



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 192 426**

② Número de solicitud: 200001194

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 5/20

C12P 21/08

C07K 16/28

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.05.2000**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2003**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.2003

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE VIGO**
(Área Inmunología)
C/ Oporto, 1
36200 Vigo, Pontevedra, ES

⑦ Inventor/es: **González Fernández, África;**
Magadán Mompo, Susana;
Molina Ocaña, Ana;
Gambón Deza, Francisco;
Valladares Andrade, Mónica;
Bruggemann, Marianne y
Neuberger, Michael

⑦ Agente: **No consta**

④ Título: **Anticuerpo monoclonal humano SM50/20 que reconoce leucocitos humanos, y su uso en terapia.**

⑤ Resumen:

Anticuerpo monoclonal humano SM50/20 que reconoce leucocitos humanos, y su uso en terapia.

La presente invención corresponde a Hibridoma productor de un cuerpo monoclonal humano SM50/20 (isotipo IgM/kappa) con cadenas pesadas y ligeras humanas. El anticuerpo reconoce un antígeno específico (peso molecular 150-180 Kd.) presente en linfocitos T y linfocitos B, monocitos, granulocitos, líneas tumorales humanas tipo B y T, leucemias humanas linfoides crónicas, y algunas mieloides.

El hibridoma se obtuvo de linfocitos B de ratones inmunizados con leucocitos humanos fusionados con células de mieloma murino SP2/0, posterior clonación y seleccionado en base a su secreción de anticuerpos por ELISA y a su patrón de reconocimiento celular por inmunofluorescencia indirecta. Los ratones inmunizados son transgénicos, portadores de genes de inmunoglobulinas humanas (μ y κ) y carecen de los genes murinos de cadenas pesadas y ligera kappa. La presente invención podría utilizarse para detección y/o tratamiento de patología linfóide humana (leucemia linfóide crónica, linfomas y otras patologías del sistema hematológico).

ES 2 192 426 A1

DESCRIPCION

Anticuerpo monoclonal humano SM50/20 que reconoce leucocitos humanos, y su uso en terapia.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano, denominado SM50/20 que reconoce específicamente un antígeno presente en leucocitos humanos y en algunas líneas tumorales leucocitarias humanas de tipo B y T. El anticuerpo también reconoce células de sangre periférica y de médula ósea procedentes de pacientes con leucemias linfoides crónicas tipo B (ver tabla 1). El anticuerpo monoclonal humano SM50/20 es producido por un hibridoma murino y presenta el isotipo de una inmunoglobulina M humana (IgM), con cadenas pesadas humanas μ y con cadenas ligeras humanas κ .

Sector de la técnica

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 leucemias y puede minimizar al máximo el riesgo de ser rechazada inmunológicamente por el paciente, como ocurre actualmente en muchos casos, con la terapia antitumoral que utiliza anticuerpos murinos.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales representan en la actualidad una terapia efectiva en gran número de patologías, como en diversos tipos de tumores (cáncer de mama, leucemias, etc.), para evitar rechazo de trasplantes, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, etc.. Sin embargo, la mayor parte de los anticuerpos monoclonales existentes son de ratón o de rata, lo que lleva en muchos casos a rechazos inmunológicos por parte de los pacientes que reciben esa terapia, y por tanto a la inutilidad terapéutica. En los últimos años se han intentado modificar estos anticuerpos murinos mediante técnicas de biología molecular, para asemejarlos lo más posible a los anticuerpos humanos, disminuyendo así los riesgos del potencial rechazo del paciente frente a estas proteínas extrañas al organismo. Surgen así los anticuerpos quiméricos y humanizados, que son los que mayoritariamente están ahora utilizándose en clínica.

El problema se resolvería si fuera posible obtener anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Sin embargo, la obtención y aplicación de anticuerpos monoclonales humanos en terapia humana han encontrado numerosos obstáculos. Las técnicas convencionales de obtención de anticuerpos monoclonales mediante la técnica de Cesar Milstein y George Köhler (técnica que no es patentada y es de dominio público), no ha podido ser aplicada con éxito en humanos y se hace necesario buscar estrategias alternativas para producir anticuerpos humanos que puedan ser útiles en terapia humana y que a su vez reconozcan un determinado antígeno humano con alta afinidad.

En los últimos años se han desarrollado ratones transgénicos portadores de genes de IgM humana/kappa humana y carentes de los correspondientes genes para cadena pesada y cadena ligera kappa murinos, aunque sí presentan la cadena ligera lambda murina. Estos ratones pueden ser

inmunizados con antígenos humanos, y responden de forma específica frente a estos antígenos con anticuerpos humanos de tipo IgM. Utilizando la técnica convencional de obtención de anticuerpos monoclonales antes comentada de Milstein y Köhler, es posible obtener de estos ratones, hibridomas productores de anticuerpos humanos dirigidos frente a antígenos específicos también humanos. En la presente invención se presenta un hibridoma obtenido con estos ratones que es capaz de secretar un anticuerpo monoclonal humano IgM que reconoce de forma específica leucocitos humanos, tanto normales como tumorales, y que presenta características estructurales y funcionales indistinguibles de un anticuerpo humano. Este anticuerpo puede ser de mucha importancia terapéutica en patologías de tipo leucemias, linfomas, mielomas u otras, dada la ausencia de terapias efectivas en muchas de estas patologías.

Explicación de la invención

El objetivo es la obtención de un anticuerpo monoclonal humano frente a leucocitos humanos. El problema con la mayor parte de los anticuerpos monoclonales utilizados en terapia humana existentes actualmente es que son de ratón o de rata, o modificados genéticamente en parte pero no totalmente. Esto lleva a que los pacientes que reciben estos anticuerpos como tratamiento para diversas patologías (tumores, enfermedades autoinmunes, infartos, evitar rechazo de trasplantes, etc...) generan una respuesta inmunitaria frente a esas proteínas extrañas, llevando a la inutilidad del tratamiento. Se hace así necesario desarrollar anticuerpos monoclonales totalmente humanos que no sean rechazados al ser utilizados en terapéutica.

Algunas de las patologías tumorales que se están beneficiando de estos anticuerpos monoclonales son sobre todo leucemias y linfomas, lo que nos llevó a trabajar en este campo para obtener un anticuerpo monoclonal humano que pudiera reconocer células humanas de sangre periférica

Descripción breve de la invención

Se ha obtenido un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal humano. El anticuerpo monoclonal humano SM50/20 secretado por el hibridoma es una Inmunoglobulina M humana, con cadenas pesadas μ y cadenas κ , ambas humanas. El anticuerpo monoclonal humano SM50/20 identifica un antígeno de membrana en la superficie de leucocitos normales, líneas celulares tumorales T y B, células tumorales derivadas de pacientes con leucemias linfoides crónicas, y de algunas leucemias mieloides crónicas. El hibridoma ha sido depositado en la ECACC con el número de acceso 01111618.

Su patrón de reconocimiento de alta intensidad sobre células tumorales, indica que este anticuerpo podría ser útil en la eliminación tanto *in vitro* (eliminación de células tumorales previo a trasplantes de médula ósea) como *in vivo*, de células tumorales leucémicas.

Descripción detallada de la invención

Los ratones transgénicos utilizados para la generación del hibridoma proceden del Instituto Braham y del Medical Research Council de Cambridge, Inglaterra. Los ratones fueron utilizados como parte del proyecto conjunto europeo

BIO4-CT97-2284 del programa "Biotechnology". Los ratones fueron originalmente generados tras el cruce entre ratones transgénicos portadores de genes humanos de la cadena pesada μ y de la cadena ligera κ , con ratones knockout para los correspondientes genes endógenos de la cadena pesada μ y de la cadena ligera κ . De esta manera, los ratones transgénicos utilizados sólo producen IgM humana con cadenas ligeras kappa o lambda también humanas.

Los ratones transgénicos fueron inmunizados con 10-20 millones de leucocitos humanos obtenidos de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. Los leucocitos humanos fueron inyectados intraperitonealmente en los ratones, en presencia de adyuvante completo (primera inmunización) o incompleto (segunda inmunización) de Freund. Entre la primera y la segunda inmunización transcurrió entre 15 días-2 meses. Una tercera inmunización se realizó vía intravenosa con leucocitos humanos sin adyuvante, entre 18-20 días después de la segunda inmunización. El suero de todos los ratones previo a su inmunización y tras inmunización específica fue testado por ELISA para delimitar su secreción de anticuerpos IgM humanos. Tres días después de la última inmunización se extrajo el bazo en condiciones estériles y se realizó una suspensión celular. Las células del bazo se fusionaron con células del mieloma murino SP2/0, utilizando la técnica convencional de obtención de anticuerpos monoclonales que les valió el premio Nobel a los Dres Köhler y Milstein. Este mieloma murino SP2/0 no secreta inmunoglobulinas endógenas y es deficitario en el enzima hipoxantina fosforribosil transferasa. La fusión se realizó en presencia del agente fusionante Polietilenglicol. Las células fusionadas que corresponden a las células híbridas o hibridomas se mantuvieron en medio selectivo HAT. El sobrenadante de los cultivos se testó mediante ELISA y citometría de flujo, y se seleccionó un hibridoma secretor de un anticuerpo humano IgM (isotipo IgM/ κ) por su capacidad de reconocer leucocitos humanos y líneas celulares tumorales humanas (ver Tabla 1). Se procedió a la clonación del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal humano SM50/20 mediante la técnica de dilución límite utilizando placas de 96 pocillos. Este paso se realizó 2 veces hasta asegurar la monoclonalidad del hibridoma.

La célula secretora de este anticuerpo, un hibridoma de ratón, presenta los genes reagrupados de la cadena pesada μ y de la cadena ligera kappa humanas. Para conocer las secuencias de estos genes reagrupados, se procedió a aislar RNA total del hibridoma seguido de la obtención de cDNA utilizando cebadores específicos para la región constante, tanto de la cadena pesada como ligera. Posteriormente se realizaron diversas amplificaciones por la técnica de PCR utilizando cebadores específicos para cada una de las familias de genes V y genes J presentes en el transgen del hibridoma, tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y cuantificados en gels de agarosa y se procedió a su secuenciación, utilizando un secuenciador automático de DNA. Cada gen fue secuenciado más de dos veces y en ambas direcciones, con cebadores específicos para

la región V y para la región J. La secuencia de la región V (genes reagrupados humanos $V_H D_H J_H$) de la cadena pesada μ humana corresponde a las secuencias 1 (en DNA) y 2 (en proteína) y las secuencias de la región V (genes reagrupados humanos $V_k J_k$) de la cadena ligera kappa humana corresponde a las secuencias 3 (en DNA) y 4 (en proteína) (ver hoja adjunta elaborada en el programa PatenIn).

Tras la comparación de estas secuencias con las bases de datos existentes de genes (Genbank), no se ha encontrado identidad al 100% con ninguna de las secuencias allí existentes, aunque una gran homología con genes humanos de la cadena pesada μ y la cadena ligera kappa. El gen de la cadena pesada pertenece a la familia de genes humanos del $V_H 1$ y el segmento J de la cadena pesada corresponde al $J_H 4$. En el caso del gen de la cadena ligera kappa, éste pertenece a la familia de genes del $V_k 1$ y su segmento J corresponde a la familia del $J_k 2$.

El anticuerpo monoclonal humano SM50/20 reconoce de forma específica un antígeno presente en la membrana celular de los leucocitos humanos. El patrón de reconocimiento del anticuerpo monoclonal humano SM50/20 se determinó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y análisis en un citómetro de flujo, utilizando suspensiones celulares de células mononucleares de sangre periférica, plaquetas, diferentes líneas celulares humanas, muestras de médula ósea y con células de sangre periférica de pacientes diagnosticados de distintos tipos de leucemia (linfoide y mieloide crónicas). El resultado de estos análisis se muestra en la Tabla 1, mostrando la intensidad de reconocimiento del anticuerpo con cruces (máxima intensidad está representada con +++), y las células que no son reconocidas por el anticuerpo se expresan con un signo negativo (-).

En la Tabla 1 se observa que el anticuerpo monoclonal humano SM50/20 tiñe selectivamente y de forma específica a leucocitos humanos de sangre periférica de donantes voluntarios sanos, incluyendo a linfocitos T y B, monocitos y granulocitos. El anticuerpo, sin embargo, no reconoce a plaquetas humanas. Cuando se estudia el reconocimiento del anticuerpo sobre distintas líneas celulares tumorales humanas, se observa que el anticuerpo SM50/20 sólo reconoce a la línea tumoral T JURKAT y a la línea tumoral B HMY. Sin embargo, el anticuerpo no reconoce a las líneas celulares humanas U937 (mielomonocítica), K562 (eritroleucemia) o YT-INDI (semejante a NK, NK like). Tampoco reconoce a una línea celular de rata RBL (células leucémicas basófilas).

Cuando el anticuerpo se testa sobre células obtenidas de pacientes que sufren de algún tipo de leucemia se observa que el anticuerpo monoclonal humano SM50/20 es capaz de reconocer a todas las leucemias linfoides crónicas testadas, tanto en células obtenidas de sangre periférica como de médula ósea. La intensidad de reconocimiento de estas leucemias fue alta/máxima en todos los casos.

Con respecto a las leucemias mieloides crónicas, el anticuerpo reconoce sólo a algunas de ellas, tanto en células de sangre periférica como las procedentes de médula ósea. En otros ca-

REIVINDICACIONES

1. Hibridoma de ratón **caracterizado** por ser productor de un anticuerpo monoclonal humano, denominado SM50/20. Este anticuerpo es una Inmunoglobulina M humana con cadenas pesadas humanas μ y con cadenas ligeras humanas κ .

2. El anticuerpo monoclonal humano SM50/20 producido por el hibridoma según la reivindicación 1, reconoce un antígeno específico (peso molecular entre 150-180 Kd) presente en la membrana de leucocitos humanos normales (linfocitos T y B, monocitos y granulocitos), de líneas tumorales humanas Jurkat y HMY, así como de células de sangre periférica y de médula ósea de pacien-

tes con leucemias linfoides crónicas humanas B, y de algunos pacientes con leucemias mieloides crónicas. El anticuerpo SM50/20, sin embargo, no reconoce plaquetas.

3. Las secuencias correspondientes a los genes reagrupados que codifican para las regiones variables de las cadenas pesada μ y ligera κ del anticuerpo monoclonal humano SM50/20 producido por el hibridoma según reivindicación 1, se muestran en la descripción: las secuencias 1 (en DNA) y 2 (en proteína) corresponden a la región variable (genes reagrupados VDJ) de la cadena pesada μ y las secuencias 3 (en DNA) y 4 (en proteína) corresponden a la región variable (genes reagrupados VJ) de la cadena ligera κ .

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

RECONOCIMIENTO POR EL ANTICUERPO EN INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	
<i>SM 50/20</i>	
Pacientes con leucemias Linfocíticas Crónicas(LLC)	
Sangre periférica	
LLC(2965)	+++
LLC(2966)	+++
LLC (2864)	++
LLC (2880)	++
Médula ósea	
LLC (2970 MO)	++
Pacientes con leucemias mieloides crónicas (LMC)	
Sangre periférica	
LMC(1497)	-
LMC(3678)	++
Médula ósea	
LMC (2952) MO	+/-
LMC (2953) MO	-
LMC (2711B) MO	++
MO (2301)	+/-
LINEAS CELULARES HUMANAS	
U937 (Línea mielomonocítica)	-
K562 (eritroleucemia)	-
JURKAT (línea tumoral T)	++
YT-INDI (Línea NK-like)	-
HMY (línea tumoral B)	++
LÍNEA CELULAR DE RATA	
RBL(Células leucémicas basófilas)	-
CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA (Controles sanos)	
PLAQUETAS	-
LINFOCITOS	+++
LINFOCITOS T CD7 ⁺	++
GRANULOCITOS	++
MONOCITOS	++

ES 2 192 426 A1

LISTAS DE SECUENCIAS

5 <110> González Fernández, África

<120> Anticuerpo Monoclonal humano SM50/20 que reconoce leucocitos humanos, y
10 su uso en terapia

<130>

15 <140> P200001194
<141> 2000-05-11

<160> 4

20 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

25 <211> 354

<212> DNA

30 <213> Homo sapiens

<220>

35 <221> V-region

<222> (1)..(354)

<223> V-region of the human Immunoglobulin heavy chain.
40 Vh gene, residues from 1 to 290.
Dh gene, residues from 291 to 297.
Jh gene, residues from 298 to 352

45 <400> 1
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcgacccta acagtgggtg cacaaactat 180
50 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagcccc 300
55 aactgggact tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 2

60 <211> 118

ES 2 192 426 A1

<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<220>
10 <221> V-region
<222> (1)..(118)
<223> Sequence of aminoacids corresponding to the human Immunoglobulin
15 heavy chain V region, codified by sequence 1.

<400> 2
20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
25 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
30 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
35 Ala Arg Ala Pro Asn Trp Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
40 115

<210> 3
<211> 324
45 <212> DNA
<213> homo sapiens

50 <220>
<221> V-region
<222> (1)..(322)
55 <223> V region of the human Immunoglobulin kappa light chain.
Vk gene, residues from 1 to 287.
Jk gene, residues from 288 to 322

60

ES 2 192 426 A1

```

<400> 3
5  gacatccaga tgaccagtc tccatcttct gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
   atcaacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctgggatca gcagaaacca      120
   gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gtatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
10  aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ctatcagcag cctgcagcct      240
   gaagattttg caacttacta ttgtcaacag tctaacagtt tccctccac ttcggcgga      300
15  gggaccaagc tggagatcaa acgt                                             324

```

```

<210> 4
20  <211> 108
   <212> PRT
25  <213> Homo sapiens

```

```

<220>
30  <221> V-region
   <222> (1)..(108)
35  <223> Sequence of aminoacids corresponding to the human Immunoglobulin
      light kappa chain, codified by sequence 3.

```

```

<400> 4
40  Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
     1           5           10           15
   Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
     20           25           30
45  Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
     35           40           45
50  Tyr Ala Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
     50           55           60
   Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
     65           70           75           80
55  Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Pro
     85           90           95
   Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
     100          105
60

```



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 5/20, C12P 21/08, C07K 16/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9633735 A1 (CELL GENESYS, INC) 31.10.1996, páginas 2,3; reivindicaciones 1,3,20.	1-3
X	WO 9945962 A1 (GENPHARM INTERNATIONAL, INC) 16.09.1999, páginas 6-15; reivindicaciones 1,8.	1
Y	US 5877397 A (GENPHARM INTERNATIONAL, INC) 02.03.1999, resumen; columnas 8-12.	1-3
Y	ES 2115626 T3 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 30.12.1992, páginas 2,3; ejemplos; reivindicaciones.	1-3

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

14.08.2003

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1