



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 192 128**

② Número de solicitud: 200100997

⑤ Int. Cl.7: **C12N 5/20**
C07K 16/28
A61K 39/395

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **27.04.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2003**

Fecha de la concesión: **22.11.2004**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.01.2005

⑦ Titular/es: **Universidad de Vigo**
Facultad de Ciencias (Área Inmunología)
c/ Oporto, 1
36200 Vigo, Pontevedra, ES

⑦ Inventor/es: **González Fernández , África;**
Valladares Andrade, Mónica;
Molina Ocaña, Ana;
Gambón Deza, Francisco y
Magadán Momo, Susana

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Anticuerpo monoclonal humano que reconoce específicamente la molécula humana CD69, y su uso en terapia.**

⑤ Resumen:

Anticuerpo monoclonal humano que reconoce específicamente la molécula humana CD69, y su uso en terapia.
Anticuerpo monoclonal humano hAIM-29 que reconoce la molécula humana CD69, y su uso en terapia humana.
Un nuevo hibridoma, designado H69, productor de un anticuerpo monoclonal humano hAIM- 29 (de isotipo IgM / lambda). El anticuerpo reconoce de forma específica a la molécula humana CD69, que es un antígeno de activación muy temprano linfocitario. El hibridoma H69 se generó por fusión de células del mieloma murino NSO con células de bazo de un ratón transgénico portador de secuencias de inmunoglobulinas humanas que había sido inmunizado con una suspensión de células de rata transfectadas con la molécula humana CD69. El clon fue seleccionado por su patrón de reconocimiento celular por inmunofluorescencia indirecta frente a las células de rata transfectadas y frente a linfocitos activados humanos. La presente invención podría utilizarse para tratamiento de patologías humanas que conlleve gran activación linfocitaria (enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide u otras patologías de tipo inflamatorio).

ES 2 192 128 B1

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

DESCRIPCION

Anticuerpo monoclonal humano que reconoce específicamente la molécula humana CD69, y su uso en terapia.

Anticuerpo monoclonal humano hAIM-29 que reconoce la molécula humana CD69, y su uso en terapia humana.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal *humano* denominado hAIM-29 producido por el hibridoma murino H69. El anticuerpo es del isotipo inmunoglobulina M(IgM) con cadenas pesadas μ , y con cadenas ligeras λ , que reconoce específicamente a la molécula humana CD69 que es una proteína que aparece muy tempranamente en los linfocitos activados.

Sector de la técnica

Esta invención hace referencia a una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal específico. El sector de la técnica al que se refiere la invención se incluye dentro del ámbito sanitario. La utilización de este anticuerpo monoclonal en terapia humana, puede suponer una considerable ventaja dada la ausencia de terapias efectivas en muchas enfermedades autoinmunes y otras patologías donde exista mucha activación linfocitaria y puede minimizar al máximo el riesgo de ser rechazada inmunológicamente por el paciente como ocurre en la actualidad con la terapia con anticuerpos murinos.

Antecedentes y ejemplos de realización de la invención

Los Dres. Köhler y Milstein describieron en 1975 el modo de utilizar la tecnología de fusionar células para obtener líneas celulares híbridas (denominados hibridomas) que pudieran crecer de forma indefinida en cultivos, secretando anticuerpos monoclonales (Nature 256: 495-497 (1975)). Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos homogéneos e idénticos entre sí que tienen la propiedad de unirse a un único determinante antigénico.

Los anticuerpos monoclonales tienen significativas ventajas sobre los antiseros convencionales con respecto a su especificidad y producción, y sobre todo cuando estos anticuerpos van dirigidos frente a antígenos de la superficie celular.

Desde 1975 se han realizado numerosos esfuerzos por generar hibridomas que produjeran anticuerpos que pudieran ser útiles en terapia humana. Sin embargo, la obtención y aplicación de anticuerpos monoclonales humanos para este propósito ha encontrado numerosos obstáculos. Las técnicas convencionales de fusión celular/inmunización no podían ser aplicadas con éxito en células humanas y se han intentado utilizar estrategias alternativas para producir anticuerpos humanos que pudieran ser útiles para terapia y que a su vez reconocieran un determinado antígeno con alta afinidad. Mientras se resolvían estos problemas, están siendo utilizados en terapia anticuerpos generados en ratones o ratas (evitar rechazo de trasplante de corazón, en terapia antitumoral, etc.), pero las respuestas inmunes dirigidas contra los anticuerpos murinos en estos pacientes, inutilizan o disminuyen considerablemente la eficacia de los anticuerpos monoclonales administrados.

Para paliar este rechazo a los anticuerpos mu-

rinis, numerosos laboratorios están modificando sus secuencias, haciéndolos quiméricos o humanizándolos, mediante técnicas de biología molecular. Sin embargo, se añaden numerosos problemas a este tipo de anticuerpos, la ausencia de glicosilación en bacterias, la posible contaminación con productos bacterianos al introducirlos en terapia humana, etc.

Nuestro grupo ha pretendido obtener anticuerpos monoclonales humanos utilizando para ello ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulinas humanas. En concreto, hemos utilizado la línea de ratón BAB5 producida por la Dra. Marianne Brüggeman que porta IgM humana/kappa/lambda humana y carece de los correspondientes genes para la cadena pesada y cadena ligera kappa murinos, aunque sí presentan la cadena ligera lambda murina. Estos ratones producen inmunoglobulina IgM humana y tras ser inmunizados con antígenos humanos son capaces de responder generando anticuerpos humanos (Magadán, S. et al. Biotecniques, en prensa en septiembre 2002).

Decidimos obtener, utilizando estos ratones transgénicos, anticuerpos monoclonales humanos IgM dirigidos específicamente frente a la molécula humana CD69. La molécula CD69 es considerada la glicoproteína de activación más precoz que aparece en la superficie de células leucocitarias, tras ser sometidas a activación. Tras la estimulación celular, por ejemplo con un éster de forbol como el phorbol myristate acetate ó PMA, la molécula CD69 se expresa en linfocitos, células natural killer (NK) y en neutrófilos (Cebrián et al., J. Exp. Med. 168:1621. 1988; Hartnell et al., Immunology 80:281.1993), mientras que no lo hace en células no activadas. La molécula CD69 se expresa como un homodímero unido por enlaces disulfuro (López-Cabrera et al., J. Exp. Med. 178:537.1993), pero su ligando se desconoce. Sin embargo, se sabe que CD69 es capaz de inducir señales al interior celular, tales como incremento de calcio intracelular, secreción de citoquinas y participación en la proliferación celular (De María et al., J. Exp. Med. 180:1999.1994).

Dentro de la patología humana, la expresión de la molécula CD69 en la superficie de los linfocitos T se ha relacionado con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la hepatitis vírica crónica, el lupus eritematoso sistémico o la diabetes insulina dependiente. Asimismo, la expresión de CD69 se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad y con el comportamiento clínico tanto en pacientes con artritis reumatoide, como en pacientes con linfomas B no-Hodgkin (Erlanson et al., Eur. J. Haematol. 60:125. 1998). De esta forma, agentes dirigidos frente a la molécula CD69 podrían ser de gran interés terapéutico en enfermedades donde existe gran activación leucocitaria o una alta expresión de este marcador de activación. Sin embargo, aunque desde hace años existen anticuerpos de ratón dirigidos frente a la molécula CD69 humana, como el TP1/55 del Dr. Sánchez Madrid, y éstos son relativamente fáciles de producir, hay numerosas restricciones para poder utilizar esos anticuerpos de ratón en terapia humana. Los anticuerpos de ratón pueden originar una res-

puesta inmune en aquellos pacientes que los reciben, con la producción de anticuerpos humanos anticuerpos de ratón ó HAMA (del inglés, human anti-mouse antibodies), llevando a la inutilidad del tratamiento. Estas limitaciones podrían superarse utilizando anticuerpos totalmente humanos que permitieran su administración repetida, sin los problemas de inmunogenecidad o de respuestas alérgicas (Brüggemann, M. and M. J. Taussig. 1997. *Curr. Op. Biotechnol.* 8:455). Estos anticuerpos pueden obtenerse con las técnicas convencionales de fusión/clonación, pero utilizando ratones modificados genéticamente portadores de genes de inmunoglobulinas humanas, como los utilizados por nuestro grupo. Estos ratones fueron inmunizados con células de rata (RBL) transfectadas con una molécula quimérica humana, que presenta la porción extracelular de la molécula CD69 y la porción intracelular del CD23 también humano (Sancho et al., *J. Immunol.* 165:3868. 2000). La razón de inmunizar con células transfectadas de forma estable con la molécula CD69 es debida a que la estructura molecular del CD69 humano sobre la membrana de las células transfectadas se asemeja y simula muy bien a la molécula de activación CD69 presente en las células activadas (Sancho, D. et al 2000. *Functional analysis of figand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors. J. Immunol.* 165:3868.). Además, ambas moléculas, la quimérica CD69/CD23 en las células transfectadas y la molécula nativa CD69 sobre células activadas, son ambas reconocidas de forma indistinguible por anticuerpos murinos específicos frente a la molécula CD69 como el TP1/55, lo que permite incluir un control en todos los experimentos. Asimismo, el poder utilizar células transfectadas y sin transfectar, permite diferenciar, al realizar el análisis de la especificidad de los anticuerpos, aquellos anticuerpos que reconocen a las células transfectadas exclusivamente, de aquellos otros que reconocen tanto a las células transfectadas (CD69+), como a las sin transfectar (CD69-).

Los ratones, tras ser sometidos a varias inmunizaciones, se sacrificaron y sus células esplénicas se fusionaron con una línea de mieloma tumoral para finalmente obtener un hibridoma secretor de un anticuerpo específico, el hAIM-29, frente a la molécula humana CD69. El hibridoma fue depositado en la ECACC con el número de acceso definitivo de 01041805.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

La gráfica muestra el reconocimiento celular del anticuerpo hAIM-29 en las células RBL transfectadas con CD69 humano, células RBL no transfectadas, linfocitos de sangre periférica y células Jurkat sin activar o tras activación con PMA, comparándolo con el reconocimiento del anticuerpo murino anti-CD69 (del hibridoma TP1/55 del Dr. Sánchez Madrid).

Figura 2

A) Dobles marcajes de células RBL transfectadas con CD69 humano enfrentando nuestro anticuerpo hAIM-29, un anticuerpo comercial murino anti-CD69 o el anticuerpo murino anti-CD69 del hibridoma TP1/55 del Dr. Sánchez Madrid.

Se observa una distribución de las células de acuerdo a su expresión del marcador CD69 con un patrón lineal, confirmando que los tres anticuerpos reconocen la misma molécula.

B) Confirmación del reconocimiento de la molécula CD69 por Western blot. Se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo murino anti-CD69 (del hibridoma TP1/55 del Dr. Sánchez Madrid) unido a bolas de sepharosa, de usados de células RBL transfectadas con CD69 humano. Se realizó electroforesis en acrilamida y transferencia a membrana, con posterior incubación de la membrana con nuestro anticuerpo hAIM29, y posteriormente un anticuerpo anti-IgM humana marcado con fosfatasa alcalina y BCIP como cromógeno. Se observa que nuestro anticuerpo reconoce una única banda correspondiente a la molécula transfectada de CD69.

Explicación de la invención

La presente invención corresponde a un nuevo anticuerpo monoclonal humano denominado hAIM-29 y/o a un fragmento reactivo del mismo (ver aclaración posterior), que se une o reacciona con la molécula humana CD69. El anticuerpo reconoce no sólo a células de rata transfectadas con la molécula humana CD69, sino a linfocitos activados con éster de forbol, de forma semejante a como lo hace el anticuerpo murino anti-CD69 del Dr. Sánchez Madrid o a como lo hace un anticuerpo comercial.

Este anticuerpo reconoce la molécula CD69 tanto en técnicas de inmunofluorescencia indirecta (ver figura 1), como en Western blot e inmunoprecipitación (ver Figura 2).

Como es bien sabido en este campo de investigación, un "fragmento reactivo" hace referencia tanto a la molécula de anticuerpo entera (IgM), como a sus partes de reconocimiento antigénico que incluyen el fragmento Fab, (Fab')₂ o fragmentos Fv.

La presente invención proporciona además una nueva línea de hibridoma designada H69 que fue generada por fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo de un ratón transgénico BAB5 que fue inmunizado con una preparación de células de rata transfectadas con la molécula humana CD69. Los hibridomas obtenidos fueron testados por su capacidad de secreción de anticuerpos humanos IgM específicos para la molécula CD69. El hibridoma fue clonado y se caracterizó el anticuerpo que secreta por distintos métodos. Asimismo, la línea de hibridoma se mantiene en cultivo obteniéndose el anticuerpo hAIM-29 del sobrenadante. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal hAIM-29 o un fragmento reactivo de dicho anticuerpo, puede ser generado inyectando la línea de hibridoma H69 en un animal apropiado, recogiendo el anticuerpo o el fragmento reactivo de la ascitis maligna o del suero del animal inyectado.

La célula secretora de este anticuerpo (el hibridoma H69) presenta los genes reagrupados de las cadenas pesada μ y de la cadena ligera λ humanas. El hibridoma ha sido obtenido por fusión entre una célula de la línea de mieloma murino NSO (no secretora de inmunoglobulinas y deficiente en el enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT⁻)) y un linfocito

B del bazo de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulinas humanas inmunizado con células de rata transfectadas con la molécula humana CD69.

Los ratones transgénicos utilizados para la generación del hibridoma proceden del Instituto Babraham de Cambridge. Fueron generados por el cruce entre ratones portadores de genes humanos de la cadena pesada μ y de las cadenas ligeras κ y λ con ratones carentes de los genes endógenos de la cadena pesada μ , y de la cadena ligera κ . Los ratones fueron utilizados como parte del proyecto conjunto europeo BIO4-CT97-2284 del programa "Biotechnology" donde participan un total de 6 laboratorios, uno de los cuales corresponden al anteriormente mencionado Instituto Babraham. El suero de todos los ratones fue testado por ELISA para confirmar la secreción de anticuerpos IgM humanos.

Los ratones transgénicos resultantes del cruce fueron inmunizados con células de rata RBL-2H3 transfectadas con la molécula quimérica que contiene la porción extracelular de la molécula humana CD69 con un peso molecular de 40 kDa y los linfocitos B del bazo del ratón inmunizado fueron fusionados con células de mieloma murino NSO. El hibridoma fue seleccionado por secretar inmunoglobulina humana del isotipo IgM mediante ELISA y por su capacidad de reconocimiento de las células inmunizantes RBL transfectadas con CD69 humano por inmunofluorescencia indirecta en un citómetro de flujo. El anticuerpo no reconoce a las células de rata RBL sin transfectar, ni tampoco a los linfocitos T ni a las células Jurkat sin activar (dado que no expresan el marcador CD69). Sin embargo, el anticuerpo es capaz de reconocer la molécula CD69 en linfocitos de sangre periférica y en células T Jurkat activados por el éster de forbol PMA (ver Figura 1), y su patrón de reconocimiento es comparable a la de otros dos anticuerpos control que reconocen la molécula CD69 (ver Figura 2).

Para la obtención del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal humano H69 se procedió a su clonación realizando repetidas diluciones límite hasta asegurar la monoclonalidad del hibridoma. El hibridoma seleccionado secreta 2-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo monoclonal H69 en cultivos celulares convencionales, y es posible la producción de líquido ascítico en ratones SCID.

El patrón de reconocimiento del anticuerpo

monoclonal humano H69 se determinó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta utilizando células de rata RBL transfectadas para la molécula humana CD69 y con las mismas células sin transfectar, así como suspensiones celulares de linfocitos de sangre periférica y células T Jurkat, ambos activados o no con éster de forbol.

El antígeno reconocido por el anticuerpo es la molécula humana CD69. El peso molecular de la molécula reconocida por el anticuerpo, determinado por Western blot en las células transfectadas, es de 40 kDa, que corresponde al peso molecular esperado de la proteína CD69 transfectada (proteína quimérica CD69/CD23) en las células de rata RBL y que sólo presenta la porción extracelular de la molécula CD69. Asimismo, se confirmó que el anticuerpo reconoce la molécula CD69 mediante comparación del Western blot con un anticuerpo murino anti-CD69 y también mediante inmunoprecipitación. La banda inmunoprecipitada con el anticuerpo murino del Dr. Sanchez Madrid es reconocida por nuestro anticuerpo humano hAIM-29, confirmando que reconocen la misma molécula (Figura 2).

Ventajas del producto. posibles aplicaciones

El producto de la invención es un anticuerpo monoclonal humano hAIM-29 que reconoce de forma específica a la molécula CD69 humana, que corresponde a una molécula de activación muy temprana de los linfocitos.

El anticuerpo podría ser utilizado en terapia humana en aquellas patologías donde el paciente presente una exagerada activación linfocitaria que le conlleve a un daño orgánico, como en casos de enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias graves.

Este anticuerpo podría ser utilizado en terapia complementaria/opcional a las existentes actualmente en el caso de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, ofreciendo a los pacientes una alternativa terapéutica. El hecho de que este anticuerpo sea humano en toda su composición proteica, tanto sus cadenas pesadas como ligeras, le hace ser de elección en aquellas terapias en las que se están utilizando anticuerpos murinos y donde una respuesta inmunitaria de los pacientes que las reciben inutilizan el tratamiento. Este anticuerpo, al ser humano en su totalidad, no sería rechazado por los pacientes que lo recibieran, lo que permitiría la efectividad de la terapia.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal humano hAIM-29, que reconoce de forma específica a la molécula humana CD69.

2. Anticuerpo monoclonal humano hAIM-29, según la reivindicación 1, de isotipo inmunoglobulina M (IgM) con cadenas pesadas humanas μ y con cadenas ligeras humanas λ , que se **caracteriza** por reconocer de forma específica a la molécula humana CD69.

3. Anticuerpo monoclonal humano hAIM-29, según la reivindicación 1, que es producido por el hibridoma denominado H69.

4. El Hibridoma H69, productor del anti-

cuerpo monoclonal humano hAIM-29 según la reivindicación 3, procede de la fusión de linfocitos B de bazo de ratones transgénicos BAB5 (portadores de genes humanos para cadena pesada μ y ligeras κ y λ , y carentes de los genes murinos de cadenas pesadas y ligera κ), con células de mieloma murino NSO.

5. Anticuerpo monoclonal hAIM-29, según la reivindicación 1, para el tratamiento de procesos inflamatorios donde se requiera la eliminación de células linfocitarias activadas (v.g. enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide).

6. Uso del anticuerpo hAIM-29 de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para utilización en terapia humana.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 192 128

② Nº de solicitud: 200100997

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 5/20, C07K 16/28, A61K 39/395

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9633735 A1 (CELL GENESYS, INC) 31.10.1996, páginas 2,3,14,17,18; reivindicaciones 1,3,20.	1-6
Y	WO 9945962 A1 (GENPHARM INTERNATIONAL, INC) 16.09.1999, páginas 6-15; reivindicaciones 1,8.	1-6
Y	SANCHO D. et al. Functional Analysis of Ligand-Binding and Signal Transduction Domains of CD69 and CD23 C-Type Lectin Leukocyte Receptors. J. Immunol., Octubre 2000, Vol. 165, Nº 7, páginas 3868-3875.	1-6

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 nº:

Fecha de realización del informe

19.08.2003

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1