



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 115 562**

② Número de solicitud: 9602623

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 5/18

C12P 21/08

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **10.12.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.98**

Fecha de concesión: **11.01.99**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.99**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.99

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Alcalá de Henares**

⑱ Inventor/es: **Sanz Merino, Eva María y
Hera Martínez, Antonio de la**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Inmunoclón específico para V-preB humano.**

㉒ Resumen:

Inmunoclón específico para V-preB humano. Hibridoma (Inmun clon B-MAD688, depositado en la ECAACC con el n° de acceso 96052804) de ratón productor de anticuerpos que reconocen V-preB recombinante humano. Estos anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer complejos receptores suplantadores de las inmunoglobulinas en la membrana citoplasmática de progenitores de linfocitos B humanos (ej. células proB y preB). El monoclonal reconoce los precursores más tempranos de células B (ej. que están reorganizando la cadena pesada de inmunoglobulina) y, se puede utilizar para purificar dichos precursores de células B en mezclas complejas de células hematopoyéticas (ej. citometría de flujo).

ES 2 115 562 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Inmunoclón específico para V-preB humano.

Sector de la técnica

Sector farmacéutico. Producto para diagnóstico humano "in vitro", con potencial interés terapéutico.

Estado de la técnica

La producción de anticuerpos utilizando hibridomas productores de anticuerpos monoclonales ("inmunoclonos") es de dominio público, no patentada e ideada por los Premios Nobel de Medicina de 1984 George Kohler y Cesar Milstein.

El interés general en tanto diagnóstico como terapéutico no necesita gran justificación ya que también es de dominio público que constituye un área de negocio para el sector de industria farmacéutica que hoy alcanza cifras de miles de millones de \$US.

Un área de interés principal para las invenciones en este área esta conectado a la identificación de inmunoclonos que permitan la caracterización de nuevas estructuras de interés, o que aún reconociendo estructuras bien definidas sean de interés por la originalidad, de sus propiedades.

Las células B, los linfocitos responsables de la producción de anticuerpos, se generan continuamente durante la vida de las personas por diferenciación de las células madre de la sangre. Un aspecto clave de este complejo proceso es la recombinación de los fragmentos génicos de los loci que codifican las inmunoglobulinas, producto del ensamblaje de dos cadenas polipeptídicas llamadas cadena pesada (H) y cadena ligera (L). Esta invención mereció el Premio Nobel de Medicina del año 1987 para Susumu Tonegawa. El proceso de recombinación, capaz de generar la diversidad de reconocimiento de los anticuerpos, ocurre en células somáticas progenitoras de las células B, llamadas células proB y preB.

La creación del complejo receptor de inmunoglobulinas requiere pues una recombinación somática correcta de los genes que codifican tanto la cadena pesada de IgM (μ H) como de uno de los dos locus de cadena ligera (κ ó λ). Dado que el reordenamiento es erróneo con mucha frecuencia, y los locus de cadena H y L se reordenan asincrónicamente, la probabilidad de que una célula preB cree un receptor de inmunoglobulinas funcional es muy baja. Para hacer eficiente el desarrollo de un linfocito B el organismo precisa utilizar genes suplantadores de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas. En su ausencia el número de linfocitos B generados diariamente es insuficiente para cubrir las necesidades del organismo y el individuo se toma inmunodeficiente [Eva Sanz, Gemina Fernández-Miguel & Antonio de la Hera. Genes Suplantadores y reconocimiento inmunológico. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología*, 10: 48-50 (1995)].

En modelos animales dichos genes suplantadores se expresan selectivamente en células, proB y preB, no requieren recombinación para su expresión correcta, y forman preceptores/suplantadores de los de inmunoglobulinas que seleccionan favorablemente aquellos progenitores B que han recombinado correctamente uno de los locus de inmunoglobulinas. Esta selección, llamada

"positiva" esta mediada por señales transducidas por complejos, receptores de membrana citoplásmica de los que las citadas cadenas suplantadoras son parte esencial. Las cadenas suplantadoras mejor definidas se llaman V-preB y λ 5, homólogas respectivamente al dominio variable y constante de una cadena L, por lo que el complejo de las dos se llama Ψ L [Antonious Rolink y cols. Two pathways of B-lymphocyte development in mouse bone marrow and the roles of surrogate L chain in this development. *Immunol. Rev.* 137: 185-201 (1994)].

En el hombre se ha propuesto que la expresión en la membrana plásmatica de complejos receptores suplantadores del de inmunoglobulina que contienen Ψ L esta restringida a un estadio muy tardío de diferenciación de células pre-B y no ocurre nunca en sus precursores, las células pro-B [Kais Lassotied y cols. Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in the pre-B cell differentiation. *Cell* 73: 73-86 (1993)], poniendo en duda las implicaciones de los modelos antedichos para la salud humana. Hasta hoy, la caracterización de receptores suplantadores en la superficie de células proB humanas no ha sido posible, por la carencia de anticuerpos útiles en análisis bioquímicos [Valerie Guelpa-Fonlupt y cols. Discrete early proB and preB stages in normal human bone marrow as defined by surface Ψ L chain expression. *Eur. J. Immunol.* 24: 257-264 (1994)].

Descripción de la invención

Problema técnico

El objetivo es la identificación de cadenas suplantadoras de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina ó anticuerpos en la superficie celular de los progenitores de linfocitos B. Según nuestro mejor conocimiento, no se han comercializado anticuerpos monoclonales (ni policlonales) en este área del sector farmacéutico, pese a ser de interés diagnóstico para la salud. No se han realizado comunicaciones científicas que demuestren la producción de anticuerpos capaces de identificar receptores suplantadores en la membrana citoplásmica de células proB humanas (ej. antes de la producción de cadena μ H), primer paso en el desarrollo normal y tumoral de células productoras de anticuerpos.

El problema técnico planteado es que los anticuerpos generados anteriormente -en respuestas inmunes a péptidos, complejos suplantadores purificados ó proteínas recombinantes, que contienen secuencias de dichas cadenas suplantadoras- solo han sido útiles para identificar cadenas suplantadoras asociadas a μ H, pero no en los primeros estadios de desarrollo, antes de la recombinación correcta de μ H, en la superficie de células proB. Este problema es de dominio público, que no ha podido ser superado por muchos laboratorios, entre ellos los dos que han publicado resultados que corroboran esta afirmación (referencias en estado de la técnica). Esto ha sido interpretado como apoyo a una hipótesis de discordancia grave en cuanto a la expresión de receptores suplantadores en células proB humanas y proB de ratón, especie para la que se ha propuesto que Ψ L se expresa en la superficie de células proB asociado a un complejo de cadenas suplantadoras de μ H

llamado Ψ H. Esta hipótesis se ha corroborado en un reciente estudio sobre la biosíntesis de estos receptores en células de linaje B humano [Kais Lassoued y cols. Fate of surrogate light chains in B lineage cells. S. Exp. Med. 183: 421-429 (1996)]. En estas circunstancias los modelos animales en este área no serían adecuados para la salud humana. Alternativamente, ambas especies pudieran ser homólogas y los complejos suplantadores de células proB humanas indetectables por una dificultad técnica críptica para crear de inmunoclonos adecuados.

Descripción breve de la invención

Se ha obtenido un inmunoclon de ratón productor de anticuerpos específicos para VpreB humano. El anticuerpo monoclonal secretado por el inmunoclon* es capaz de detectar un complejo suplantador Ψ H Ψ L, similar al descrito en ratón, en la superficie de precursores de células B humanas, incluso en líneas proB que carecen de μ H. El anticuerpo monoclonal identifica complejos de receptores suplantadores de inmunoglobulina en la superficie de líneas celulares tumorales proB y preB humanas, derivadas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

El anticuerpo monoclonal es útil para identificar, purificar y caracterizar celular y molecularmente progenitores hematopoyéticos en estadios muy tempranos de desarrollo a humano normal (ej. analizando médula ósea de individuos sanos). En este sentido, es posible su aplicación en métodos que ofrecen la mejor resolución en la cuantificación de subpoblaciones y el fraccionamiento celular entre las disponibles para el análisis de células individuales presentes en poblaciones celulares que son mezclas complejas o heterogéneas de tipos celulares; como son las poblaciones hemopoyéticas (ej. la inmunofluorescencia y citometría de flujo multiparamétrica).

Descripción detallada de la invención

Para obtener el inmunoclon B-MAD688 se obtuvo la secuencia de DNA del extremo carboxiterminal del gen, dado que la secuencia de DNA publicada se interrumpe 18 bases antes del codon de terminación por la estrategia utilizada por sus autores [Steve Bauer y cols. Structure and pre-B restricted expression of the Vpre-B gene in humans and conservation of its structure in other mammalian species. EMBO J. 7: 111-116 (1988)].

Para poder inmunizar los animales y seleccionar anticuerpos de especificidad bien definida frente a VpreB, humano se crearon una serie de proteínas recombinantes quiméricas o de fusión.

Los dominios de fusión fueron dos distintos: i) el dominio constante de la cadena de inmunoglobulina ligera κ de ratón MC κ , y ii) la región de bisagra y los dominios constantes dos y tres de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG₁, humana h λ 1. Las proteínas usadas fueron un amplio panel que incluía VpreB, otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas como CD2 ó CD4 de diversas especies, así como miembros de otras, familias de proteínas como las interleucinas

IL-2 e IL-13.

Al utilizarse un amplio panel de proteínas de fusión fue posible obtener la cantidad necesaria para la inmunización y la caracterización de los inmunoclonos resultantes de la fusión de las células B activadas *in vivo*, realizadas siguiendo el protocolo de Kohler y Milstein, utilizando técnicas convencionales de ELISA y Western. El uso de dos dominios distintos de fusión y múltiples proteínas distintas permitió identificar el inmunoclon B-MAD688 entre miles de hibridomas, la gran mayoría de los cuales tenía reactividades parecidas a las publicadas previamente.

Para la obtención de las proteínas recombinantes de fusión se subclonó el DNA genómico de VpreB (e independientemente y paralelamente las regiones codificantes de los genes correspondientes al resto de otras proteínas usadas) eliminando el codon de terminación y añadiendo una secuencia "donadora en el procesamiento de mensaje de RNA"/*splice donor site*. La secuencia de los oligonucleótidos necesarios para el clonaje e ingeniería génica de VpreB fue:

(sentido) 5'-AGACTAGAATTCATGTCCTGGCTCCTGTC-3' y,

(antisentido) 5'-TGATACTTACCAGGGACACGTGCCTGGCTGC-3'

Esta construcción genética modificada se integró en la orientación correcta en un vector capaz de dirigir expresión de la proteína de fusión en células de mieloma por contar con los elementos de expresión adecuados y una secuencia "aceptora" para el procesamiento de mensajes de RNA. Se comprobó por secuenciación de ácidos nucleícos la fidelidad de la ejecución de la ingeniería génica.

Tras la transfección del plásmido/vector de expresión se seleccionaron transfectantes que habían integrado el gen y secretaban microgramos de la proteína de interés por mililitro de cultivo celular. Las proteínas de fusión se purificaron a homogeneidad y se comprobó por Western frente a los dominios de fusión la fidelidad al tamaño esperado.

El Inmunoclon B-MAD688 fue subclonado 4 veces y el anticuerpo purificado para su caracterización. El anticuerpo monoclonal purificado reconoce VpreB recombinante y nativo en Western, no reacciona con otras proteínas recombinantes testadas en un amplio panel. Tampoco reconoce proteínas naturales que contienen los dominios de fusión. Reacciona también de forma selectiva y dosis dependiente con VpreB en ELISA.

El Inmunoclon B-MAD688 produce un anticuerpo monoclonal que tiñe selectivamente la superficie celular de tumores de células de linaje B en estadio proB ó preB pero no B. No tiñe células tumorales en un amplio panel que incluye células de linaje T, mieloides, eritrocítico, epitelial o fibroblástico. Para detectar la unión de los anticuerpos se utilizó citometría de flujo cuantitativa.

El Inmunoclon B-MAD688 produce un anticuerpo monoclonal capaz de inmunoprecipitar de la superficie celular de células pro-B y preB un complejo de proteínas de alto peso molecular (predominantemente p100 y p125, junto a otras de

*El inmunoclon/hibridoma productor de el anticuerpo monoclonal relevante a esta patente se llama B-MAD688 y está depositado en la ECACC, con el numero de acceso 96052804.

bajo peso molecular) distintas de la cadena pesada de inmunoglobulinas μ H. Por su aparente homología al complejo descrito en ratón asociado a VpreB en la superficie de células proB, le denominamos Ψ H.

Experimentos comparativos directos, de competición de unión e inmunoprecipitación, con los anticuerpos previamente publicados por Lassoued y cols. -con anticuerpos monoclonales SLC1, 2, y 3 proporcionados por el Dr. Lassoued- indican que los dos grupos de anticuerpos representados por B-NIAD688 y SLC2 indudablemente definen epítomos distintos en complejos receptores diferentes (Ψ H Ψ L ó μ H Ψ L).

El inmunoclon B-MAD688 produce un anticuerpo monoclonal que tiñe una pequeña subpoblación de células en médula ósea humana que tienen un fenotipo CD10⁺CD19⁺CD34⁺ sugerente de un estadio de células proB. La señal dada por el anticuerpo es adecuada para su aplicación en citometría preparativa (ej. FACSTM).

El estudio, en células B-MAD688⁺ individuales purificadas por citometría de flujo, del estado de organización génica de los genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, de la expresión de la maquinaria de recombinación y de VpreB indica que los tipos de complejos suplantadores de inmunoglobulinas y su secuencia de expresión en los distintos estadios de células proB y preB humanos remeda al descrito en ratón.

Estos estudios moleculares en células individuales, purificadas por citometría de flujo conforme a su expresión en la membrana citoplásmica de VpreB y CD34, su tamaño y su estado de reposo o división en el ciclo celular, confirman que el inmunoclon B-MAD688 es útil para identificar, cuantificar y purificar selectivamente los dos estadios más tempranos de progenitores de linfocitos humanos (ej. células proB y, preB grandes, en división y con el locus de cadena ligera sin reor-

ganizar).

Ejemplo de realización de la invención

Obtención de un panel de proteínas de interés (ej. VpreB) por técnicas de ingeniería génica y expresión de proteínas en células animales. Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad específica para el dominio de fusión añadido a la proteína de interés en el paso anterior.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Immunización plantar del antígeno de interés en adjuvante a ratones BALB/C aplicación secuencial de varias dosis de recuerdo del antígeno en solución salina, período de 24 horas tras la última dosis.

Extracción del ganglio de drenaje de la región inmunizada, llamado ganglio poplíteo. Preparación de una suspensión de células individuales y obtención de inmunoclonos por fusión de células somáticas de acuerdo al método de Kohler y Milstein.

Selección de clones adecuados por sus reactividad selectiva con la proteína de interés por ELISA y Western. Identificación de aquellos más adecuados entre los seleccionados anteriormente para métodos de inmunofluorescencia y citometría de flujo utilizando un panel de células tumorales representativa de distintos linajes y estadios de desarrollo y muestras del tejidos hematopoyéticos sanos.

Caracterización bioquímica de las estructuras asociadas a la molécula de interés por inmunoprecipitación de proteínas de superficie celular, localización indicada por su marcaje con biotina en células viables (extremo confirmado por citometría de flujo). Discriminación de otras estructuras conocidas en experimentos secuenciales y paralelos usando anticuerpos monoclonales, caracterizados independientemente como específicos para dichas otras estructuras moleculares conocidas (ej. anti- μ H).

REIVINDICACIONES

1. Inmunoclón específico para V-preB humano, denominado BMAD688, depositado en la ECACC con el n° de referencia 96052804.

2. Procedimiento de obtención del inmunoclón B-MAD688, según reivindicación 1, **caracterizado** porque partiendo de proteína VpreB humana recombinante purificada como inmunógeno se ha obtenido un hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales que tienen una especificidad anti-VpreB humano original.

3. Inmunoclón B-MAD688, según reivindicación 1, porque reconoce VpreB en la superficie

de progenitores de células B humanas, incluyendo células proB, asociado a un complejo de proteínas de alto peso molecular distinto de μ H, y llamado Ψ H, y le hace útil para discriminar complejos receptores suplantadores Ψ H Ψ L de los receptores suplantadores μ H Ψ L.

4. Inmunoclón B-MAD688, según reivindicación 1, **caracterizado** porque detecta la expresión de VpreB en células normales y tumorales humanas, y le hace útil para identificar, cuantificar, purificar y manipular células proB y preB de individuos sanos y con patologías médicas con fines diagnósticos y terapéuticos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 5/18, C12P 21/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BAUER S. et al. "Structure and pre-B lymphocyte restricted expression of the VpreB gene in humans and conservation of its structure in other mammalian species". The EMBO journal. 1988. Vol 7 (1), páginas 111-116	1-4
A	LASSOUED K. et al. "Expression of Surrogate Light Chain Receptors is Restricted to a Late Stage in Pre-B Cell Differentiation". Cell. 1993. Vol. 73, páginas 73-86	1-4
A	GUELPA-FONLUPT V. et al. "Discrete early pro-B and pre-B stages in normal human bone marrow as defined by surface pseudo-light chain expression". Eur. J. Immunol. 1994. Vol. 24, páginas 257-264	1-4
A	SANZ E. et al. "Genes suplantadores y reconocimiento inmunológico". Fronteras de la Ciencia y la tecnología. 1995. Vol. 10, páginas 48-50	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

24.02.98

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1