

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 526**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04762981 .1**
96 Fecha de presentación: **30.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1740616**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **Anticuerpo anti-TfR**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2012

73 Titular/es:
**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

72 Inventor/es:
**MONTEIRO, Renato;
HERMINE, Olivier;
MOURA, Ivan y
LEPELLETIER, Yves**

74 Agente/Representante:
Durán Moya, Luis Alfonso

ES 2 379 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-TfR

5 La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de transferrina (TfR) y a su utilización para la inmunoterapia de enfermedades hiperproliferativas, tal como cáncer.

10 El receptor de transferrina (CD71) es una glicoproteína de transmembrana homodimérica unida por enlace disulfuro que comprende dos monómeros de 760 aminoácidos de aproximadamente 90kDa cada uno. TfR juega un papel crucial en la regulación de la absorción de hierro y en el crecimiento celular (Gill y otros, N Engl J Med., 332,1744-1748, 1995 - Hermine y otros, N Engl J Med, 332, 1749-1751, 1995). Cuando la transferrina diférrica se une a su receptor de la superficie celular, va hacia el interior a través de agujeros recubiertos de clatrina hacia vesículas ácidas en las que es disociado el complejo hierro-transferrina. Después de la liberación, el receptor y la apotransferrina son reciclados hacia la superficie celular.

15 El TfR se expresa constitutivamente en células de tejidos que se renuevan constantemente, tales como precursores de células sanguíneas en la médula ósea, hepatocitos en el hígado, los queratinocitos en la epidermis y enterocitos en las criptas del epitelio intestinal. Varios estudios han demostrado que TfR se expresa con mayor abundancia en los tejidos malignos que en sus homólogos sanos (Gatter y otros, J Clin Pathol, 36, 539-545, 1983 - FAULK y otros, Lancet, 2, 390-392, 1980 - Shindelman y otros, Int J Cancer, 27, 329-334, 1981). Varios autores han reportado enfoques terapéuticos basados en esta idea utilizando anticuerpos anti-TfR o la propia transferrina conjugados con medicamentos que destruyen las células malignas.

20 También se ha propuesto utilizar anticuerpos anti-TfR para bloquear la interacción entre transferrina y TfR y, por consiguiente, la absorción de hierro, lo que conlleva a la supresión del hierro y la regulación negativa del crecimiento celular. Sin embargo, aunque muchas publicaciones describen la preparación de anticuerpos anti-TfR, hay muy pocos informes de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-TfR que tienen una actividad antiproliferativa.

25 Trowbridge y Lopez (Proc. Natl Acad Sci USA, 79, 1175-1179, 1982) reportaron las propiedades de un anticuerpo monoclonal, designado 42/6 y tipificado como IgA (k), que bloquea la unión de transferrina a su receptor y es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de una línea de células T humanas leucémicas, mediante el bloqueo de las células en fase S del ciclo celular. El anticuerpo 42/6 y el hibridoma que lo produce (ATCC HB-8094) se dan a conocer en la patente de EE.UU. 4.434.156.

30 Taetle y otros (Cancer Res., 46, 1759-1763, 1986) han comparado el anticuerpo 42/6 con otro anticuerpo monoclonal anti-receptor de la transferrina (B3/25), que pertenece a la clase IgG, no bloquea la unión de transferrina a su receptor y no inhibe el crecimiento de los linfocitos. Observaron que la transferrina no inhibió la unión de 42/6, lo que sugiere que la inhibición de la unión de transferrina por el anticuerpo 42/6 inhibido es el resultado de un mecanismo no competitivo, posiblemente estérico.

35 El anticuerpo 42/6 ha sido probado en un ensayo de Fase Ia y se observó que, de manera general, fue bien tolerado, y que las concentraciones de anticuerpo que fueron capaces de inhibir el crecimiento maligno de células sanguíneas se obtuvieron sin toxicidad. (Brooks y otros, Clin Cancer Res., 1, 1259-1265, 1995).

40 Inicialmente se sugirió que las propiedades antiproliferativas del anticuerpo 42/6 eran el resultado de su capacidad para bloquear la unión a transferrina, privando así de hierro a las células, y que otros anticuerpos que tienen la misma capacidad podrían tener las mismas propiedades antiproliferativas. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la situación es más complicada.

45 White y otros (Cancer Res., 50, 6295-301, 1990) y la patente de EE.UU. 5.667.781 dan a conocer los efectos de 42/6, B3/25 y otros 32 anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio externo de TfR (todos de la clase IgG), sobre la unión de transferrina a su receptor y sobre el crecimiento de células T leucémicas en cultivo de tejidos. No se encontró ningún otro anticuerpo diferente de 42/6 que fuera capaz de inhibir la unión de la transferrina. La mayoría de los anticuerpos IgG no tuvo efecto poco inhibitorio o muy poco efecto sobre el crecimiento de las células T leucémicas. Sólo uno de ellos, designado D65.30 y que pertenece al isotipo IgG1, mostró propiedades inhibitorias del crecimiento similares a las de 42/6, aunque no inhibió la unión de la transferrina a TfR. También fueron ensayadas combinaciones de dos o más de estos anticuerpos monoclonales anti-TfR. Algunas de ellas no difieren en sus efectos inhibitorios del crecimiento de los anticuerpos individuales, otras fueron antagonistas y algunas de ellas mostraron un efecto sinérgico inhibitorio del crecimiento. Algunas de estas combinaciones mostraron una acción citotóxica, mientras que los anticuerpos individuales tuvieron una acción citostática, o eran inactivos. Estas combinaciones de anticuerpos monoclonales con elevadas propiedades antiproliferativas no bloquearon la unión de transferrina a TfR. La incubación prolongada (48 h) de las células con las combinaciones antiproliferativas B3/25 y 42/6, o D65.30 y A27.15, o con los anticuerpos individuales B3/25, 42/6, o D65.30 indujo una regulación por descenso de la expresión de TfR superficial resultando en una reducción de la unión a Tf a 4°C y 37°C. Sin embargo, sólo 42/6 de forma individual y las combinaciones B3/25 y 42/6 o D65.30 y A27.15 fueron capaces de reducir la internalización de TfR.

Lesley y otros (Mol Cell. Biol. 5, 1814-21, 1985) han estudiado los efectos de anticuerpos monoclonales anti-receptores de transferrina murinos pertenecientes a cualquiera de las clases IgG o IgM, sobre la unión de la transferrina y sobre el crecimiento celular *in vitro* de linfoma murino. Se observó que la IgM inhibió el crecimiento celular, pero que la IgG no lo hizo, aunque fueron capaces de inducir una regulación por descenso y una degradación de la TfR. Sin embargo, la IgG reticulada por un anticuerpo anti-inmunoglobulina fue capaz de inhibir el crecimiento celular. En un trabajo posterior, el mismo equipo (Lesley y otros, Exp. Cell Res., 182, 215-33, 1989) estudiaron los efectos de anticuerpos monoclonales IgG e IgM anti-TfR y de sus fragmentos mono y divalentes sobre el crecimiento de células de linfoma de ratón y la expresión de TfR. Informaron que estos efectos dependen del grado de reticulación de los receptores de transferrina por el anticuerpo, que es una consecuencia de la valencia del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo monovalentes no tuvieron efectos significativos; los fragmentos de anticuerpo divalentes indujeron una regulación por descenso de la expresión del receptor de superficie celular sin afectar su internalización y reciclado y sin afectar el crecimiento celular; los IgM multivalentes indujeron la acumulación del receptor del complejo de anticuerpo sobre la superficie celular, bloqueando su internalización y resultando en una fuerte inhibición del crecimiento celular.

Se desprende de la técnica anterior mencionada anteriormente que las propiedades antiproliferativas de los anticuerpos anti-TfR varían mucho de un anticuerpo a otro y que no se puede predecir en base a su capacidad para bloquear o no la unión de transferrina a su receptor.

En una publicación anterior (Moura y otros, J. Exp. Med., 194, 417-425, 2001), los inventores informaron que un anticuerpo monoclonal IgG (IgG2kappa), designado A24, producido por uno de los hibridomas obtenidos a partir de un ratón hiperinmunizado con proteínas de unión a IgA, estaba en realidad dirigido contra el TfR humano.

Los presentes inventores han encontrado ahora que el anticuerpo A24 es capaz de bloquear la proliferación de células T y que parece ser más eficaz que el mAb 42/6 anteriormente descrito en la inhibición de la proliferación de células T. Se han estudiado las propiedades de unión de A24 a TfR y se encontró que al igual que 42/6, inhibe la unión de transferrina a TfR; sin embargo, en contraste con el 42/6, que inhibe la unión de transferrina a TfR mediante un mecanismo no competitivo, A24 evita la unión de Tf a TfR de una forma competitiva. El A24 también reduce la expresión de TfR y afecta el reciclado de TfR.

Los presentes inventores también han ensayado los efectos de A24 en células T malignas de formas agudas y crónicas de ATL (células T de leucemia/linfoma de adulto), que expresan constitutivamente altos niveles de TfR de superficie. Se ha encontrado que A24 es capaz de bloquear la proliferación *ex vivo* de células T malignas de formas agudas y crónicas de ATL. Al contrario que 42/6, que ejerce sus efectos antiproliferativos mediante el bloqueo de las células en la fase S del ciclo celular, A24 actúa induciendo la apoptosis de las células diana.

Estas observaciones han sido publicadas recientemente por los presentes inventores (Moura y otros, Blood, 103, 5, 1838-45, 1 de marzo de 2004; publicado con anterioridad en línea el 30 de octubre de 2003).

Sin embargo, estas publicaciones no hicieron disponible el anticuerpo A24.

La presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal A24, que es útil en particular como una herramienta para usos terapéuticos o de investigación.

El A24 pertenece a la subclase IgG2κ. El hibridoma A24 que secreta este anticuerpo ha sido depositado, de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, con la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25 rue du Docteur Roux, París) el 10 de mayo de 2001, con el número I-2665.

Este hibridoma resulta de la fusión de la línea celular de mieloma de ratón Ag8.653 con células de ganglios linfáticos regionales de un ratón Balb/c hiperinmunizado con proteínas de unión a IgA derivadas de células U937.

Un objeto de la presente invención es un anticuerpo capaz de unirse específicamente al receptor de transferrina y de bloquear la unión de la transferrina a dicho receptor, caracterizado porque tiene la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo A24 producido por la línea celular de hibridoma CNCM I-2665.

La especificidad de unión al antígeno de un anticuerpo está determinada por seis regiones determinantes de complementariedad (CDR): tres de ellas son proporcionadas por el dominio variable de cadena ligera y las otras tres son proporcionadas por el dominio variable de cadena pesada. CDR1 y CDR2 de las cadenas ligeras y pesadas son codificados dentro de los segmentos génicos V. Las CDR más hipervariables, CDR3 de la cadena ligera y pesada, son generadas por la recombinación de segmentos génicos V y J o segmentos génicos V, D y J, respectivamente.

Por lo tanto, un anticuerpo de la presente invención se selecciona entre:

- el anticuerpo A24 producido por el hibridoma CNCM I-2665;

- los anticuerpos recombinantes que comprenden el conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3, de las cadenas ligera y pesada de A24.

5 Dichos anticuerpos recombinantes comprenden en particular anticuerpos quiméricos, en los que los dominios de la región constante del anticuerpo A24 se sustituyen por dominios humanos, y anticuerpos humanizados, en los que las CDR de A24 se insertan en regiones de estructura (FR) de origen humano.

10 Los procedimientos para preparar anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica. Los polinucleótidos que codifican las regiones variables del anticuerpo anti-A24 se pueden obtener fácilmente por clonación de dichas regiones variables a partir de una biblioteca de ADNc del hibridoma A24. Estos polinucleótidos pueden estar asociados con polinucleótidos que codifican los dominios de la región constante de un anticuerpo humano, para obtener un anticuerpo quimérico. De forma alternativa, para obtener un anticuerpo humanizado, las secuencias nucleotídicas que codifican las CDR de A24 se pueden identificar dentro de la región variable y se incorporan en las regiones de estructura de un anticuerpo humano, utilizando técnicas de injerto de CDR, que se completa
15 generalmente mediante la optimización de la estructura, que consisten en la sustitución de algunos residuos de la estructura humana, a efectos de retener la afinidad de unión máxima. Los procedimientos para humanizar anticuerpos son conocidos de por sí y se describen, por ejemplo, por Routledge y otros ["Una nueva forma de anticuerpos para terapia", en Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man, 13-44, Academic Titles, Nottingham, Inglaterra (1993)] o por Roguska y otros, Protein Engineering, 9 (10), (1996)]. La etapa de optimización de la estructura ha sido recientemente simplificada mediante el uso de bibliotecas combinatorias (Rosok y otros, J. Biol. Chem. 271, 22611-22618, 1996; Baca y otros, J. Biol. Chem. 272, 10678-10684, 1997). Otra estrategia reciente para la humanización de anticuerpos conserva solamente las secuencias de CDR3 no humanas originales de cadena ligera y pesada, mientras que la secuencia restante se selecciona de bibliotecas de genes V humanos nativos (Rader y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 8910-8915, 1998).
20
25

La presente invención también incluye:

- 30 - los fragmentos Fv, Fab o Fab'2 del anticuerpo A24 o de los anticuerpos quiméricos o humanizados obtenidos a partir de A24;
- las proteínas recombinantes que comprenden un anticuerpo de la presente invención o un fragmento Fv, Fab, Fab'2 o scFv del mismo fusionado a un polipéptido heterólogo. Dichas proteínas recombinantes pueden ser, por ejemplo:
- 35 - fragmentos scFv que comprenden las porciones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, conectados entre sí a través de un enlazador peptídico flexible [Clackson y otros, Nature, 352, 624-628 (1991)], formando así una proteína de cadena única
- 40 - derivados divalentes o plurivalentes de fragmentos scFv, tales como "diacuerpos" o "triacuerpos", que resultan de la asociación de 2 ó 3 fragmentos scFv;
- proteínas que combinan, como mínimo, un fragmento de anticuerpo que comprende los CDR del anticuerpo A24, con una molécula que tiene actividad farmacológica (por ejemplo, una toxina) o propiedades efectoras (por ejemplo, un fragmento Fc).
45

Otro objeto de la presente invención es un polinucleótido que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención, o un Fv, Fab, Fab'2 de la presente invención, o una proteína recombinante de la presente invención.
50

Según una realización preferente, dicho polinucleótido se selecciona entre:

- un polinucleótido que codifica una proteína que comprende las CDR de la cadena ligera del anticuerpo A24;
- 55 - un polinucleótido que codifica una proteína que comprende las CDR de la cadena pesada del anticuerpo A24.

La presente invención también se refiere a cualquier vector recombinante, en particular, cualquier vector de expresión, que comprende un polinucleótido de la presente invención.
60

Es también un objeto de la presente invención cualquier célula que expresa un anticuerpo, o un fragmento Fv, Fab o Fab'2, o una proteína recombinante de la presente invención. Esto abarca, en particular, el hibridoma CNCM I-2665 y también las células huésped transformadas con un polinucleótido de la presente invención.

65 El descubrimiento de los presentes inventores de que A24 no sólo puede inhibir la proliferación celular, sino también inducir apoptosis de células T altamente proliferantes, sin inducir la apoptosis de PBMC normal no proliferantes,

permite proponer los anticuerpos de la presente invención como un nuevo tratamiento para la inmunoterapia de tumores, en particular tumores que expresan un alto nivel de TfR.

5 Esto incluye tumores hematológicos, tales como linfomas, en particular, ATL, MCL, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B grandes, linfoma de células T periférico, leucemia aguda (mieloide y linfoide), así como tumores sólidos, tales como carcinoma renal, cáncer de pulmón (células pequeñas), etc.

10 Los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades relacionadas con HTLV-1, para reducir la carga viral en los trastornos inflamatorios asociados con la infección por HTLV-1, incluyendo HAM / TSP, polimiositis y artritis.

La presente invención también abarca una composición terapéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Aunque los anticuerpos de la presente invención son eficaces por sí mismos para destruir células tumorales, pueden estar asociados con uno o más agentes terapéuticos diferentes.

20 En particular, pueden estar asociados con uno o más agentes antivirales y/o antitumorales, tales como AZT, IFN- α , mAb anti-CD20, mAb anti-CD25, agentes quimioterapéuticos tales como adriablastina, aracitina, vincristina, etc.). Además, debido a su mayor afinidad por células tumorales que expresan una elevada densidad de TfR que por células normales, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para dirigir agentes antitumorales hacia dichas células tumorales. De esta manera, según una realización preferente de una composición de la presente invención, dicho otro agente o agentes terapéuticos se conjugan con un anticuerpo de la presente invención. De forma ventajosa, dicho otro agente o agentes terapéuticos son contenidos en liposomas que están acoplados a un anticuerpo de la presente invención.

30 Los presentes inventores también han encontrado que A24 bloquea la proliferación de células mesangiales por medio de IgA. Este hallazgo permite proponer los anticuerpos de la presente invención como un nuevo tratamiento para la inmunoterapia de nefropatía por IgA, en particular, la nefropatía por IgA con un alto estado proliferativo mesangial.

La presente invención se comprenderá más claramente a partir de la descripción más detallada que sigue, que se refiere a ejemplos no limitativos que ilustran las propiedades del anticuerpo A24.

35 EJEMPLOS:

MATERIALES Y MÉTODOS

40 Reactivos y anticuerpos.

45 La IL-2 y PHA fueron ambos adquiridos de Roche Diagnostics, Francia. Anti-CD25-FITC, anti-CD3 APC, anti-TfR-PE, los controles de isotipo IgG-FITC de ratón irrelevante, IgG-APC de ratón y IgG-PE de ratón se adquirieron todos de Immunotech, Francia. Los agentes quimioterapéuticos se utilizaron en las siguientes concentraciones: zidovudina (AZT) (Wellcome Research Labs, Beckenham, Kent, Reino Unido) a 0,2 μ M, anticuerpo monoclonal anti-IL-2R α (Zenapax de Hoffmann - La Roche, Nutley, NJ) a 10 μ g/ml, IFN- α (Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza) a 100 U/ml y trióxido de arsénico (Sigma Chemical Co.) a 1 μ M. El anticuerpo monoclonal anti-TfR humano (CD71) A24 se obtuvo a partir de un cultivo del hibridoma CNM I-2665 y el anticuerpo monoclonal de igual isotipo 30.9 dirigido contra la cadena Fc ϵ RI de rata se utilizó como control (Pastorelli y otros, Mol Immunol., 38, 1235, 2002). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de BCA tal como recomienda el fabricante (Pierce).

50 Aislamiento y cultivo de células.

55 Las células mononucleares de sangre periférica (PBCM) se aislaron tal como se describió anteriormente por el método de Ficoll-Paque estándar (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) (Bazarbachi y otros, Blood., 93, 278-283, 1999). Los voluntarios sanos y 3 pacientes con ATL crónicos y 4 agudos (clasificados siguiendo el criterio de Shirono) (Shirono y otros, Leukemia, 8, 1834-1837, 1994) habían dado todos su consentimiento informado. Las células tumorales de ATL representaban entre un 60-90% de la población de células T. Cada tipo de células se cultivaron de forma fresca en medio RPMI-1640 condicionado suplementado con un 10% de suero fetal de ternero (FCS, Gibco BRL) y una mezcla de interleucina-2 (20 U/ml de IL-2) y fitohemaglutinina (4 μ g/ml de PHA) .
60 La reacción mixta de leucocitos (MLR) se llevó a cabo tal como se describió anteriormente (Tordjman y otros., Nat Immunol., 3, 477-482, 2002). La línea de células de paraparesis espástica tropical CIB (HAM/TSP) se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FCS.

65 Citometría de flujo.

Para la citometría de flujo simple, doble y de tres colores, las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en

tampón fosfato salino (PBS), 2% de FCS, y 0,1% de NaN_3 , con FITC, APC PE conjugado anti-CD25, anti-CD3 y anti-CD71 anticuerpos específicos o con el control de isotipo de anticuerpos irrelevantes en la concentración adecuada (Immunotech, Beckman Coulter). Después de lavar, se analizaron 2×10^4 eventos con un FACScan (Becton Dickinson).

5

Microscopía confocal.

Las células CIB se sembraron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma, St. Louis, MO) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C . Las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal A24 a $10 \mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos a 4°C . Después de dos lavados en PBS/FCS al 2%, las células se sembraron en medio RPMI-1640 con un 10% de FCS durante varias veces a 37°C o se mantuvieron en hielo. A continuación, las células se fijaron en paraformaldehído al 1%, se inactivaron con 0,1 M de glicina y se permeabilizaron con 1% de saponina en PBS que contenía un 1% de albúmina de suero bovino. Los anticuerpos primarios fueron revelados mediante un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en cabra conjugado con Cy-5 (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.). Después de dos lavados adicionales en PBS/FCS al 2%, las células se incubaron durante 5 min con $2 \mu\text{g/ml}$ de aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con Alexa-488 para delinear la membrana plasmática y se lavó nuevamente. Los portaobjetos montados se examinaron con un sistema de microscopio láser confocal (LSM 510 Carl Zeiss, Alemania).

10

15

20

Ensayo de proliferación.

Las células PBMC se resuspendieron en RPMI-1640 con 10% de FCS y se añadieron por triplicado a una concentración de 105 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Falcon, Oxnard, CA). Se midió la proliferación durante 18 horas, utilizando pulsos con $1 \mu\text{Ci/pocillo}$ de $[^3\text{H}]$ -timidina (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido). A continuación, las células se recogieron con una recogedora de 96 pocillos (Pharmacia, San Quentin, Francia), se colectaron sobre filtros (Pharmacia) y se midió la incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina con un contador de microcentelleo de placas β (LKB, Pharmacia).

25

30

Ensayo para determinar apoptosis.

Se trataron dos millones de PBMC de pacientes con HTLV-1 durante 96 horas con IL-2 y PHA en presencia o ausencia de A24 ($10 \mu\text{g/ml}$), 30.9 ($10 \mu\text{g/ml}$) o del agente inductor de apoptosis VP16 (100 ng/ml). A continuación, las células se lavaron con PBS enfriado en hielo y se incubaron con una combinación de anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) (Beckman-Coulter, Marsella, Francia), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. De forma alternativa, se evaluó la apoptosis mediante la despolarización de la membrana mitocondrial con la tinción DIOC (Molecular Probes) tal como se describió anteriormente (Zermati y otros, J. Exp. Med., 193, 247-254, 2001).

35

Estudios de absorción de $[^{55}\text{Fe}]$ -transferrina.

Se cargó apo-transferrina con $[^{55}\text{Fe}]$ hasta un 99% de saturación, tal como se describió anteriormente (Kotamraju y otros, J Biol Chem., 277,17179-17187, 2002). Las PBMC cultivadas a $1 \times 10^6/\text{ml}$ durante 48 horas en medio condicionado PHA/IL-2 se expusieron a $2,5 \mu\text{M}$ de $[^{55}\text{Fe}]$ -transferrina durante los tiempos indicados. Al final del tiempo de absorción, las células se lavaron 4 veces en PBS y se lisaron en 0,1% de Triton X-100 en PBS. Se contó la radiactividad por gramo de proteína en los lisados en un contador beta.

45

Ensayos de resonancia de plasmones superficiales.

Todos los ensayos se realizaron en un instrumento Biacore 2000 equilibrado a 25°C con PBS + 0,005% de Tween-20 a un caudal de $50 \mu\text{l/min}$. El anticuerpo monoclonal Penta-His (Qiagen) se inmovilizó de forma covalente sobre la superficie carboximetilada de un sensor con chip CM5, utilizando el Amine Coupling Kit (Biacore AB). La preparación y purificación de TfR soluble se ha descrito anteriormente (Lebron y otros, Cell., 93,111-123, 1998). El ectodominio de TfR1 marcado con $(\text{His})_6$ recombinante (TfR- $(\text{His})_6$) fue capturado a un nivel de 120 unidades de resonancia (baja densidad) o 1650 unidades de resonancia (alta densidad) en la superficie de anti- $(\text{His})_6$. A continuación, se inyectaron diez concentraciones diferentes de mAb A24 (1-500 nM) o de Fe-transferrina (0,25-150 nM) a través de la superficie anti- $(\text{His})_6$ / TfR- $(\text{His})_6$ durante 4 minutos y la disociación de los complejos se siguió durante 5 minutos. Los experimentos de control se llevaron a cabo mediante la inyección de A24 o Fe-transferrina directamente sobre la superficie anti- $(\text{His})_6$. La asociación y disociación de los perfiles se analizaron con un algoritmo de mínimos cuadrados no lineales implementado en el programa de ordenador Biaevaluation 3.0 (Biacore AB), utilizando funciones de tiempo exponenciales simples. Para los experimentos de competición, se inyectaron A24 o Fe-transferrina saturados (300 nM) en la superficie anti- $(\text{His})_6$ / TfR- $(\text{His})_6$ de baja densidad, seguido un minuto más tarde por Fe-transferrina o A24 (15 nM), respectivamente. Los perfiles de asociación resultantes se compararon con los obtenidos sin la etapa de saturación preliminar (inyección de control de tampón).

60

RESULTADOS**EJEMPLO 1: ACTIVIDAD DE A24 EN LA PROLIFERACIÓN DE PBMC**

5 Para investigar la actividad de A24 en la proliferación de leucocitos de sangre periférica (PBMC), las células se activaron con PHA/IL-2 y se incubaron con diferentes concentraciones de A24 (de 0 a 50 µg/ml) o anticuerpo de control (30.9) (de 0 a 50 µg/ml) durante 72 horas antes de la incorporación de [³H]-timidina. Los resultados se muestran en la figura 1 A. A24 redujo de manera eficaz la proliferación de células (IC₅₀ 0,5 µg/ml ó 3 nM). Por el contrario, 30.9 no interfirió con la proliferación celular inducida por PHA/IL-2.

10 Para determinar si probar si A24 también podría bloquear la proliferación fisiológicamente activada de células T, se analizó el efecto de A24 en la reacción mixta de leucocitos alogénicos (MLR). La proliferación de células T alogénicas inducida por DC se evaluó después de 6 días de cultivo en presencia de A24, anticuerpo de control (30.9) o trióxido de arsénico (Ars). Los resultados se muestran en la figura 1 B. Los datos representan los promedios SD de uno de los tres experimentos por separado.

15 El co-cultivo de células dendríticas, activadas por TNF-α e IL-1β, con células T en reposo indujo la proliferación de células T. Tras la adición de A24 a las células co-cultivadas, se observó una fuerte inhibición de la proliferación de células T (más del 90%). El trióxido de arsénico (Ars), un compuesto que había demostrado inducir la apoptosis de las células T activadas con anterioridad (Bazarbachi y otros, Blood., 93, 278-283, 1999) también mostró bloquear la proliferación de células T.

EJEMPLO 2: EXPRESIÓN DE TfR Y EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE A24 SOBRE CÉLULAS TUMORALES

25 Se estudió la expresión diferencial de TfR en cultivos recién aislados e *in vitro* de células T de individuos sanos y de pacientes que sufren de formas agudas y crónicas de ATL.

30 Los resultados se muestran en la figura 2A. Se examinó la expresión de TfR en diferentes subtipos celulares: células T en reposo (a), células T activadas con PHA/IL-2 (b), línea celular de linfoma (Jurkat) (c), líneas celulares positivas a HTLV-1 (HUT-102 y MT-2, respectivamente) (d, e), linfocitos ex vivo de pacientes con ATL aguda (f, g), linfocitos ex vivo de pacientes con una forma crónica de ATL (h). El nivel de expresión de TfR se expresó en histogramas trazando la intensidad de fluorescencia de anticuerpos anti-CD71 (gris) en comparación con la del isotipo de control (línea abierta). Tal como se informó anteriormente (Neckers, Pathobiology 59:11-18, 1991), las células T no infectadas y no estimuladas (consideradas como células positivas a CD3) mostraron una expresión débil de TfR, mientras que las células T activadas con PHA/IL-2 expresan altos niveles de TfR. Las células T infectadas con HTLV-1 de las formas agudas de ATL expresaron TfR a niveles superiores a los observados en las células T de las formas crónicas de ATL. Las líneas celulares HUT-102 y MT2 (líneas celulares transformadas de HTLV-1) expresaron TfR a niveles inferiores que en la línea de células T Jurkat.

40 La expresión CD25 se ensayó para verificar si la expresión TfR se correlaciona con el grado de activación de las células T. La co-expresión de TfR y CD25 en células sanas y tumorales se muestra en la figura 2B: Leyenda de la figura 2B: células T en reposo (a), células T activadas con PHA/IL-2 (b), línea de células positivas a HTLV-1 (MT-2 y HUT-102, respectivamente) (c, d), linfocitos ex vivo de pacientes con una forma aguda de ATL (e, f), linfocitos ex vivo de pacientes con una forma crónica de ATL (g).

45 Las células T de las formas crónicas de ATL expresaron tanto CD25 como TfR a un nivel inferior al de las células T de las formas agudas de ATL. Los cultivos de células leucémicas T procedentes de pacientes de ATL en presencia de PHA/IL-2 conservaron su fenotipo activado (datos no presentados).

50 A continuación, se examinó la posibilidad de utilizar A24 como un inhibidor de la proliferación en cultivos de PBMC derivadas de pacientes con ATL.

55 Se sembraron PBMC de individuos sanos (a) y de pacientes infectados con HTLV-1 con ATL aguda (b) o ATL crónica (c) en pocillos de cultivo con A24 o un anticuerpo de control (30.9) en presencia de PHA/IL-2, durante 72 h antes de la incorporación de [³H] timidina. Los resultados se muestran en la figura 2C.

Aunque un poco menos eficaz que en PBMC de individuos sanos, A24 bloqueó de manera significativa la proliferación celular en cultivos de células de las formas agudas y crónicas de ATL.

60 Las células infectadas por HTLV-1 pueden proliferar *in vitro*, pero los clones que proliferan en cultivo generalmente no son los mismos que los que proliferan en el paciente. Para verificar si A24 podría inhibir la aparición de clones de células T infectadas por HTLV-1, se cultivaron células recién aisladas de pacientes y de individuos sanos en presencia o ausencia de A24. Se cultivaron PBMC de pacientes infectados por HTLV-1 con una forma crónica de ATL en pocillos de cultivo con 30.9, A24 o Ars durante 2 semanas. Se evaluó la aparición de clones de HTLV mediante la incorporación de [³H] timidina. Después de 2 semanas de cultivo, la aparición de células proliferantes se evaluó mediante la incorporación de [³H] timidina.

Los resultados se muestran en la figura 2D. Los datos son promedios SD de, como mínimo, tres experimentos por separado de 4 pacientes con ATL aguda y 3 pacientes con ATL crónica.

- 5 Una dosis única de A24 añadida durante el primer día de cultivo, inhibió de forma significativa la proliferación de clones de células T infectadas. El anticuerpo de control 30.9 no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre la proliferación de clones de HTLV-1. Como control positivo, Ars fue más eficaz que A24 en el bloqueo de la proliferación de células T tumorales.

10 EJEMPLO 3: ACTIVIDADES COMPARATIVAS DE A24 Y ANTI-IL-2 α SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN FORMAS AGUDAS Y CRÓNICAS DE ATL.

15 La expresión de TfR es esencial para la proliferación tanto de células T normales como malignas. Mientras que la expresión de TfR en células T normales está estrechamente vinculada con la expresión del receptor de interleucina-2, la expresión de TfR en células malignas suele ser constitutiva. Se ha demostrado previamente que el anticuerpo anti-IL-2R α puede bloquear de manera eficaz la proliferación ex vivo de células derivadas de pacientes crónicos de ATL. Sin embargo, anti-IL-2R α era menos eficaz o no lo era en el bloqueo de la proliferación de células de las formas agudas de ATL (Waldmann y otros, Blood, 82, 1701-1712, 1993; Waldmann, J Clin Immunol., 22, 51-56, 2002). Por lo tanto, se compararon las capacidades de A24 y anti-IL-2R α para bloquear la proliferación ex vivo de células infectadas por HTLV-1. Se incubaron leucocitos de sangre periférica de individuos sanos (a) y formas crónicas (b) o agudas (c) de ATL con PHA e IL-2 durante 72h con A24, anti-IL-2R α o ambos. A continuación, se midió la proliferación de estas células mediante la incorporación de [³H] timidina. Los datos son los promedios SD de un como mínimo, tres experimentos por separado con 4 pacientes con ATL aguda y 3 con ATL crónica.

25 Si bien anti-IL-2R α inhibió de forma significativa la proliferación de células de individuos normales y pacientes con formas crónicas de ATL, no bloqueó la proliferación de células derivadas de pacientes con ATL aguda. Por el contrario, A24 inhibió de forma significativa la proliferación de las células de los pacientes que sufren de formas agudas o crónicas de ATL. La asociación de A24 y anti-IL-2R α en individuos sanos y con formas agudas de ATL no tiene ningún efecto sinérgico mientras que en las formas crónica de ATL el efecto de la inmunoterapia combinada en la proliferación celular fue menos eficaz que el tratamiento con A24 solo.

30 EJEMPLO 4: ACTIVIDADES COMPARATIVAS DE A24, AZT, IFN- α , VP16 Y TRIÓXIDO DE ARSÉNICO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

35 A continuación, se examinó el efecto de la asociación de A24 con diferentes agentes quimioterapéuticos sobre la proliferación de células de ATL malignas.

40 Las células tumorales de un paciente crónico de ATL se incubaron con o sin A24 y se trataron con o sin diferentes agentes quimioterapéuticos tales como el AZT, IFN- α o ambos AZT e IFN- α , Ars o VP16 durante 72 h para determinar el efecto sinérgico potencial de estos agentes con A24. Las células fueron pulsadas con [³H] timidina y se recogieron antes de medir la incorporación de [³H] timidina. Los datos son promedios SD de un experimento representativo de tres experimentos por separado.

45 Los resultados se muestran en la figura 4. La asociación de agentes quimioterapéuticos con A24 puede mejorar la inhibición de la proliferación de las células tumorales. El efecto inhibitor principal se observó cuando A24 está asociado con AZT, IFN- α y AZT + IFN- α (aproximadamente un 70% de inhibición de la proliferación celular).

50 EJEMPLO 5: PROPIEDADES DE UNIÓN DE A24 A FR1

A24 compite con Fe-Tf por la unión a TfR

55 Para conocer el mecanismo de inhibición de la proliferación celular mediante A24, se llevaron a cabo una serie de experimentos de resonancia de plasmones superficiales para determinar las propiedades de unión del mAb A24 y Fe-Tf al ectodominio de TfR1 soluble. La determinación de k_{on} , k_{off} y $K'd$ a partir de los datos experimentales de Biacore se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la tabla I siguiente. Se muestra el valor promedio y el error estándar de tres o más determinaciones independientes.

Tabla I

Densidad de receptor inmovilizado	Ligando	k_{on} (10^5 M \cdot 1.s $^{-1}$)	K_{off} (10^{-4} s $^{-1}$)	$K'd^b$ (nM)
baja	Fe-Tf	12,1 \pm 1,70	11,9 \pm 1,9	0,98 \pm 0,21
baja	MAb A24	8,30 \pm 0,64	22,3 \pm 4,8	2,69 \pm 0,62
alta	Fe-Tf	3,04 \pm 0,63	9,48 \pm 2,24	3,12 \pm 0,93
alta	MAb A24	3,82 \pm 0,12	3,88 \pm 0,91	1,02 \pm 0,24

^b K'd es la constante de disociación en equilibrio medida en la interfase heterogénea entre la fase líquida y la superficie con chip sensor. No existe una relación simple entre esta constante y la Kd que podría medirse en una solución homogénea.

5 A24 interactúa con TfR con una constante de equilibrio (K'd) de 2,69 nM, en comparación con 0,98 nM para Fe-Tf.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de competición para determinar si los sitios de unión de A24 a TfR se solapan con los de Fe-Tf. Las condiciones experimentales se describen en el apartado de Materiales y Métodos mencionado anteriormente. (figura 5 A y B)

10 5A) se inyectó Tf a través de la superficie de TfR, después de la saturación con A24 (línea gruesa) o una inyección de tampón de control (línea fina).

15 5B) se inyectó A24 a través de la superficie de TfR, después de la saturación con Tf (línea gruesa) o una inyección de tampón de control (línea fina).

La saturación de TfR con A24 afectó de forma parcial la unión de Fe-Tf y, de forma recíproca, la saturación de TfR con Fe-Tf afectó de forma parcial la unión de A24.

20 *La aparente estabilidad del complejo entre A24 y TfR es altamente dependiente de la densidad de TfR.*

La afinidad de A24 para una superficie de baja densidad de TfR fue 3 veces menor que la de Fe-Tf. Sin embargo, a diferencia del ligando monovalente Tf, A24 posee dos sitios de unión y, por lo tanto, la avidéz de esta IgG bivalente puede ser dependiente de la densidad disponible del receptor en la superficie celular. Para simular esta situación, se capturaron diferentes cantidades TfR-(His)₆ en un chip con sensor anti-(His)₆.

25 Se inyectaron una serie de concentraciones de Fe-Tf y A24 a través de una superficie con TfR inmovilizado de baja densidad (C: 120 RU) o una de alta densidad (D: 1650 RU): sólo se muestran los datos obtenidos para 134 nM de Fe-Tf (línea delgada) y 62,5 nM de A24 (línea gruesa). Los complejos A24/TfR se disocian más rápido que Tf/TfR cuando TfR está presente a baja densidad (C), mientras que a alta densidad, se observa la situación opuesta (D) (véase Tabla I).

35 La velocidad de disociación ("off") del complejo A24/TfR fue 6 veces menor cuando TfR estaba disponible a densidades más altas. Por el contrario, la "off", y por lo tanto la t_{1/2}, del complejo Fe-Tf/TfR no fue influenciada por la densidad de TfR (tabla I y figura 5 C y D). Este experimento sugiere que A24 preferentemente se unirá a células que expresan altos niveles de TfR, es decir, células malignas.

EJEMPLO 6: EFECTO DE A24 EN LA ABSORCIÓN DE TRANSFERRINA Y EL RECICLADO DE TFR.

40 *A24 inhibe la absorción de [⁵⁵Fe] Tf por células T activadas*

Los resultados presentados anteriormente sugieren que al interferir con la asociación de Fe-Tf con TfR, A24 podría inhibir la absorción de Fe-Tf.

45 Para probar esta hipótesis, se cultivaron PBMC de donantes normales en medio condicionado PHA/IL-2 y se incubaron con [⁵⁵Fe]-Tf en presencia de A24 (a 10 µg/ml) o de un control de igual isotipo irrelevante (anticuerpo 30.9).

50 Las células PBMC se incubaron con PHA e IL-2 durante 24 horas antes de ser sembradas en cultivo. Para probar la absorción de Tf, las células activadas se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo con A24 (barra en blanco) o control de isotipo 30.9 (barra gris) en presencia de 2 a 5 µM (⁵⁵Fe)-Tf. Los datos son promedios SD de un experimento de tres experimentos por separado.

55 Tal como se muestra en la figura 6A, A24 inhibió de forma drástica la absorción de [⁵⁵Fe]-Tf en células T activadas con PHA/IL-2, alcanzando un máximo del 80% de inhibición después de 2 horas de cultivo.

A24 afecta la expresión y el reciclado de TfR.

60 La endocitosis de transferrina a través de TfR es un fenómeno bien establecido. La transferrina diférrica se une a TfR en la superficie celular y su endocitosis es provocada por endosomas que están ubicados en la periferia citoplasmática (pH 6,2) y los endosomas de reciclado (pH 6,4). Después de la disociación de Fe, apo-transferrina y TfR son reciclados nuevamente a la superficie celular. Se ha demostrado previamente que la reticulación de TfR por anticuerpos anti-TfR podría inducir la regulación por disminución de la expresión TfR en células tumorales.

65 Para examinar si A24 podría afectar la expresión de TfR en la superficie celular, se cultivaron células PBMC no estimuladas o estimuladas en presencia o ausencia de A24. La expresión de TfR y CD25 fue seguida en PBMC de

donante sano (a), pacientes con ATL crónica (b) y aguda (c). Las células fueron activadas con PHA e IL-2 durante 72h, en presencia de A24 o un anticuerpo de control (30.9). Los resultados se muestran en la figura 6B.

5 El porcentaje de inhibición de la intensidad de fluorescencia promedio vinculado a la expresión de TfR y CD25 se indica en histogramas situados en la esquina derecha superior de los paneles de la derecha.

10 De forma drástica, A24 reguló por disminución de TfR en la superficie celular en células normales estimuladas por PHA/IL-2 (figura 6B). Además, A24 reguló por disminución la expresión de TfR en cultivos celulares *ex vivo* de formas crónicas y agudas de ATL en más de un 75% y no interfirió con la expresión de CD25 (figura 6B). A24 no tuvo ningún efecto sobre la expresión de TfR en células T no activadas normales (datos no presentados). Como las células ATL producen altos niveles de IL-2 e IL-15, también se ensayó el efecto de A24 sobre células infectadas por HTLV-1 de donantes con ATL aguda cultivadas en medio condicionado con IL-15 o IL-2/IL-15. Se observó más de un 65% de regulación por disminución de la expresión de TfR en ambos casos (datos no presentados).

15 TfR se recicla constantemente en la célula con un $t_{1/2}$ tan bajo como 15 minutos. Para ensayar la capacidad de A24 para interferir con este reciclado, se tiñeron células T activadas malignas (línea celular CIB, derivada de un paciente con HTLV-1) a 4°C con A24 y se sembraron en condiciones de cultivo a 37°C durante tiempos diferentes (de 0 a 180 min) para determinar el efecto de la unión de A24 sobre el tráfico de TfR. Después de 30 minutos de incubación a 4°C, las células se lavaron, se cultivaron a 37°C durante un máximo de 180 min y se localizó A24 por microscopía confocal. Las células que se incubaron sólo a 4° C expresaron el complejo TfR en su membrana, tal como se evidenció por la co-localización de A24 y WGA. Después de 15 minutos de cultivo, la presencia de TfR en los compartimentos vesiculares sub-membrana fue consistente con el reciclado de TfR. Sin embargo, después de largos períodos de cultivo, estos TfR decorados con A24 no se habían reciclado a la superficie de la célula, pero en su lugar, habían sido dirigidos a compartimentos intracelulares polarizados que se asemejan a vesículas endo-
25 lisosomales (figura 6C).

EJEMPLO 7: A24 INDUCE APOPTOSIS DE CÉLULAS TUMORALES DE ATL ACTIVADAS.

30 La falta de Fe induce una variedad de consecuencias, tales como la reducción de la proliferación celular y la activación de muerte celular programada (HAQ y otros, Exp. Hematol., 23, 428-432, 1995), un fenómeno asociado con la exposición a fosfatidilserina y la despolarización de la membrana mitocondrial. Para determinar si A24 induce apoptosis, se ensayaron las células tratadas con A24 para determinar la translocación de fosfatidilserina desde el interior hacia la cara externa de la membrana plasmática utilizando el ensayo de afinidad por anexina V. Los resultados se muestran de las figuras 7A y 7B.

35 Efecto comparativo de A24, 30.9 y VP16 en la inducción de muerte celular programada en células seleccionadas. Las células no se activaron o se activaron con PHA e IL-2 y se incubaron en presencia de 30.9, A24 y VP16. Las células apoptóticas y necróticas fueron seguidas por citometría de flujo utilizando un kit de anexina-V-FITC/P1. Se indica el porcentaje de células situadas en los cuadrantes del histograma a la derecha. (a) células de forma aguda de ATL, (b) células PBMC normales, no estimuladas, (c) línea celular CIB no estimulada (B) (a) tinción con anexina-V de leucocitos activados de pacientes con ATL aguda incubados con 30.9 (línea cerrada) , VP16 (línea discontinua) o A24 (línea continua). (B) despolarización mitocondrial revelada mediante tinción DIOC de leucocitos activados de paciente con ATL aguda incubados con 30.9 (línea cerrada), VP16 (línea discontinua) o A24 (b, línea continua). Los datos representan uno de tres experimentos diferentes.

45 Las células muertas se tiñeron mediante PI, que entra en las células que tienen la membrana plasmática rota y se intercala en el ADN. Tras el tratamiento con A24, las células tumorales derivadas de pacientes con ATL aguda mostraron un aumento en el número de células muertas (anexina V-P1 brillante) en comparación con las células tratadas con el anticuerpo de control. Se utilizó VP16 a 100 ng/ml como control positivo de la apoptosis (figura 7A). En las células T tumorales de ATL, apareció una gran población que estaba teñida de forma brillante con anexina-V después del tratamiento con A24 o VP16. También se analizó la apoptosis inducida por A24 en la línea celular CIB derivada de TSP (un modelo celular de ATL no aguda). A24 indujo apoptosis de la línea celular CIB cultivada sin PHA-IL2 (figura 7A). Como control se incluyó un análisis de PBMC normales y no tratadas que no estaban proliferando y que no se sometieron a apoptosis espontánea en ausencia de factores de activación. Estas células no fueron sensibles a A24 (figura 7A). Se utilizó DIOC para examinar si la despolarización mitocondrial estaba implicada en la apoptosis dependiente de A24. La drástica reducción en la concentración DIOC que se observó después de la exposición a A24 o VP16, demostró que la apoptosis fue inducida a través de la vía mitocondrial (figura 7B).

60 **EJEMPLO 8: ACTIVIDADES COMPARATIVAS DE A24 Y ANTI-CD20 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO.**

El linfoma de células del manto (MCL) es un linfoma no-Hodgkin agresivo contra el que existen disponibles pocas quimioterapias eficaces. Por lo tanto, se comparó la eficacia de A24 con respecto a un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab, fabricado por Genentech) propuesto últimamente para el tratamiento terapéutico de esta enfermedad.

65

En un primer momento, se comprobó mediante citometría de flujo de la velocidad de expresión de TfR y CD20 en cinco líneas de células B (EBV+ y EBV-) derivadas de MCL, utilizando un anticuerpo anti-CD71-PE (Beckman-Coulter) y un anticuerpo anti-CD20-PE (Becton Dickinson). Los resultados se muestran en las figuras 8 A y B. Los histogramas grises representan respectivamente la velocidad de expresión de CD71 (A) y de CD20 (B) en la superficie de las células MCL EBV+ (a, b, c, e, f, g) o EBV- (d). Esta velocidad se especifica en cada histograma después de la sustracción del ruido de fondo de la tinción.

Las líneas EBV+ y EBV- expresan a velocidades variables TfR y CD20 y, por lo tanto, tienden a ser sensibles a tratamientos con estos dos anticuerpos.

La velocidad de expresión de los receptores diana TfR y CD20 en la superficie de una línea celular MCL EBV+ y una línea celular MCL EBV- después de un tratamiento de 30 minutos a 72 horas con A24 ($IC_{50} = 0,625 \mu\text{g/ml}$) o Rituximab ($10 \mu\text{g/ml}$) fue seguida mediante citometría de flujo, tal como se ha indicado anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 9A (A24) y 9B (Rituximab).

Bajo tratamiento con A24, la expresión de TfR en la superficie de las células disminuyó en un 50% después de 30 minutos de tratamiento y esta reducción alcanzó más de 80% después de 48 horas. Por otro lado, el tratamiento de las células con Rituximab no induce una reducción notable en la expresión de CD20 cualquiera que sea la duración del tratamiento (de 30 minutos a 72 horas).

También se comparó el efecto antiproliferativo de A24 y Rituximab en las células MCL.

Las líneas de MCL EBV+ y EBV- se cultivaron durante 72 horas en presencia de concentraciones de Rituximab o A24 desde $0,312 \mu\text{g/ml}$ a $20 \mu\text{g/ml}$ antes de la incorporación de timidina radiactiva (18h). La proliferación celular se expresa como un porcentaje de la proliferación de las células de control no tratadas. Los resultados se muestran en la figura 10.

Rituximab, así como A24, son capaces de reducir la proliferación de las células MCL, pero a velocidades diferentes. Rituximab no induce más de un 20% de inhibición de la proliferación de MCL, mientras que en el mismo tiempo A24 lo inhibe de un 40% a un 80%. Esta diferencia se debe principalmente al requisito de la ADCC para una buena eficacia de Rituximab, lo contrario de A24. Además, el efecto antiproliferativo de A24 se obtiene con un IC_{50} muy bajo ($0,625 \mu\text{g/ml}$).

EJEMPLO 9: EFECTO DEL ANTICUERPO A24 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MESANGIALES INDUCIDAS POR IgA1 (pIgA1) POLIMÉRICO

La proliferación de células mesangiales es una característica de la nefropatía por IgA, la primera causa de insuficiencia renal en todo el mundo. Actualmente no hay tratamiento eficaz disponible y la enfermedad se agrava hacia insuficiencia renal.

Se ha demostrado que los anticuerpos IgA pueden inducir la proliferación de células mesangiales (Gomez-Guerrero y otros. J Immunol 151: 5247,1994), también es conocido que TfR se sobreexpresa en células mesangiales de pacientes con nefropatía por IgA (Moura y otros, 2001, citado anteriormente; Haddad y otros. J Am Soc Nephrol. 2003,14: 327-337).

Se ha ensayado si el bloqueo de TfR por A24 podría inhibir la proliferación de células mesangiales inducida por pIgA1.

Se obtuvieron cultivos de células mesangiales, tal como se describió por Moura y otros (2001, citado anteriormente). Estos cultivos se incubaron durante 24 horas con medio RPMI + suero fetal de ternera (control), o con IgA1 (pIgA1) polimérico solo a $500 \mu\text{g/ml}$, o con pIgA1 ($10 \mu\text{g/ml}$) en combinación con A24 a $10 \mu\text{g/ml}$ o con el anticuerpo de control 30.9 a la misma concentración.

La figura 12A muestra que pIgA1 indujo un aumento del 70% en la proliferación de células mesangiales. A24 bloqueó específicamente la proliferación de células mesangiales inducida por IgA, mientras que el control de isotipo 30.9 no lo hizo.

También se determinó si el efecto de A24 sobre la proliferación de células mesangiales inducida por IgA era el resultado de la inhibición de las funciones mediadas por pIgA1 o el resultado de una interferencia con el metabolismo del hierro privando a las células de su absorción de hierro.

La figura 12B muestra que A24 solo ($10 \mu\text{g/ml}$) no tuvo ningún efecto sobre las células mesangiales poco proliferativas.

Para ensayar si A24 inhibió la proliferación de células mesangiales inducida por otros estímulos diferentes a plgA1, se realizaron experimentos con LPS (10 µg/ml) y citoquinas proinflamatorias que se conoce que inducen la proliferación de células mesangiales: IL1-β (10 ng/ml) y TNF-α (10 ng/ml).

5 La figura 12C muestra que A24 no tuvo ningún efecto significativo sobre la proliferación de células mesangiales inducida por citoquinas o LPS.

Por lo tanto, el mAb anti-TfR A24 bloquea específicamente la proliferación de células mesangiales inducida por plgA1.

10 En experimentos adicionales, se demostró que A24 bloquea la inducción mediada por IgA de la expresión de TfR en la superficie de las células mesangiales (datos no presentados).

REIVINDICACIONES

- 5
1. Anticuerpo capaz de unirse específicamente al receptor de transferrina y de bloquear la unión de la transferrina a dicho receptor, caracterizado porque se selecciona entre:
- el anticuerpo A24 producido por el hibridoma CNCM1-2665;
 - un anticuerpo recombinante que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas ligera y pesada de A24.
- 10
2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, seleccionado entre un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado.
3. Fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado entre los fragmentos Fv, Fab, Fab'2 o scFv.
- 15
4. Proteína recombinante que comprende un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un Fv, Fab, Fab'2 o scFv del mismo, fusionado a un polipéptido heterólogo.
- 20
5. Polinucleótido aislado seleccionado entre:
- un polinucleótido que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2;
 - un polinucleótido que codifica un fragmento, según la reivindicación 3;
 - un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, según la reivindicación 4.
- 25
6. Proteína seleccionada entre:
- un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2;
 - un fragmento Fv, Fab, Fab'2 o scFv, según la reivindicación 3,
 - una proteína recombinante, según la reivindicación 4;
- 30
- 35
- para su uso como medicamento.
7. Uso de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor.
- 40
8. Uso, según la reivindicación 7, en el que dicho tumor es un linfoma.
9. Uso de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de un medicamento para tratar la nefropatía por IgA.
- 45

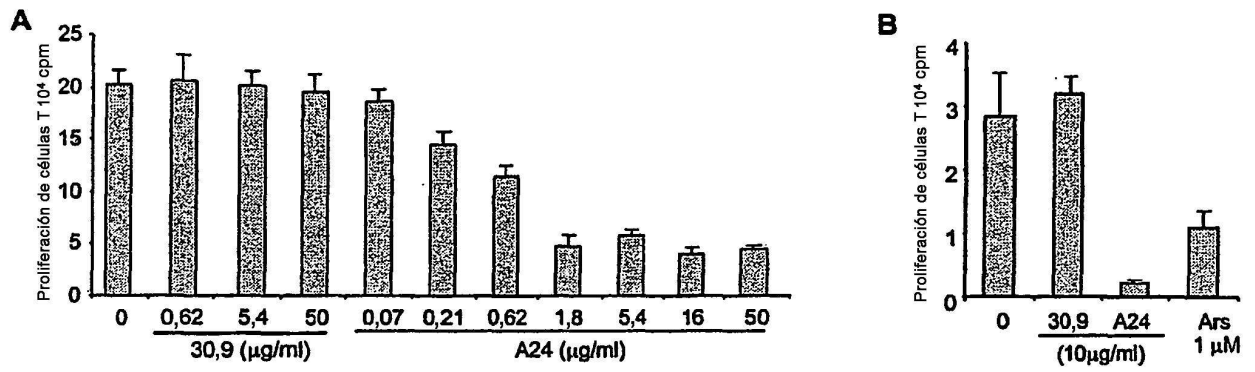


FIGURA 1

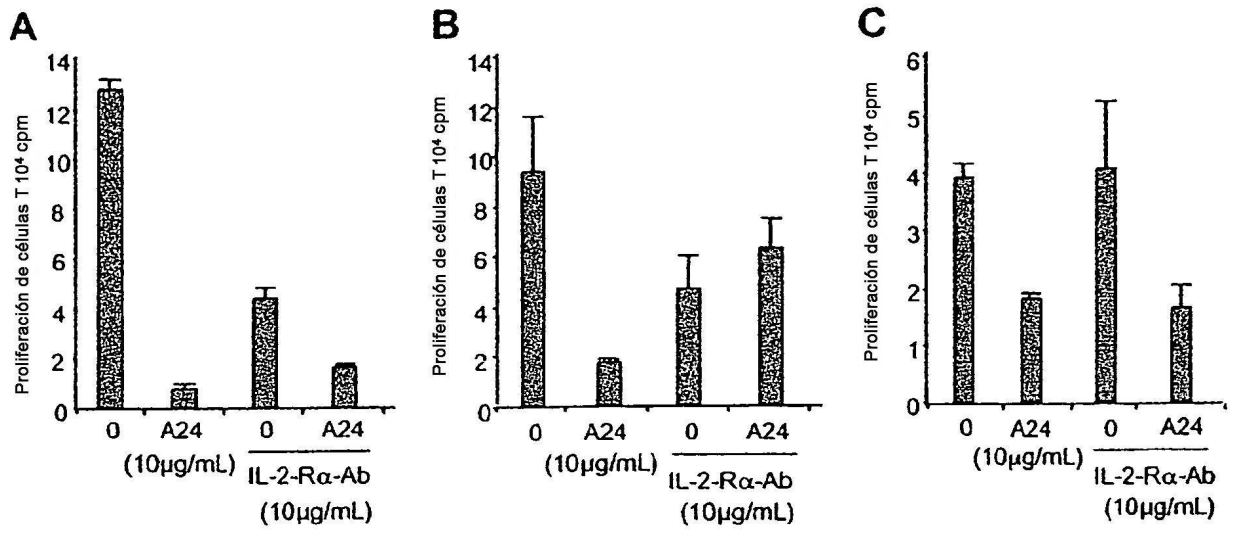


FIGURA 3

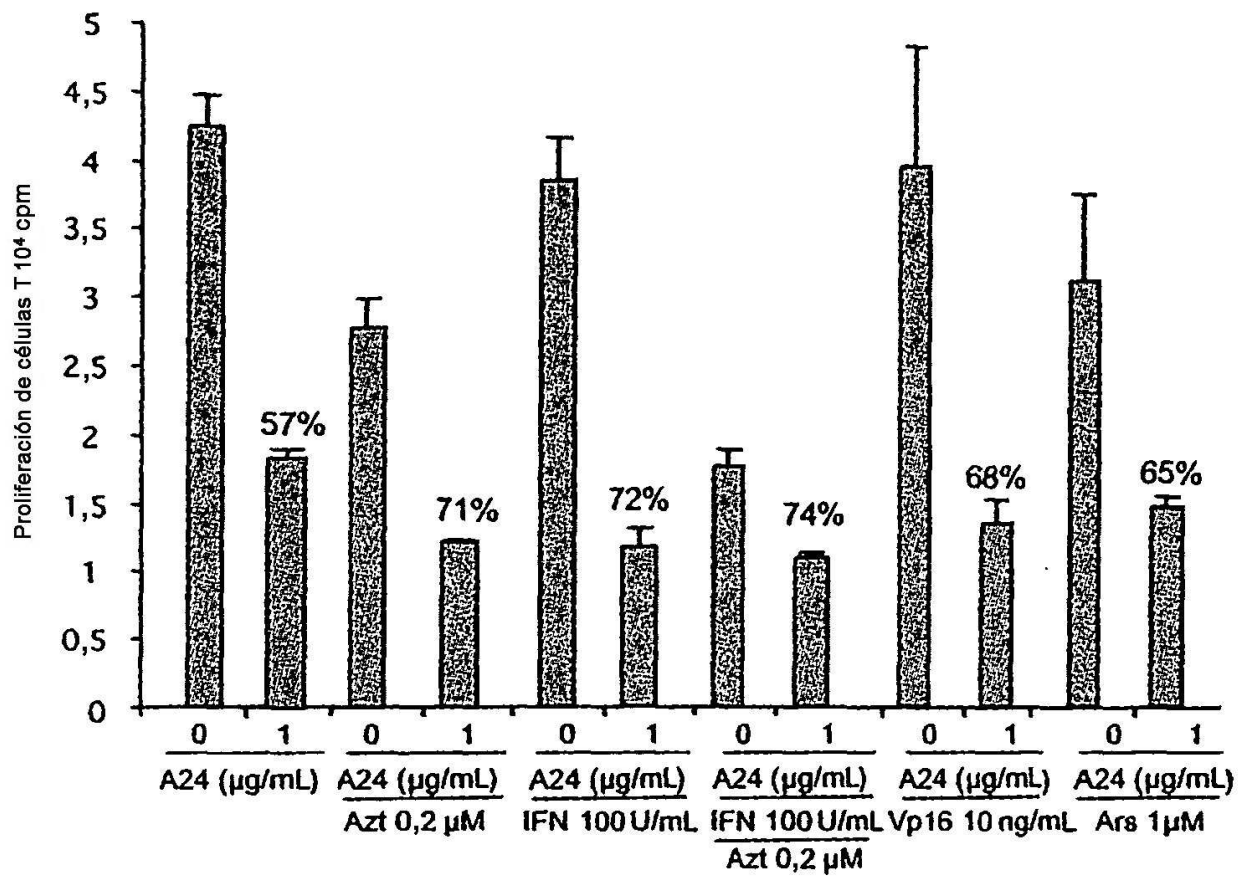


FIGURA 4

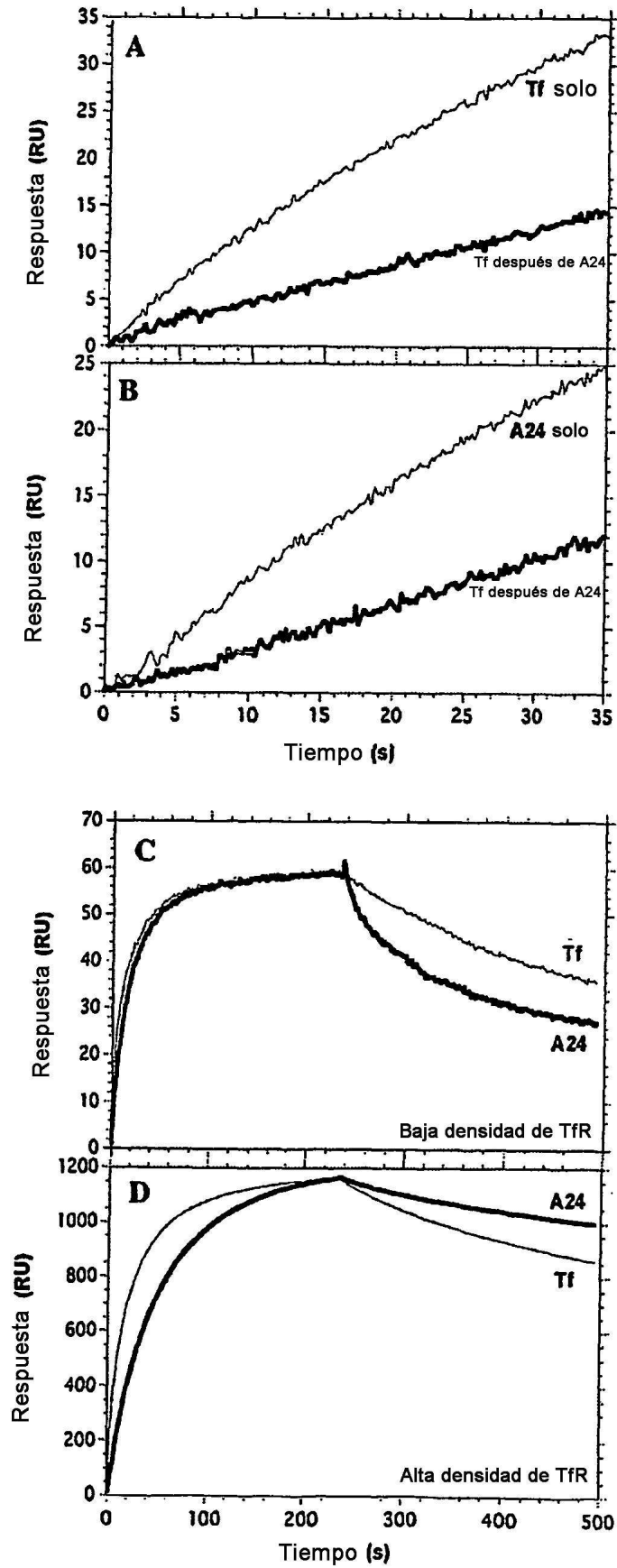


FIGURA 5

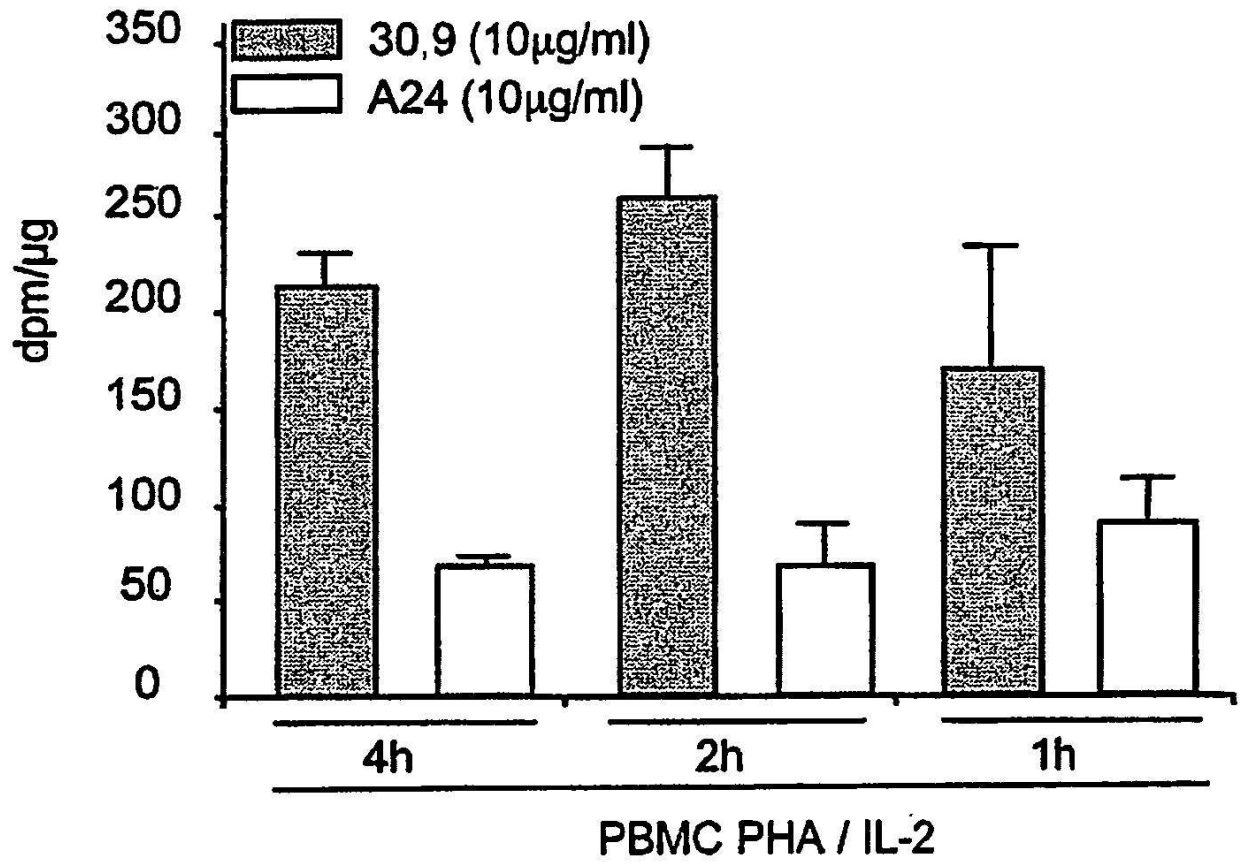


FIGURA 6

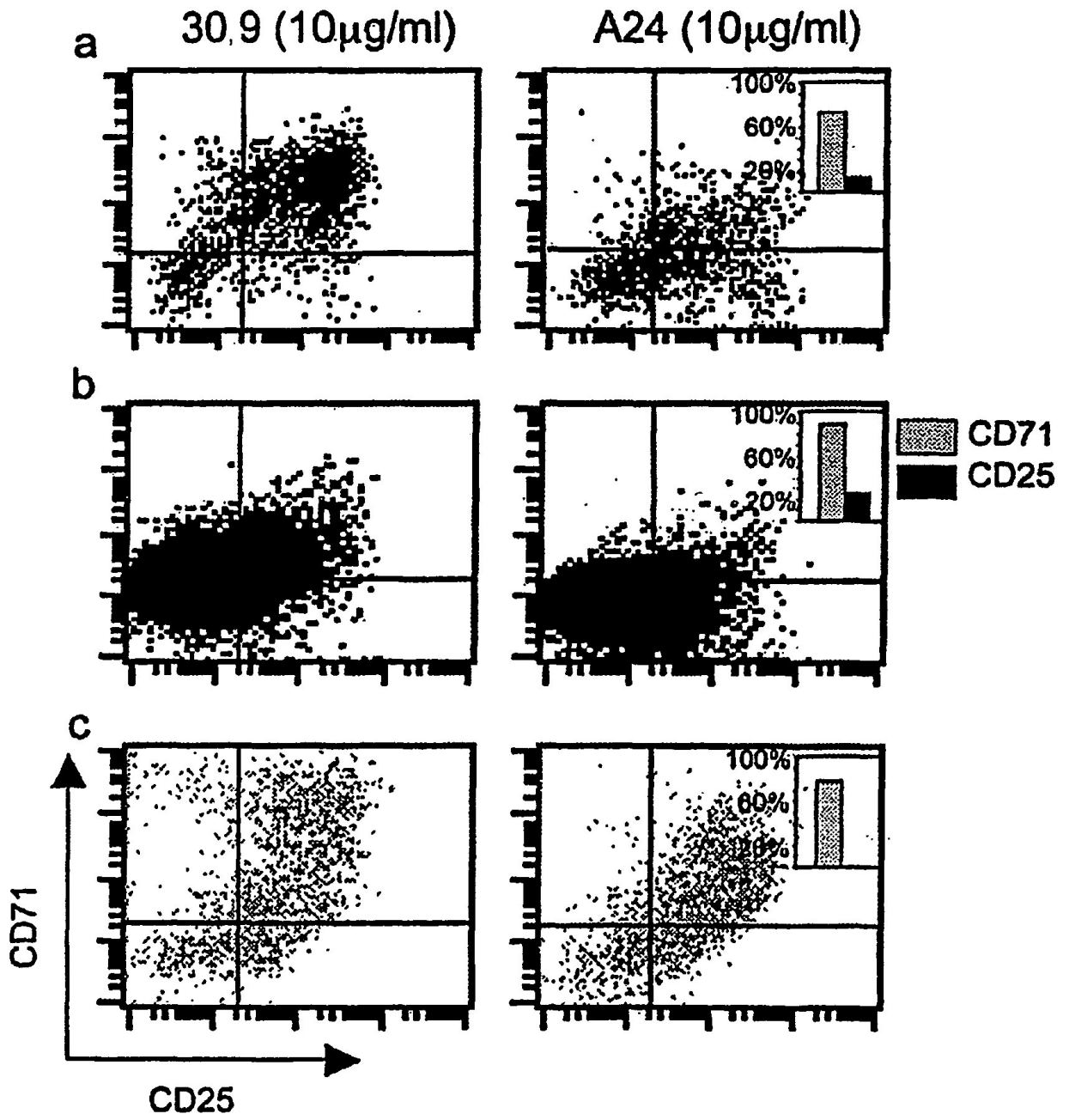


FIGURA 7

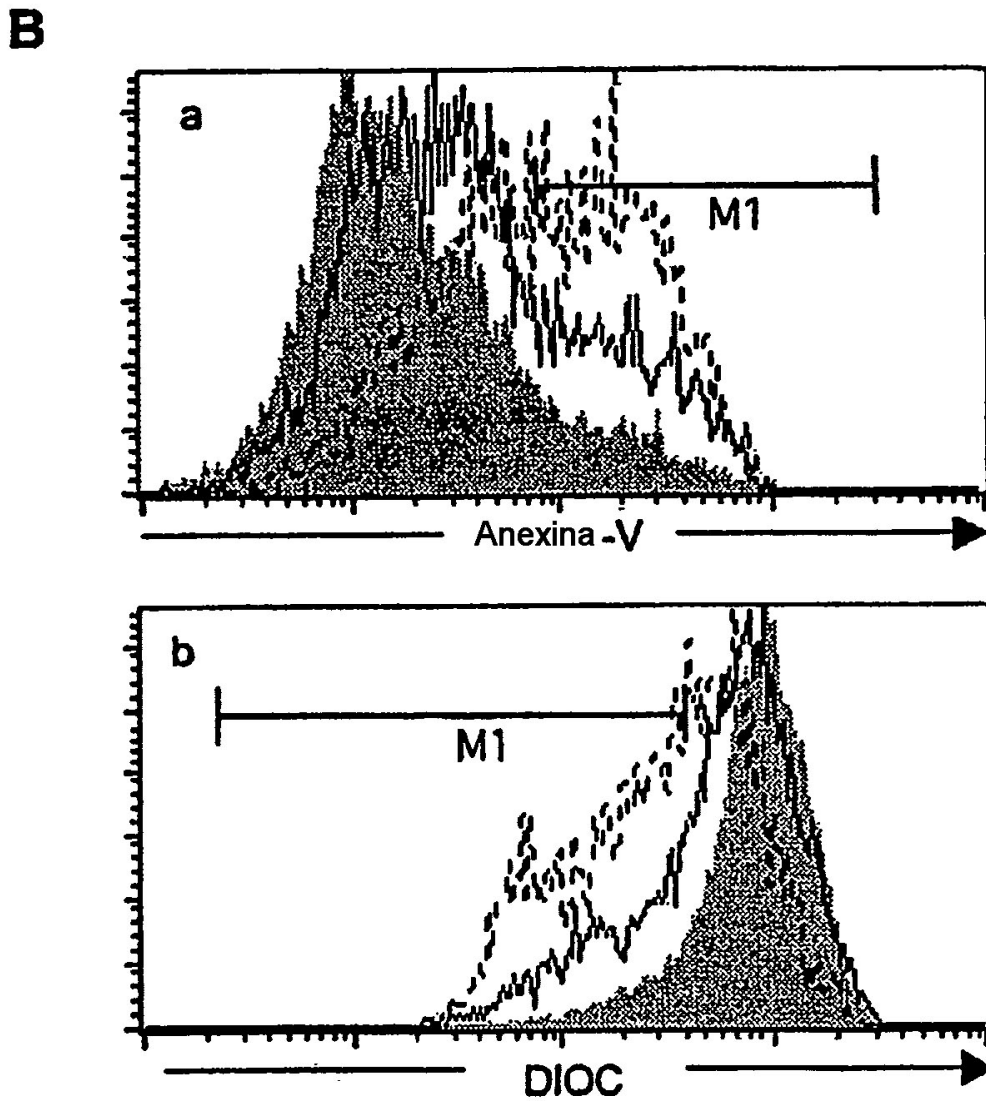
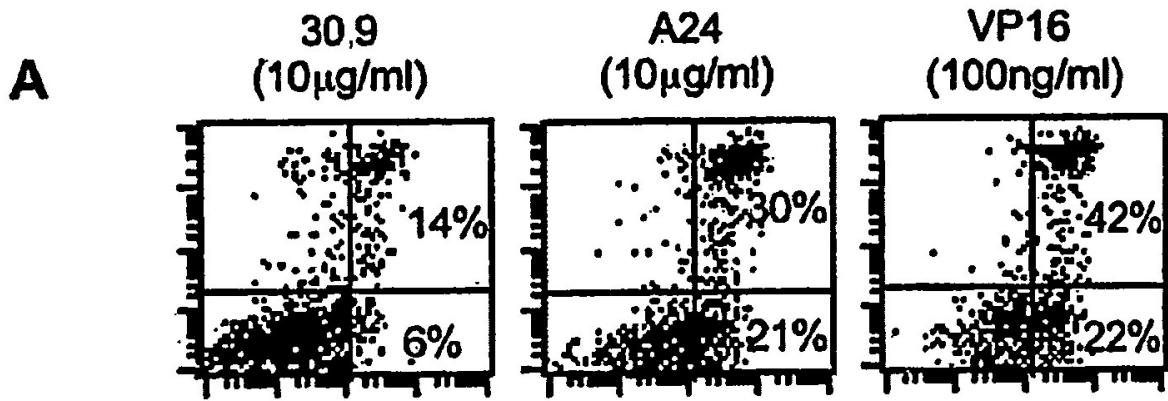
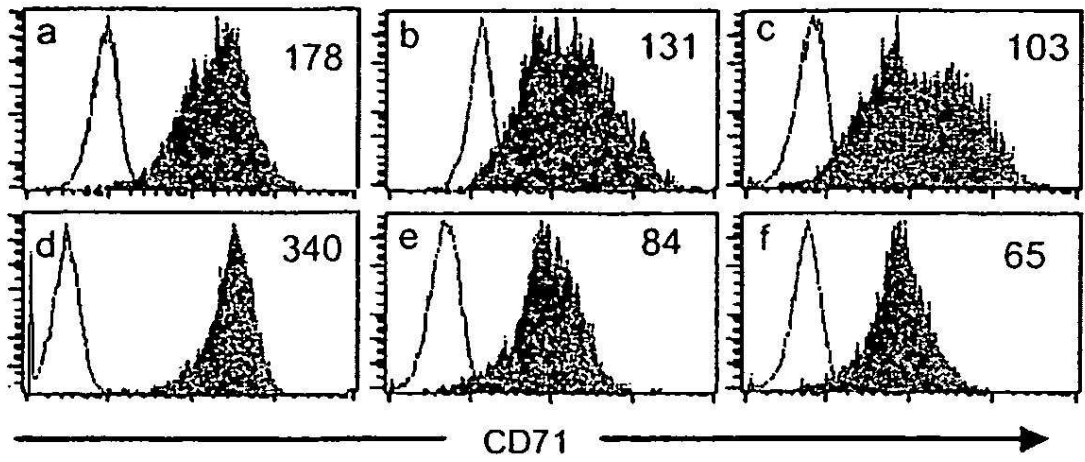


FIGURA 8

A



B

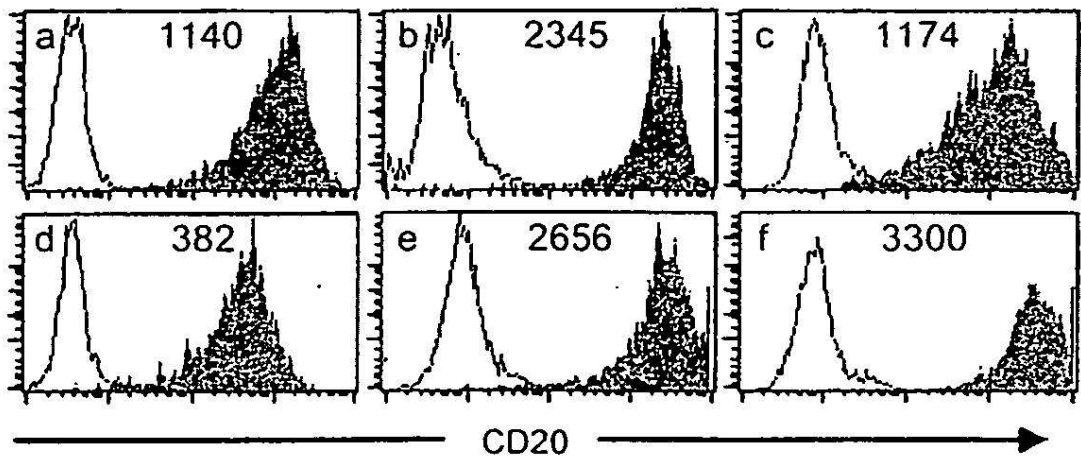
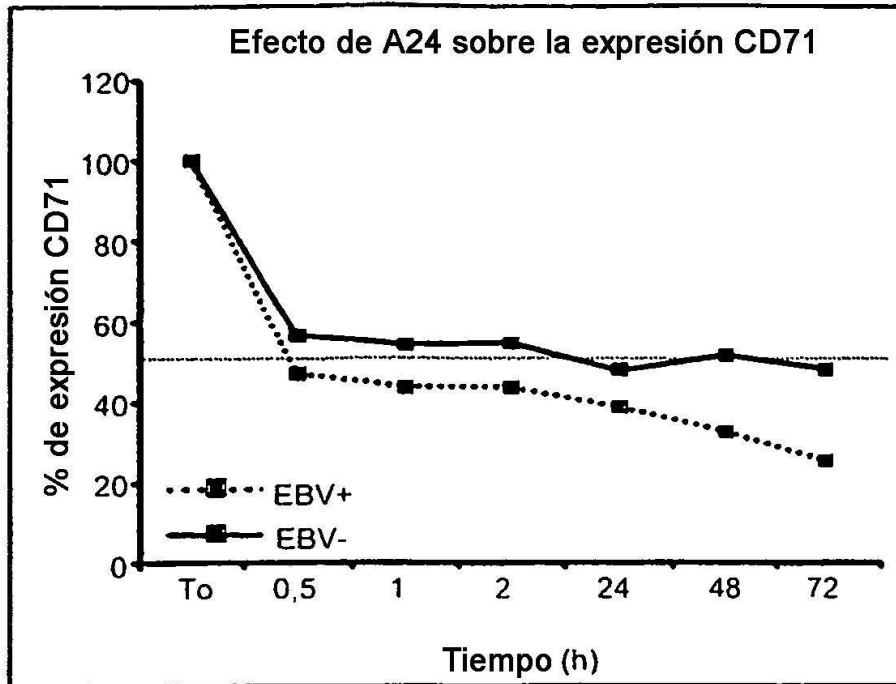


FIGURA 9

A



B

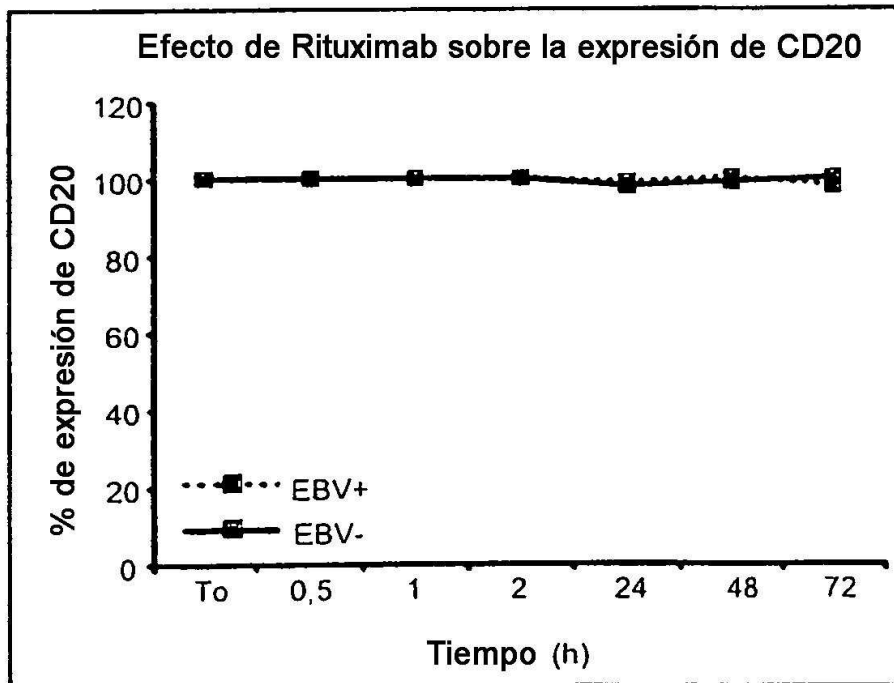


FIGURA 10

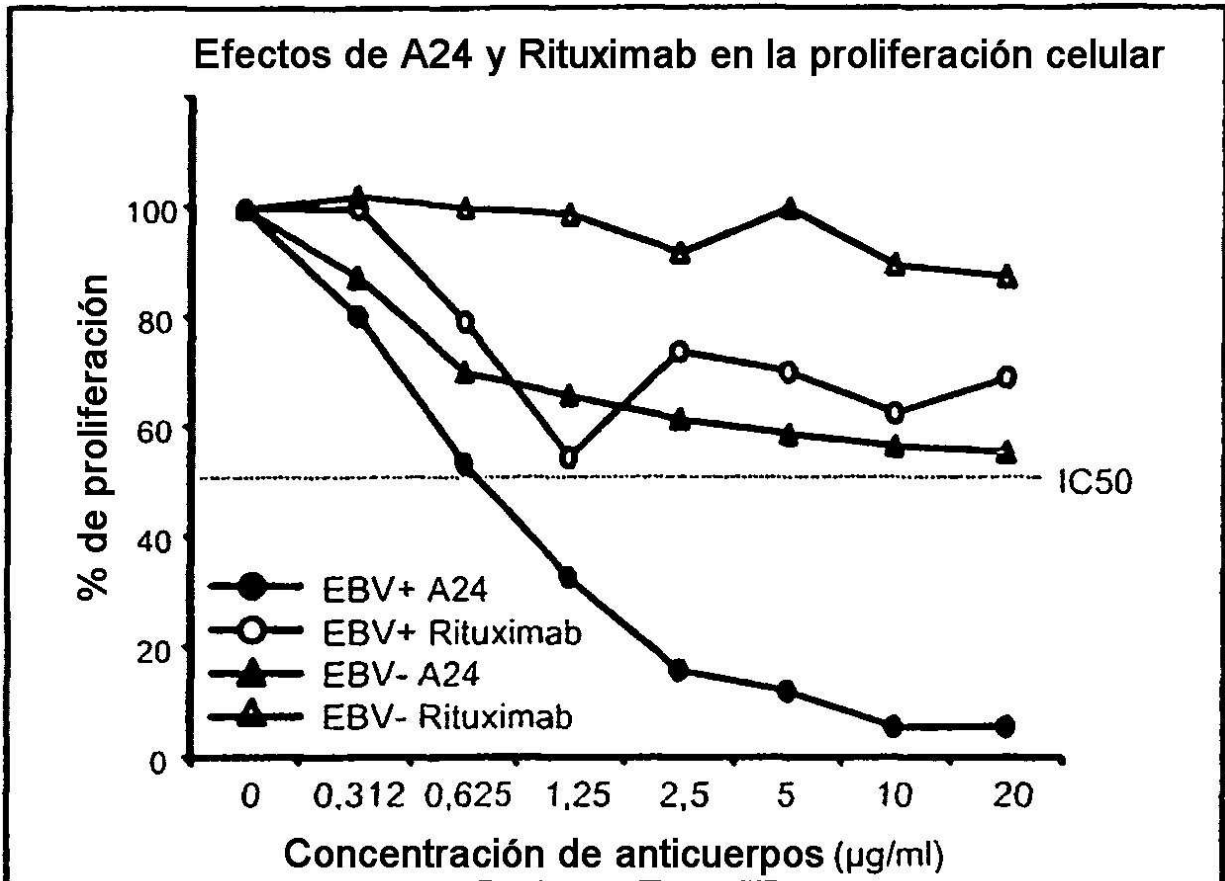


FIGURA 11

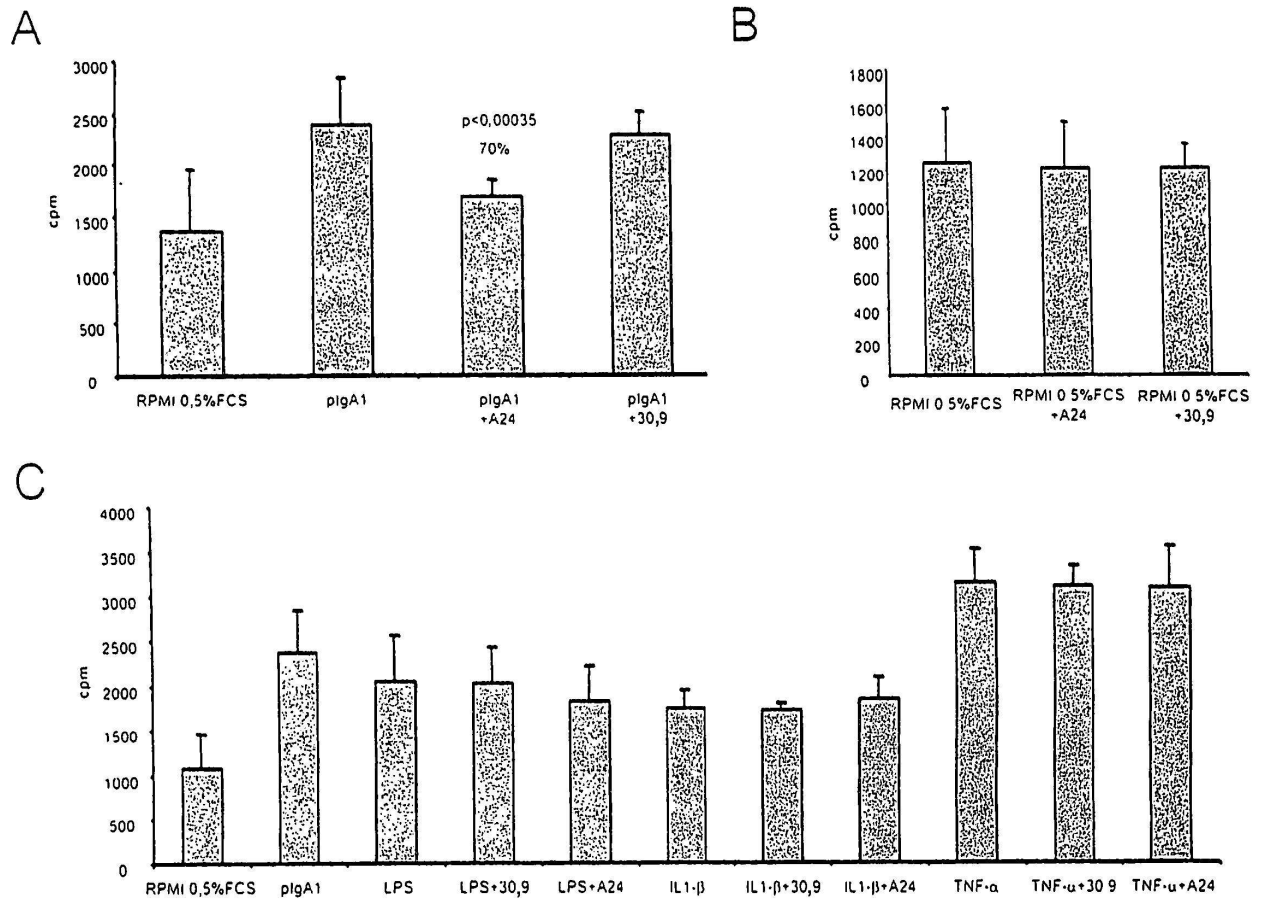


FIGURA 12