,00	0,00
02/14/01	42946		(desconocido)	0		103913	83889	54	0,0520		0,0000	0,0644	0,039	0,124		0,00	0,00
02/22/01	41977		1			121798	95033	25	0,0205		0,0000	0,0263	0,022	0,029		0,00	0,00
03/01/01	40605		4			86319	71338	29	0,0336		0,0000	0,0407	0,088	0,092		0,00	0,00

Estado serológico: 0=seronegativo, 1=infestado con VIH-1, 2=Seroconversión VIH-1, 3=sida
 >0,02% Linfocitos T NK II ganglios considerados positivos
 *5/25/00 (91960) la sangre tiene 24 h

Figura 23 (continuación)

Fecha	ID de paciente	Estado serológico	CD4 ABS	VIH copias/ml	Recuento linf.	Recuento linfocitos T	Recuento NK-T	% NK-T II limf.	% NK-T II CD3	CD123+ DC II Leuc.	CD11C+ DC II Leuc.
	<u>SERONEGATI</u>										
05/03/00		0			44726	27563	51	0,1140	0,1954		
05/09/00	1641	0			76175	64673	74	60,935	0,1144		
05/11/00	42893	0			67709	47828	1	0,0015	0,0021		
5/18/00	91921	0			47660	32443	4	0,0084	0,0123		
5/24/00	91960	0			33001	26942	166	0,5030	0,6161		
5/30/06	92001	0			65330	46630	48	0,0735	0,1029		
06/06/00	92065	0			61812	50967	15	0,0243	0,0294		
8/14/00	92145	0			94897	56717	26	0,0306	0,0458		
8/28/00	92673	0	6		76582	51464	45	0,0588	0,0674	0,17	0,32
9/8/89	92800	0			82687	63390	31	0,0375	0,0489	0,04	0,08
09/08/99	40211	0	1040		98760	78774	56	0,0579	0,0711	0,06	0,03
	media				67304,545	49766,66	47	0,091188895	0,119637	0,06	0,143333333
	DE				19359,286	16224,34	4,547367	0,140902923	0,17276109	0,07	0,155626879
	<u>SEROPOSITIVOS (DETECTABLE)</u>										
9/8/09	20461	1	671	308	181054	111237	3	0,0017	0,0027	0,02	0,02
5/25/00	46263 Visita	1	635	2257	76356	56332	6	0,0076	66,110		
6/15/00	45555 Visita	1	688	30300	93116	55608	11	0,0118	0,0197		
6/15/00	41400 Visita	3	199	167000	50249	43165	6	0,0119	0,0139		
8/28/00	42946	1	768		76925	63905	12	0,0156	0,0188	0,07	0,26
	media				96138,8	64933,4	7,6	0,009714354	0,01339948	0,045	0,14
	DE				46641,556	27002,65	3,781534	0,005328085	0,0068081	0,035355339	0,169705627
09/08/1999	40177	1	658	0	73001	54646	8	0,0110	0,0146	0,03	0,09
06/01/2000	41989 Visita	1	699	0	81811	63503	250	0,3056	0,3937		
6/14/00	40846 Visita	3	559	0	98766	74465	3	0,0030	0,0040		
8/28/00	42946	1	768		76925	63905	12	0,0156	0,0188	0,07	0,26
	media				82625,75	64269,75	68,25	0,083794556	610,776,167	0,05	0,175
	DE				11347,626	7990,796	1212226	0,147949482	0,19071445	0,028284271	0,120208153
	<u>TODOS SEROPOSITIVOS</u>										

Figura 24 : Porcentaje de células que expresan ambos marcadores sobre el número total de células recogidas

Serie	Control	Nueva aparición	Control	Nueva aparición	Control	Nueva aparición	Control	Nueva aparición
1	6B11 FC 0,02	6B11 FC 0,07	VB11 PE 0,03	6B11 FC 0,08	VA24 FC	VB11 PE 0,04	VB11 PE 0,05	
2	0,10	0,17	0,13	0,28		0,05	0,08	
3	0,05	0,17	0,00	0,23		0,04	0,22	
4	0,06	0,33	0,03	0,32		0,09	0,26	
5	0,03	0,03	0,02	0,00		0,03	0,00	
6	0,06	0,23	0,08	0,21		0,09	0,23	
7	0,06	0,09	0,08	0,14		0,08	0,12	
Promedio	0,05	0,16	Promedio	0,18	Promedio	0,06	0,14	
Des. est.	0,03	0,10	Des. est.	0,11	Des. est.	0,03	0,10	

Serie	Control	Nueva aparición	Control	Nueva aparición	Control	Nueva aparición
1	6B11 FC 0,02	6B11 FC 0,08	VB11 PE 0,03	6B11 FC 0,09	VA24 FC	VB11 PE 0,06
2	0,11	0,17	0,14	0,30		0,06
3	0,06	0,19	0,00	0,25		0,05
4	0,07	0,34	0,03	0,33		0,10
5	0,05	0,04	0,04	0,00		0,04
6	0,07	0,29	0,10	0,27		0,11
7	0,07	0,12	0,09	0,17		0,09
Promedio	0,06	0,18	Promedio	0,20	Promedio	0,07
Des. est.	0,03	0,11	Des. est.	0,12	Des. est.	0,03
	0,03506137		0,021871			0,088943

Tabla 1: Porcentaje de células que expresan ambos marcadores sobre la población seleccionada

Figura 25A

Genes expresados diferencialmente entre clones de linfocitos T citolíticos naturales ME10 y GW4

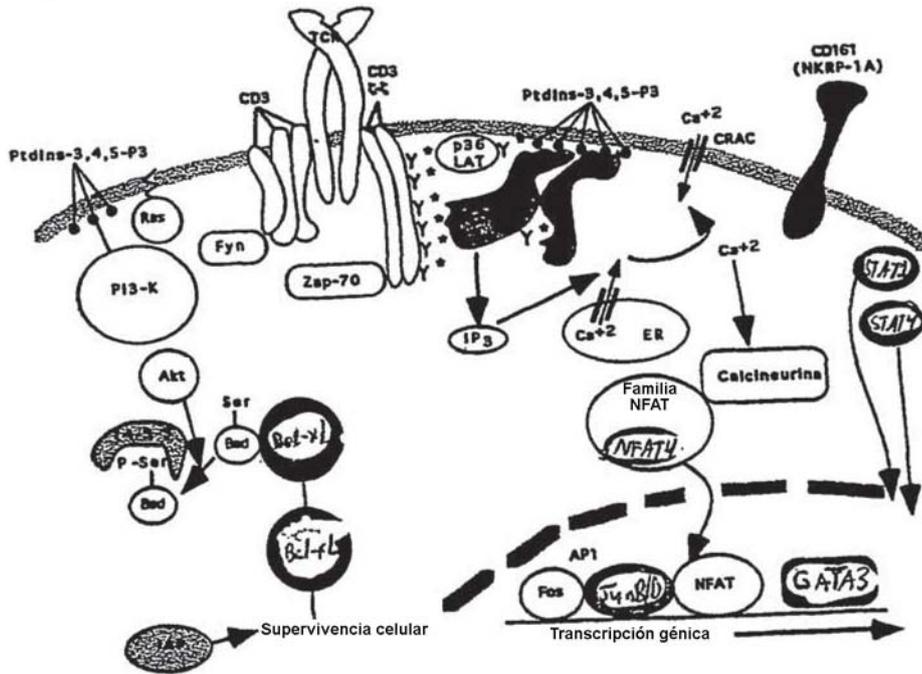
Categoría funcional	N.º acceso	Nombre común	Clúster (fila, columna)	Categoría funcional	N.º acceso	Nombre común	Clúster (fila, columna)
Receptor de superficie				V00536		IFN- γ	(1,2)
U38276		Semaforina 111	(1,1)	M13207		GM-CSF	(1,2)
U82169		Frizzled	(1,1)	M16441		TNF- α	(1,2)
M32315		TNF-R	(1,2)	X02910		TNF- α	(1,2)
U03397		4-16 B	(1,2)	X04688		IL-5	(1,2)
S77S12		VEGF-R	(1,2)	U31120		IL-13	(1,2)
X01057		IL-2R α	(1,2)	M3743S		M-CSF	(1,2)
Y00285		IGF-R II	(1,2)	U02020		PBEF	(1,2)
L08096		CD27	(1,2)	U37S18		TRAIL	(1,2)
230426		CD 69	(1,2)	U46461		Homólogo dishevelled	(1,2)
U7E764		CD97	(1,2)	M90391		IL-16	(2,3)
U60800		CD100	(1,2)	Proteína nuclear			
M24283		Rinovirus-R	(1,2)	U73477		Nuclear pp32	(1,1)
LI19906		Arginina vasopresina-R	(1,2)	U52962		Int-6	(1,2)
Z48042		p137	(1,2)	L25931		Receptor lamina B	(1,3)
079206		Ryudocan	(1,3)	M17733		Timosina- β 4	(2,3)
HT3125		CD44	(1,3)	Factor de transcripción			
L39064		IL-9R	(2,1)	M69043		I κ B α	(1,2)
X14046		CD37	(2,1)	X58072		GATA-3	(1,2)
L31584		EBM	(2,1)	U43185		STAT-5A	(1,2)
X97267		LPAP	(2,1)	X5134S		Jurv-fi	(1,2)
M336S0		TAPA-1	(2,2)	X56681		JurvO	(1,2)
M63175		AMFR	(2,2)	U15460		B-ATF	(1,2)
U60975		gp250	(2,2)	HT4899		C-myc	(1,2)
250022		C21orf3	(2,2)	L00058		C-myc	(1,2)
U30546		Butirofilina BT4	(2,3)	M13929		C-myc	(1,2)
US05S2		Butirofilina BT5	(2,3)	U26173		NF-IL3A	(1,2)
X96719		AICL	(2,3)	M97796		Id-2	(1,2)
Citoesqueleto				MS6843		Id-2B	(1,2)
U80184		Homólogo Flightless I	(1,1)	D14826		CREM	(1,2)
X0C351		β -actina	(1,2)	S68271		CREM	(1,2)
U20582-		Péptido tipo actina	(1,2)	J03827		Y box BP	(1,2)
X82207		β -oeractina	(1,2)	1109412		ZNF134	(1,2)
XS8534		VASP	(1,2)	U13044		NRF-2 α	(1,2)
D83735		Calponina	(2,1)	U22431		HIF-1 α	(1,2)
J00314		β -tubulina	(2,3)	X78925		HZF-2	(1,2)
M21812		Miosina LC	(2,3)	247727		RNA POL2K	(1,2)
X98411		Miosina IE	(2,3)	J 04076		EGR-2	(1,3)
Cinasa/fosfatasa				D61380		DJ-1	(1,3)
X79510		PTPD1	(1,1)	HT4S67		PC4	(1,3)
L1C717		mc	(1,2)	HT4921		Homólogo BTF-3	(2,1)
X60673		AK3	(1,2)	141057		NFAT-4C	(1,2)
X85545		PKX-1	(1,2)	L78440		STAT-4	(2,3)
D13720		LYK	(1,2)	M82882		ELM	(2,3)
HTI153		Nm23-H2S	(1,2)	M83667		NHL6	(2,3)
M30448		CK II β	(1,2)	Transducción de señal			
M90299		Glucocinasa	(1,2)	HT5108		TRAP-3	(1,1)
U0S316		ISPK-1	(1,2)	X80200		MLN62	(1,1)
X80910		PPP1CB	(1,2)	U20158		StP-76	(1,2)
X93920		DUSP-6	(1,2)	U26710		CbH>	(1,2)
U24152		PAK-1	(1,3)	D78132		RHEB	(1,2)
D11327		PTPN7	(1,3)	M53573		SCYLP	(1,2)
U15932		DUSP-5	(1,3)	M75099		FKS06 BP	(1,2)
L16862		GRK-6	(2,1)	235227		TTF	(1,2)
L27071		TXK	(2,1)	U19261		EBV-independiente	(1,3)
J03805		PPP2C8	(2,2)	M28209		RAB-t	(2,2)
HT3678		CLK-1	(2,3)	D78577		14-3-3-Eta	(2,3)
U66464		HPK-1	(2,3)	X89399		Ins(1345)P4 BP	(2,3)
X62535		DAG cinasa	(2,3)	Metabolismo de ARN			
M3724		PTP-1B	(2,3)	D38251		RNPB5	(1,1)
Citocina				U90547		Homólogo RNP	(1,1)
U89922		LT- β	(1,1)	X17567		RNPB	(1,2)
J00219		IFN- γ	(1,2)	M29064		RNPB1	(1,2)

Figura 25 A (continuación)

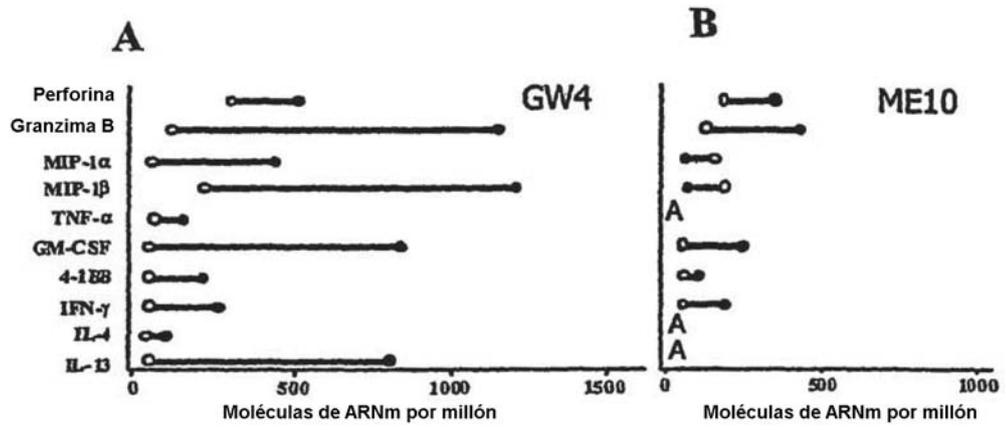
Categoría funcional	N.º de acceso	Nombre común	Clúster (fila, columna)
	HT110	RNP A/8	(1,2)
	Z23064	RNPG	(1,2)
	HT3238	RNPK	(1,2)
	X52979	RNP SmB	(1,2)
	U15009	RNP SmD3	(1,2)
	X85372	RNP 5m F	(1,2)
	U30827	SFSRp40	(1,2)
	X70944	SF (PTP-asociado)	(1,2)
	M60858	Nucleolina	(1,2)
	U10323	NF45'	(1,2)
	U38846	Estimulador de TAR	(1,2)
	X59417	PROS-27	(1,2)
	X59892	IFN-independiente γ 2	(1,2)
	X66899	EWS	(1,2)
	X71428	fus	(1,2)
	X72727	Tunp	(1,2)
	X75755	PR264	(1,2)
	Z24724	Sitio poly A	(1,2)
	128010	RNP F	(1,3)
	HT4788	RNP 1	(1,3)
	L03532	M4	(1,3)
	U69546	RNA BP	(2,3)
Apoptosis			
	Z23115	Bcl-X _L	(1,2)
	U45878	IAP-1	(1,2)
	U11821	Ligando Fas	(1,2)
	S81914	IEX-1	(1,2)
	U37546	MIHC	(1,2)
Quimiocina			
	M23178	MIP-1 α	(1,2)
	J04130	M1P-1 β	(1,2)
	M69203	MCP-1	(1,2)
	1.19686	MIF	(1,3)
Metabolismo de proteínas			
	D28473	ILE-tRNA sintasa	(1,2)
	U09510	GLY-tRNA sintasa	(1,2)
	L25085	Sec61- β	(1,2)
	X74801	Chaperonina cctg	(1,2)
	X77S84	Tioredoxina	(1,2)
	Y00281	Riboforina 1	(1,2)
	Y10807	ARG-metiltransferasa	(1,3)
	D13748	EIMAI	(1,3)
	X55733	EIF-4B	(2,1)
	X76648	Glutaredoxina	(2,3)

Se enumeran los genes que pueblan los 6 clústeres de expresión para las 11 categorías funcionales génicas mostradas en la fig. 2. Cada gen está identificado por el n.º de acceso de GenBank [o el identificador del Institute for Genomic Research (TIGR) para designaciones HT], seguido de un nombre común y el clúster específico en el que se clasifican (fila, columna).

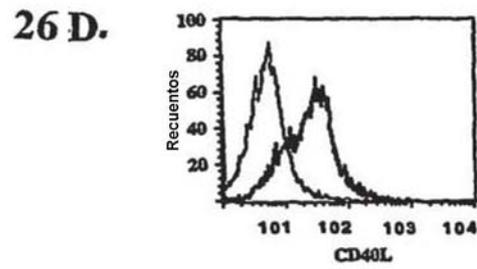
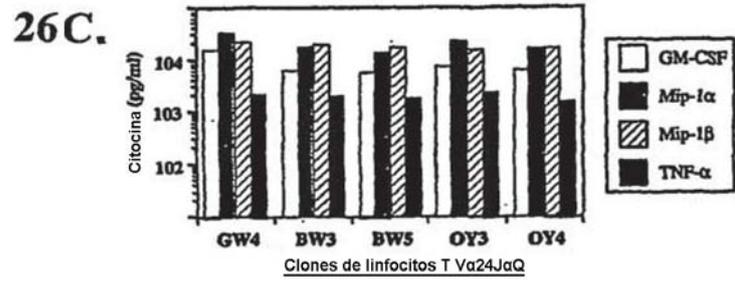
Figura 25B



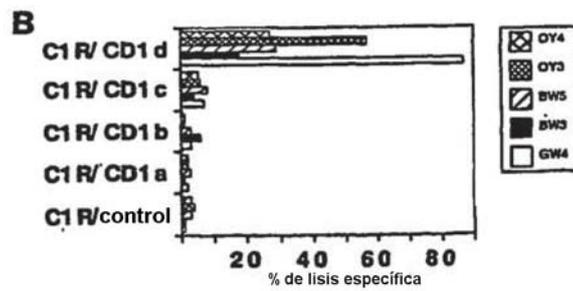
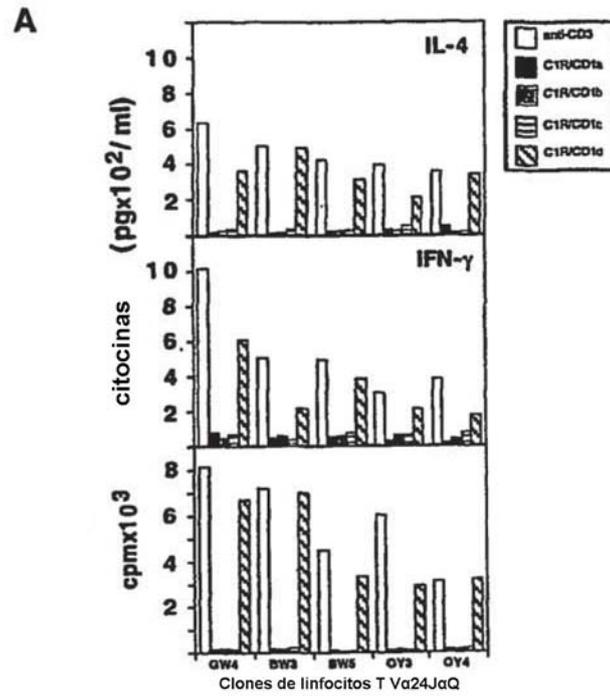
Figuras 26A y 26B



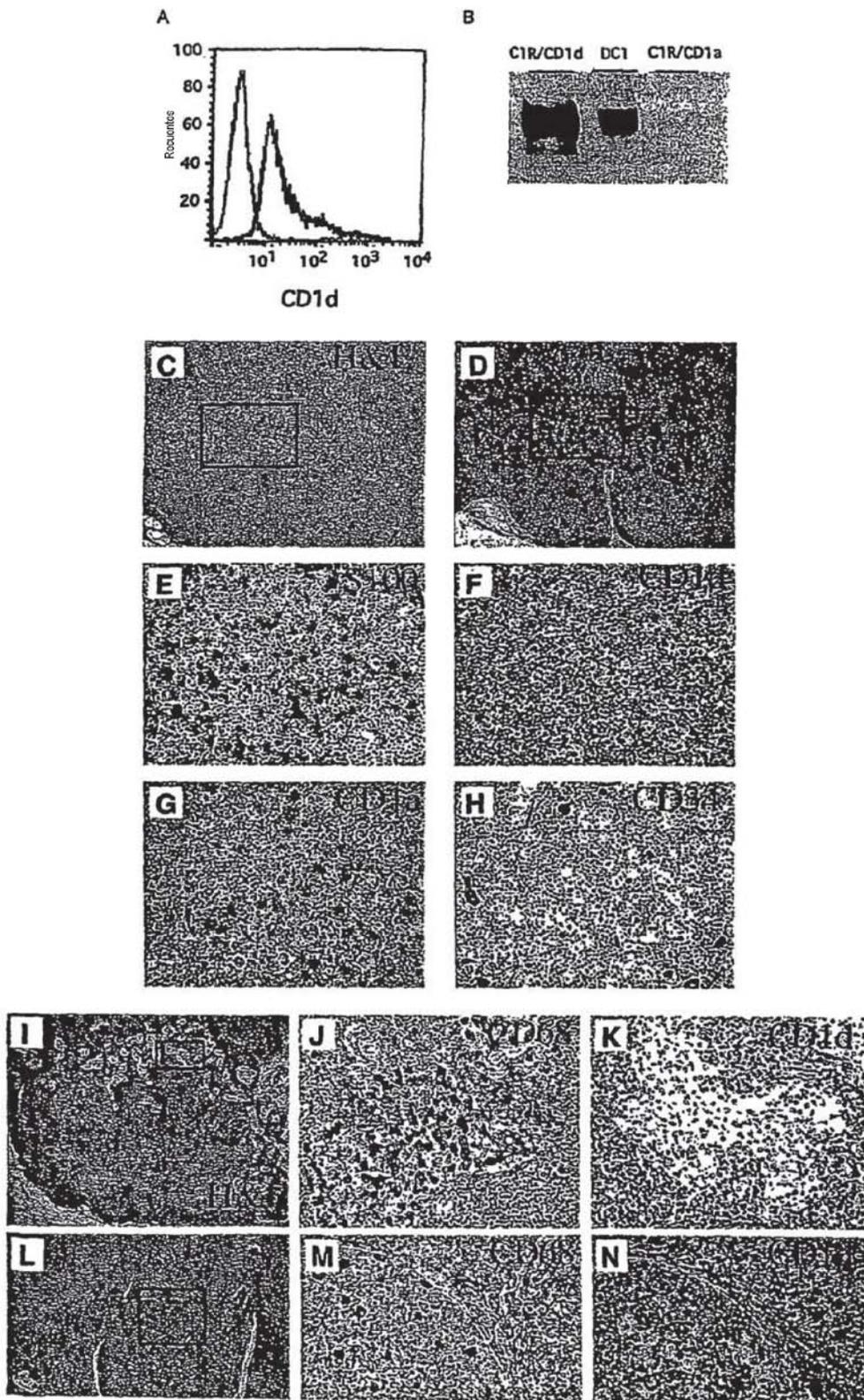
Figuras 26C y 26D



Figuras 27A y 27B



Figuras 28A-28N



Figuras 29A-29E

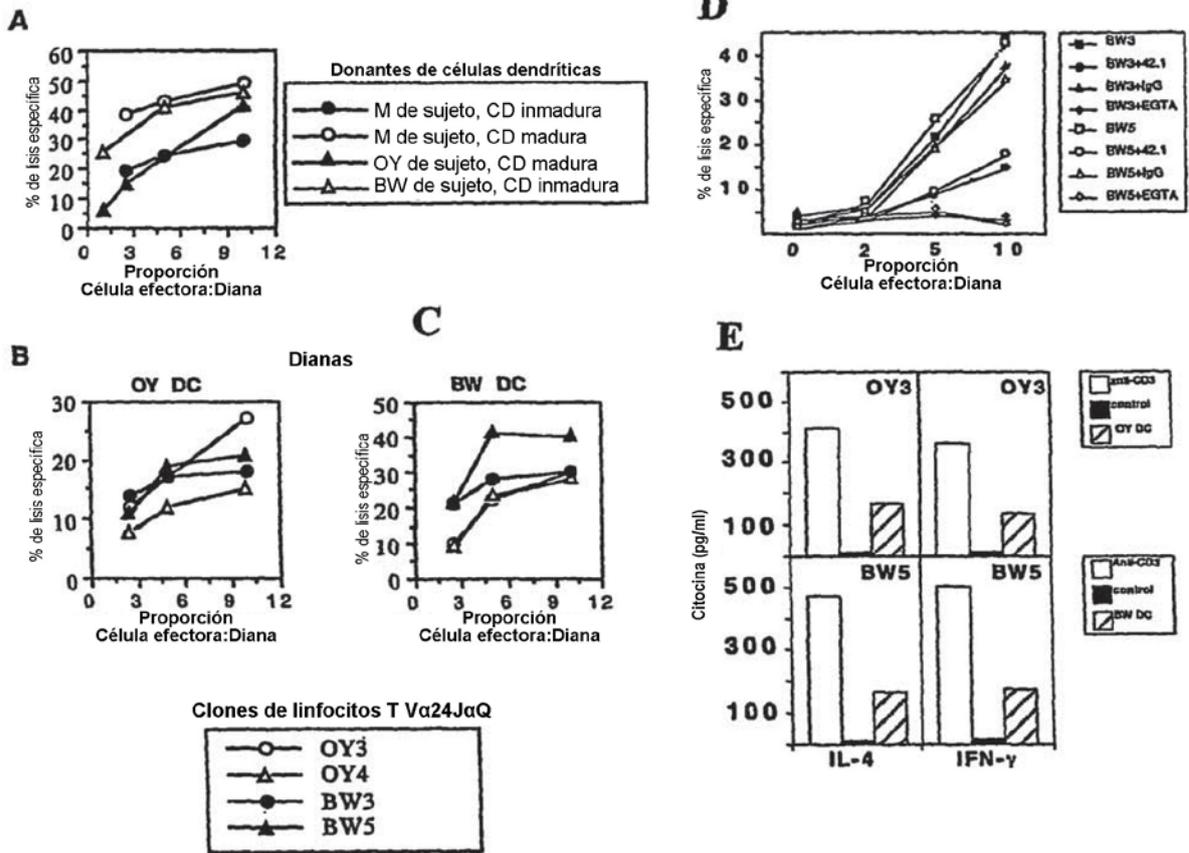


Figura 30

