

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 969**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01) **C07K 16/30** (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01271393 .9**
 96 Fecha de presentación: **18.12.2001**
 97 Número de publicación de la solicitud: **1343822**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Medios para el diagnóstico y tratamiento de CTCL**

30 Prioridad:
18.12.2000 EP 00403580

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CÉDEX 13, FR**

72 Inventor/es:
**BENSUSSAN, Armand;
BOUMSELLE, Laurence;
BAGOT, Martine y
MORETTA, Alessandro**

74 Agente/Representante:
Pérez Barquín, Eliana

ES 2 387 969 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

Medios para el diagnóstico y tratamiento de CTCL

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere a medios novedosos para el diagnóstico y tratamiento de linfomas T y más particularmente de Linfomas Cutaneos de Células T (abreviadamente CTCL). De hecho la invención proporciona marcadores tumorales novedosos que son universales para CTCL y describe usos biotecnológicos y médicos de los mismos.

Antecedentes de la invención

CTCL es un grupo de Linfomas T que principalmente implican la piel. El grupo CTCL concretamente comprende Micosis Fungoides (abreviadamente MF), Síndrome de Sézary (abreviadamente SS), Papulosis Linfomatoide (abreviadamente LP) y linfomas CD30+. MF transformado se caracteriza por invasión de la piel por linfocitos T malignos derivados clonalmente que fenotípicamente se parecen a células auxiliares T maduras. Los linfomas LP y CD30+ también se desarrollan en la piel. Las formas más agresivas de CTCL se desarrollan cuando las células malignas se convierten en no epidermotrópicas y están asociadas a implicación extracutánea. SS es una forma más agresiva de CTCL que se caracteriza por una expansión clonal de células T CD4+/CD45RO+ y la aparición de estas células T malignas en la sangre. La mayoría de CTCL es CTCL CD4+, pero existen algunos casos raros de CD8+ CTCL.

La biología de la enfermedad de CTCL está escasamente entendida, ya que es difícil identificar las células malignas, debido a la carencia de marcadores de superficie de células específicas. En las lesiones cutáneas, por lo tanto es difícil distinguir las células de CTCL de linfocitos T (no tumorales) que se infiltran en los reactivos.

El diagnóstico de linfomas T tales como CTCL en el momento actual se basa principalmente en las observaciones citológicas e histológicas de la presencia o ausencia de células tumorales en una muestra recogida de un área del cuerpo sospechosa (observación del aspecto histopatológico en la biopsia de piel y/o presencia de células SS en la sangre, por medio de la detección de células que muestran un núcleo ceberriforme). Tal método de diagnóstico no es totalmente fiable, notablemente en las fases tempranas de la transformación de linfocitos cutáneos en linfocitos malignos. Tal método de diagnóstico tampoco permite representar la enfermedad. Técnicamente hablando, es también de larga duración.

Hoy el tratamiento de CTCL se logra tentativamente mediante la inducción de apoptosis de células tumorales mediante quimioterapia no específica.

Por lo tanto existe una necesidad de soluciones más precisas y apropiadas al problema del diagnóstico y tratamiento de enfermedades que implican la proliferación de células T malignas, tales como CTCL.

Sumario de la invención

En vista de esta situación de la técnica, los autores de la presente invención ahora proporcionan soluciones al problema de diagnóstico y tratamiento de CTCL basadas en la molécula de p140 (p140 se refiere también como KIR3DL2).

La invención de este modo se refiere al uso de un anticuerpo para preparar un fármaco para tratar un linfoma cutáneo de células T (CTCL), en el que dicho anticuerpo se une a una molécula de KIR3DL2.

De acuerdo con una realización de la invención, dicho anticuerpo se dirige contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 2.

En otra realización, dicho anticuerpo se dirige contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 4.

En todavía otra realización el anticuerpo se dirige contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 2 y contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 4.

La invención también se refiere al uso de un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente, comprendiendo además un elemento seleccionado entre el grupo que consta de toxinas y radioelementos tumorales, o comprendiendo adicionalmente una enzima capaz de transformar un profármaco antimetabólico en una forma de fármaco activo, tal como una carboxipeptidasa.

Es también un objeto de la invención proporcionar un método para evaluar el porcentaje de células de CTCL CD4+ presentes dentro de un cierto compartimiento del cuerpo de un paciente. Dicho método se caracteriza porque comprende las siguientes etapas:

- el porcentaje de células CD4+ que expresa moléculas de KIR3DL2 se mide en una muestra biológica recogida de dicho paciente y

- 5 - el porcentaje de células de CTCL CD4+ malignas realmente presentes en compartimiento del cuerpo se considera que cae dentro de un intervalo de $\pm 10\%$ alrededor de dicho porcentaje medido.

10 La invención también se refiere a un método para diagnóstico de CTCL, caracterizado porque el porcentaje de células T que expresan moléculas de KIR3DL2 se mide en una muestra biológica recogida de dicho paciente y se compara con el porcentaje promedio observado en seres humanos sin CTCL, decidiéndose un diagnóstico positivo de CTCL cuando el porcentaje medido es significativamente mayor que el porcentaje promedio.

15 La invención también se refiere a un método para el diagnóstico de CTCL, caracterizado porque la presencia de células CD4+ que expresan KIR3DL2 se busca en una muestra biológica que potencialmente comprende células de CTCL, concluyéndose un diagnóstico positivo de CTCL cuando tal presencia es realmente y significativamente detectada.

20 Ventajosamente, en las realizaciones del método anterior, dicha medición del porcentaje hace uso de un elemento seleccionado del grupo que consta de un compuesto de unión a KIR3DL2, ADN de KIR3DL2, el ADN de las SEC ID números. 1 o 3 y la proteína de la SEC ID N.º: 4.

25 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un kit para evaluar el nivel de desarrollo de un CTCL, o para el diagnóstico de CTCL, que comprende un elemento seleccionado entre el grupo que consta de un compuesto de unión a KIR3DL2, ADN de KIR3DL2, el ADN de las SEC ID números. 1 o 3 y la proteína de la SEC ID N.º: 4.

30 Todavía de acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la identificación de un compuesto que es útil en la paliación, prevención, alivio, tratamiento de una proliferación de células de CTCL malignas, caracterizado por que comprende la detección de un compuesto que es capaz de unirse a una molécula de KIR3DL2 tal como la SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 4.

35 La molécula p140, se conocía ya que era un receptor inhibitor, pero se ha descrito previamente solamente en los subgrupos de células NK y de células CD3+ CD8+ de seres humanos sanos. Los autores de la presente invención ahora demuestran que p140 se expresa en la superficie de células T tumorales tales como células de CTCL. Además demuestran que p140 se expresa en la superficie de células T CD4+ malignas, tales como células de CTCL CD4+, mientras que otros receptores que usualmente se observan en la superficie de células NK (tales como p58.1, p58.2, p70KIR, CD94/NKG2A) no se encuentran en la superficie de las células T CD4+ malignas. De nota adicional es que p140 no se ha observado por los autores de la presente invención en la superficie de células T CD4+ recogidas de pacientes que padecen enfermedades dermatológicas no tumorales tales como enfermedades cutáneas inflamatorias (por ejemplo, lupus, liquen), o necrosis epidérmica tóxica. En la superficie de células T CD4+ tumorales, se han identificado por los autores de la presente invención dos formas alélicas de p140: clon 24 de la forma alélica de KIR3D (SEC ID N.º: 1), y clon 1.1 de la forma alélica de p140 (SEC ID N.º: 3). El clon 24 de la forma alélica de KIR3D (SEC ID N.º: 1) es un nuevo polinucleótido que codifica una nueva proteína (SEC ID N.º: 2): clon 24 de KIR3D (SEC ID N.º: 1) muestra cinco diferencias cuando se compara con la secuencia de ADN del clon 1.1 de p140 previamente descrito (SEC ID N.º: 3), dando como resultado cuatro sustituciones de aminoácidos en la proteína madura (SEC ID N.º: 2) cuando se compara con la proteína madura del clon 1.1 de p140 (SEC ID N.º: 4).

45 Los autores de la presente invención demuestran que el SC5 y p140 comparten ambos las mismas características técnicas. La molécula SC5 aparece como una nueva proteína bioquímica y funcionalmente, cuyo peso molecular aparente es 96 kD en condiciones reductoras. Se ha aislado como el antígeno de un anticuerpo monoclonal que ha sido producido por los autores de la presente invención. El hibridoma que produce este anticuerpo monoclonal se ha depositado el 30 de octubre de 2000 en el C.N.C.M. (C.N.C.M. Instituto Pasteur; 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia) de acuerdo con el Tratado de Budapest (número de depósito de C.N.C.M.: I-2575). Cuando se expresa en la superficie de la célula y se hace para agregar, las moléculas de SC5 actúan como receptores inhibidores para la actividad y proliferación celular.

50 Las características técnicas compartidas por SC5 y p140 son como sigue:

55 - SC5 y p140 ambos son antígenos de diferenciación de membranas que son característicos de células T malignas, y notablemente de células T CD4+ malignas,

60 - cualquier forma CTCL CD4+ está implicada, existen células T CD4+ malignas que expresan SC5 o p140 en su superficie (usualmente se expresan tanto SC5 como p140): de hecho SC5 así como p140 cubren el intervalo entero de CTCL CD4+ y notablemente el síndrome de Sézary (abreviadamente "SS"), Micosis Fungoides transformada (abreviadamente "MF transformado"), Papulosis Linfomatoide (abreviadamente "LP"), y Linfomas CD30+,

65 - existe un vínculo tal entre la presencia de SC5 o p140 en la superficie de las células T CD4+ y la existencia de un

5 CTCL CD4+, que un diagnóstico de CTCL CD4+ basado en la presencia de SC5 o p140 en la superficie de células CD4+ recogidas del área del cuerpo sospechosa (por ejemplo, muestra de eritroderma de piel cuando se sospecha MF transformado, o muestra de sangre periférica cuando se sospecha una forma más agresiva de CTCL, tal como SS) tiene una fiabilidad de más del 90 %, preferentemente de más del 95 %, lo más preferentemente del 100 % (entre los pacientes que se ensayaron hasta ahora, la fiabilidad es del 100 %) : de hecho, de acuerdo con la invención, se puede concluir que una célula T CD4+ es tumoral tan pronto como existen moléculas p140 detectadas en la superficie de estas células T CD4+, o tan pronto como se mide un porcentaje de células T SC5+ CD4+ mayor que el nivel medio estándar (el nivel medio estándar está en el intervalo 1-15 %, en general en el intervalo 5-10 %) y

10 - existe un vínculo tal entre la presencia de SC5 o p140 en la superficie de células T CD4+ y la existencia de un CTCL CD4+, que el porcentaje de células T CD4+ SC5+, así como de células T CD4+ p140+, que se mide en una muestra de sangre periférica recogida de un paciente para quien se sospecha un Síndrome de Sézary (SS), sustancialmente corresponde al porcentaje de células SS malignas que están realmente presentes en la sangre periférica de este paciente (dentro de un intervalo ± 10 % para células SC5+ CD4+, dentro de un intervalo ± 5 % para células p140+ CD4+): por lo tanto los marcadores SC5 y p140 de la invención comparten la característica técnica particular de permitir valorar la actuación de un SS.

15 Hasta el mejor conocimiento de los autores de la presente invención, SC5 y p140 son las primeras moléculas que se describen por tener estas características técnicas comunes.

20 De este modo la invención proporciona los primeros marcadores universales de CTCL. No se conocía ningún producto en la técnica anterior que fuera tal marcador universal de CTCL. El producto de la técnica más cercano a este respecto sería CD30 del que la presencia en la superficie de células T CD4+ malignas lleva a la conclusión de que el paciente tiene una forma particular de CTCL CD4+ que se denomina en la técnica como linfoma CD30+.

25 CD30 es por lo tanto un marcador de CTCL, pero su fiabilidad está limitada a una forma particular de CTCL (linfomas CD30+), y CD30 no cubre todas las formas de CTCL CD4+: para CTCL CD4+ tal como SS, MF transformado, o LP, no necesariamente existiría una célula T CD4+ maligna que expresaría CD30 en su superficie. Los usos de CD30 en diagnóstico y tratamiento de CTCL están así restringidos a una forma particular de CTCL, mientras que los marcadores de la invención abarcan ventajosamente el intervalo completo de CTCL CD4+.

30 Más generalmente, los compuestos que se unen a p140 pueden, de acuerdo con la invención, usarse como agentes de reclutamiento de complemento, como estimuladores de ADCC, o como vectores para agentes terapéuticos con el fin de evitar, paliar, tratar linfomas T, tal como CTCL.

35 Por lo tanto la invención también se refiere a los usos diagnósticos y terapéuticos de compuestos de unión a p140 tales como anticuerpos monoclonales anti-p140 y de productos derivados directamente de los mismos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanizados, o anticuerpos monoclonales con una especificidad doble de CD4 - p140/SC5).

40 Descripción detallada de la invención

45 La molécula de p140 se ha descrito en la técnica anterior como un receptor inhibitor que se expresa por los subgrupos de células NK y de células CD3+ CD8+ de pacientes sanos (no cancerosos). La presente invención ahora demuestra que p140 se expresa por células T malignas y notablemente por células de CTCL y proporciona una forma alélica novedosa de p140 (clon 24 en el ejemplo 3 más adelante; SEC ID N.º: 1) que codifica una proteína novedosa (SEC ID N.º: 2). Las secuencias de ADNc y aminoácidos de esta forma alélica novedosa son como sigue:

SEC ID N.º: 1:

CATGTCGCTCACTGTCGTCAGCATGGCGTGCGTTGGGTTCTTCTTGCTGCA
GGGGGCCTGGCCACTCATGGGTGGTCAGGACAAACCCTTCCTGTCTGCCCCG
GCCAGCACTGTGGTGCCTCAAGGAGGACACGTGGCTCTTCAGTGTCACTA
TCGTCGTGGGTTTAAACAATTTTCATGCTGTACAAAGAAGACAGAAGCCACGT
TCCCATCTTCCACGGCAGAATATTCCAGGAGAGCTTCATCATGGGGCCCTGT
GACCCAGCACATGCAGGGACCTACAGATGTCGGGGTTCACGCCCACACT
CCCTCACTGGGTGGTCGGCACCCAGCAACCCCTGGTGATCATGGTCCACAG
GAAACCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGGACCCTGCTGAAA
TCAGGAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCATGTTTGAGCAC
TTCTTTCTGCACAGAGAGGGGATCTCTGAGGACCCCTCACGCCTCGTTGGA
CAGATCCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCTTGATG
CCTGTCCTTGCAGGAACCTACAGATGTTATGGTTCTGTTCCCTCACTCCCCCT
ATCAGTTGTCAGCTCCCAGTGACCCCTGGACATCGTGATCACAGGTCTAT
ATGAGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGA
GAGAACGTGACCTTGTCCCTGTAGCTCCTGGAGCTCCTATGACATCTACCAT
CTGTCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCGTGCAGTGCCCAA
GGTCAACAGAACATTCCAGGCAGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGG
AGGGACCTACAGATGCTTCGGCTCTTCCGTGCCCTGCCCTGCGTGTGGTC
AAACTCAAGTGACCCACTGCTTGTCTGTGCACAGGAAACCCTTCAAGTAG
TTGGCCTTACCCACAGAACCAAGCTCCAAATCTGGTATCTGCAGACACCT
GCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCTTCCTCTTCATCCTCCTCCTC
TTCTTTCTCCTTTATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAGAATGCTGCTGTAATG
GACCAAGAGCCTGCGGGGGACAGAACAGTGAATAGGCAGGACTCTGATG
AACAAGACCCTCAGGAGGTGACGTACGCACAGTTGGATCACTGCGTTTTTC
ATACAGAGAAAAATCAGTCGCCCTTCTCAGAGGCCCAAGACACCCCCAAC
AGATAACCAGCGTGTACACGGAACCTTCCAAATGCTGAGCCAGATCCAAAG
TTGTCTCCTGCCACGAGCACACAGTCAGGTCTTGAGGGGGTTTTCTAGG
GAGACAACAGCCCTGTCTCAAACC

SEC ID N.º: 2:

pLMGGQDKPF LSARPSTVVP QGGHVALQCH YRRGFNNFML YKEDRSHVPI
FHGRIFQESF IMGPVTPAHA GTYRCRGSRP HSLTGWSAPS NPLVIMVTGN
HRKPSLLAHP GTLLKSGETV ILQCWSDVMF EHFFLHREGI SEDPSRLVGQ
IHDGVSKANF SIGPLMPVLA GTYRCYGSVP HSPYQLSAPS DPLDIVITGL
YEKPSLSAQP GPTVQAGENV TLSCSSWSSY DIYHLSREGE AHERRLRVP
KVNRTFQADF PLGPATHGGT YRCFGSFRAL PCVWSNSSDP LLVSVTGNPS
SSWPSPTEPS SKSGICRHLH VLIGTSVVIF LFILLFFLL YRWCSNKKNA
AVMDQEPAGD RTVNRQDSDE QDPQEVTYAQ LDHCVFIQRK ISRPSQRPKT
PPTDTSVYTE LPNAEPRSKV VSCPAPQSG LEGVF

Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la forma alélica de p140 (clon 1.1) previamente descrita son como sigue:

5

SEC ID N.º: 3:

CATGTCGCTCACGGTCGTCAGCATGGCGTGCGTTGGGTTCTTCTTGCTGCA
GGGGGCCTGGCCACTCATGGGTGGTCAGGACAAACCCTTCTGTCTGCCCCG
GCCAGCACTGTGGTGCCTCGAGGAGGACACGTGGCTCTTCAGTGTCACTA
TCGTCGTGGGTTTAACAATTCATGCTGTACAAAGAAGACAGAAGCCACGT
TCCCATCTTCCACGGCAGAATATTCCAGGAGAGCTTCATCATGGGCCCTGT
GACCCAGCACATGCAGGGACCTACAGATGTCGGGGTTCACGCCCACT
CCCTCACTGGGTGGTTCGGCACCCAGCAACCCCGTGGTGATCATGGTCACAG
GAAACCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGGCCCCTGCTGAAA
TCAGGAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCATGTTTGAGCAC
TTCTTTCTGCACAGAGAGGGGATCTCTGAGGACCCCTCACGCCTCGTTGGA
CAGATCCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCTTGATG
CCTGTCCTTGCAGGAACCTACAGATGTTATGGTTCTGTTCCCTCACTCCCCCT
ATCAGTTGTCAGCTCCAGTGACCCCTGGACATCGTGATCACAGGTCTAT
ATGAGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCAGGCAGGA

GAGAACGTGACCTTGTCTGTAGCTCCTGGAGCTCCTATGACATCTACCAT
 CTGTCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGTAGGCTCCGTGCAGTGCCCAA
 GGCAACAGAACATTCCAGGCAGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGG
 AGGGACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCTGTGCCCTGCCCTGCGTGTGGTC
 AA ACTCAAGTGACCCACTGCTTGTCTGTACAGGAAACCCTTCAAGTAG
 TTGGCCTTCACCCACAGAACCAAGCTCCAAATCTGGTATCTGCAGACACCT
 GCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCTTCTCTTCATCCTCCTCCTC
 TTCTTTCTCCTTTATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAGAATGCTGCTGTAATG
 GACCAAGAGCCTGCGGGGGACAGAACAGTGAATAGGCAGGACTCTGATG
 AACAAGACCCTCAGGAGGTGACGTACGCACAGTTGGATCACTGCGTTTTTC
 ATACAGAGAAAAATCAGTCGCCCTTCTCAGAGGCCCAAGACACCCCTAAC
 AGATAACAGCGTGTACACGGA ACTTCCAAATGCTGAGCCCAGATCCAAAG
 TTGTCTCCTGCCACGAGCACCACAGTCAGGTCTTGAGGGGGTTTTCTAGG
 GAGACAACAGCCCTGTCTCAA AAC

SEC ID N.º: 4:

pLMGGQDKPF LSARPSTVVP **RGGHVALQCH** YRRGFNNFML YKEDRSHVPI
 FHGRIFQESF IMGPVTPAHA GTYRCRGSRP HSLTGWSAPS NP**V**VIMVTGN
 HRKPSLLAHP **GPLLKSGETV** ILQCWSDVMF EHFFLHREGI SEDPSRLVGQ
 IHDGVSKANF SIGPLMPVLA GTYRCYGSVP HSPYQLSAPS DPLDIVITGL
 YEKPSLSAQP GPTVQAGENV TLSCSSWSSY DIYHLSREGE AHERRLRVAVP
 KVNRTFQADF PLGPATHGGT YRCFGSFRAL PCVWSNSSDP LLVSVTGNPS
 SSWPSPTEPS SKSGICRHLH VLIGTSVVIF LFILLFFLL YRWCSNKKNA
 AVMDQEPAGD RTVNRQDSDE QDPQEVTYAQ LDHCVFIQRK ISRPSQRPKT
 5 **PLTDTSVYTE** LPNAEPRSKV VSCPRAPQSG LEGVF

La SEC ID N.º: 1 difiere de la SEC ID N.º: 3 en cinco localizaciones.

10 La SEC ID N.º: 2 resultante difiere del p140 descrito en la técnica anterior (SEC ID N.º: 4) por cuatro sustituciones de aminoácidos (mostradas en negrita y caracteres subrayados): R en lugar de Q en la posición 20, V en lugar de L en la posición 92, P en lugar de T en la posición 102 y L en lugar de P en la posición 401 (véase la figura 3).

15 La presente solicitud abarca cualquier compuesto aislado cuya secuencia es, o comprende la SEC ID N.º: 1 y/o la SEC ID N.º: 2. También abarca cualquier ARNm que sea complementario con la SEC ID N.º: 1 y cualquier ADN genómico que codifique la SEC ID N.º: 2.

Las técnicas apropiadas para producir las proteínas de p140 están disponibles para las persona expertas. Notablemente incluyen la producción de células que se han modificado por ingeniería genética tal como para producir las proteínas de p140 en su medio de cultivo. Un ejemplo de tales técnicas comprende la inserción de la

SEC ID N.º: 1 o N.º: 3 en un vector de baculovirus, transfectando de manera operativa una célula de insecto tal como línea celular Sf9 con este vector, recuperando la proteína de p140 producida en el medio de cultivo (por ejemplo, por percolación del medio de cultivo a través de una columna -por ejemplo, una columna de Sefadex- que separa los compuestos proteicos en función de su peso molecular y aislando el eluato de 140 kD).

5 Los compuestos capaces de unirse a p140 en condiciones de tipo fisiológico (condiciones in vivo, o en condiciones in vitro que imitan las in vivo) se han descrito previamente y se pueden obtener por los expertos en la técnica por cualquier técnica apropiada disponible. Por "compuesto de unión a p140", se quiere decir en el presente documento cualquier compuesto que sea capaz en dichas condiciones de tipo fisiológico de reconocer una molécula de p140
10 como un antígeno (SEC ID N.º: 2 y/o SEC ID N.º: 4) cuando se expresa por una célula en una localización de receptor transmembrana (es decir, reconocimiento de la parte de la SEC ID N.º: 2 y/o N.º: 4 que está por encima de la bicapa lipídica de dicha célula).

15 Tal compuesto de unión a p140 comprende notablemente moléculas HLA-A11 y HLA-A3 (ligandos naturales de p140) y notablemente proteínas de fusión tales como proteínas de fusión Fc-HLA-A11 y Fc-HLA-A3. Los compuestos de unión a p140 también comprenden antisuero de p140 (obtenible por inmunización de un animal tal como conejo contra p140 y recuperando el antisuero así producido -una etapa adicional de inmuno-purificación se puede realizar tal como para incrementar la concentración de p140 en el antisuero, por ejemplo, por percolación a través de una columna de p140). Otros compuestos de unión a p140 comprenden anticuerpos monoclonales
20 dirigidos a la SEC ID N.º: 4 de p140, tal como por ejemplo AZ158, Q66, Q241 descritos en Pende y cols. 1996 (J. Exp. Med. 184: 505 - 518). Tales mAb anti-SEC ID N.º: 4 pueden también reconocer la nueva SEC ID N.º: 2 como un antígeno.

25 Cualquier técnica disponible para la producción de mAb es apropiada para la producción de los mAb anti-p140. Un ejemplo de tal técnica comprende las etapas de:

(i) inmunizar un animal contra p140,

30 (ii) producir hibridomas a partir de células de bazo de este animal y cultivarlas para que produzcan anticuerpos monoclonales en sus sobrenadantes de cultivo,

(iii) evaluar los sobrenadantes para determinar la presencia de un anticuerpo que es capaz de unirse a la molécula de p140 que se ha usado como un inmunógeno en la etapa i y que también es capaz de unirse a las células T no malignas que quedan principalmente en su compartimiento citoplásmico y unirse a células de CTCL CD4+ malignas
35 principalmente en su superficie celular,

(iv) seleccionar y clonar hibridomas produciendo el anticuerpo deseado,

40 (v) recuperar el anticuerpo de dichos clones del sobrenadante anterior. Los compuestos de unión a p140 preferidos también comprenden una entidad anti-CD4 (por ejemplo, mAb bi-específico).

Tales compuestos de unión a p140 son útiles para la detección de p140 en células T malignas, tales como células de CTCL, en particular CTCL CD4+. De esta manera son útiles para la detección de cáncer CD4+. También son útiles como vectores polipeptídicos, como se describe más adelante.

45 La invención también se refiere a vectores polipeptídicos que comprenden un compuesto de unión a p140 tal como un mAb dirigido contra la parte extracelular de SEC ID N.º: 2 y/o SEC ID N.º: 4. Tales vectores polipeptídicos son útiles para administrar moléculas a, o en la proximidad de células T malignas, tales como notablemente células de CTCL y células de CTCL CD4+ malignas en particular.

50 Las moléculas que se pueden administrar de manera útil a células T malignas, tales como células de CTCL comprenden notablemente moléculas capaces de inducir muerte celular o apoptosis, tales como un radioelemento o una toxina. Tales moléculas también comprenden cualquier enzima capaz de transformar un profármaco antimitótico en una forma de fármaco activo, tal como una carboxipeptidasa. Un vector polipeptídico que lleva tal enzima
55 después se usa de manera ventajosa en combinación con un profármaco antimitótico (tal como profármaco de mostaza de fenol). Por lo tanto la invención también abarca un kit médico que comprende un vector tal y un fármaco antimitótico tal.

60 Las moléculas que se pueden administrar de manera útil en la proximidad de las células T malignas tales como células de CTCL comprenden notablemente moléculas capaces de estimular las funciones inmunes de células que están en la proximidad de las células T malignas en un esfuerzo para inducir un efecto antitumoral de estas células próximas hacia dichas células T malignas. Ejemplos de tales moléculas comprenden notablemente citocinas tales como interferón gamma e interleucina tal como IL-2 (véase por ejemplo, Xu y cols. 2000, Cancer Research 60: 4475-4484). Cuando un vector polipeptídico de la invención se desea para dirigir células CD4+ tales como células de
65 CTCL CD4+, después este vector de manera ventajosa comprende adicionalmente una entidad anti-CD4.

- La invención también abarca cualquier composición farmacéutica que comprenda tales vectores polipeptídicos y en particular cualquier medicamento que comprenda tales vectores polipeptídicos. Tales medicamentos son útiles en el control de una proliferación y/o actividad funcional (que incluye la producción de IL-2 no deseada) de células T inapropiada o no deseada. Son particularmente útiles para la prevención, paliación, alivio o tratamiento de una actividad inmune inapropiada y notablemente para la prevención o inhibición de un linfoma de T tal como CTCL y en particular CTCL CD4+.
- El uso de tales vectores para la fabricación de un fármaco propuesto para la prevención, paliación, alivio o tratamiento de una proliferación y/o actividad de células T inapropiada y notablemente para la prevención o inhibición de una proliferación de CTCL es de este modo un objeto de la presente solicitud.
- Los compuestos de unión a p140 según se define anteriormente, también se pueden usar como agentes de reclutamiento de complemento, o como estimuladores o activadores de ADCC en la prevención, paliación, alivio o tratamiento de linfomas T, tal como CTCL y en particular CTCL CD4+. Por lo tanto la invención abarca el uso de tales compuestos de unión a p140 en la fabricación de un fármaco de linfoma anti-T, de un fármaco anti-CTCL, de un fármaco anti-CD4+ CTCL y también abarca tales fármacos.
- La invención también proporciona un método para la evaluación del nivel de desarrollo de un CTCL (actuación): permite evaluar la proporción (por ejemplo, porcentaje) de células de CTCL CD4+ malignas presentes dentro de un cierto compartimiento del cuerpo de un paciente. De acuerdo con este método, la proporción de células CD4+ que expresan en su superficie moléculas de p140 se mide en una muestra biológica recogida de dicho compartimiento del cuerpo. La proporción de células de CTCL CD4+ que están realmente presentes en dicho compartimiento del cuerpo se puede considerar como sustancialmente igual a dicha proporción medida. Usualmente cae dentro de un intervalo $\pm 10\%$ alrededor de esta proporción medida.
- La invención también proporciona un método para diagnóstico de CTCL, en el que el porcentaje de células T que expresan las moléculas p140 se expresa en una muestra biológica recogida de un paciente y se compara con el porcentaje promedio observado en seres humanos sin CTCL (preferentemente en seres humanos sanos) y en los que un diagnóstico positivo de CTCL se decide cuando dicho porcentaje medido es significativamente mayor que dicho porcentaje promedio.
- Este método de diagnóstico de CTCL particularmente se aplica a CTCL que son CD4+; en este caso el porcentaje de células T medido es preferentemente un porcentaje CD4+. Los métodos de evaluación/diagnóstico de CTCL de la invención son altamente eficaces para todos los tipos de CTCL CD4+ y notablemente para MF transformado, para SS, para LP, así como para linfomas CD30+. Dicha muestra biológica puede por ejemplo entonces ser una muestra de piel recogida de un eritroderma (por ejemplo, sospecha de MF transformado), y/o una muestra de sangre PBL o total (con el fin de evaluar si un MF transformado ha evolucionado en una forma más agresiva tal como SS). Cuando se detecta p140 en la superficie de dichas células CD4+, entonces no se requiere ninguna etapa adicional: el simple hecho de detectar p140 en la superficie de células T CD4+ se refiere a un diagnóstico positivo de CTCL CD4+.
- Los métodos de la invención se pueden implementar con cualquier elemento apropiado y notablemente con un elemento seleccionado del grupo que consta de compuestos de unión a p140 según se definen en el presente documento, el ADN de p140, el ADN que comprende la SEC ID N.º: 1 o la SEC ID N.º: 3 o que codifica la SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 4.
- Tal elemento se usa entonces como un medio de detección para la expresión de superficie celular de p140. Preferentemente, dichos medios de detección también comprenden una entidad anti-CD4 con el fin de detectar células SC5+/p140+ CD4+ en un procedimiento de una sola etapa.
- Cuando se usa material ADNc/ARNm como un medio de detección, después las células CD4+ se tienen que lisar tal como para detectar el ARNm que se hibrida a p140 que está realmente presente en dichas células (detección de los transcritos). Tal medio de detección de ADNc/ARNm se puede colocar ventajosamente sobre o en un soporte sólido tal como un procesador de ADN o una microesfera de ADN.
- Cuando el material de mAb o derivado de mAb se usa como un medio de detección, después la expresión de superficie de p140 se detecta. Es conveniente cualquier técnica anticuerpo-antígeno. Los ejemplos notablemente comprenden análisis de citometría de flujo.
- La invención también abarca un método para la identificación de un compuesto que es útil en la paliación, prevención, alivio, tratamiento de una actividad de células T no deseada o inapropiada, tal como notablemente una proliferación de células T malignas tales como células de CTCL y en particular células de CTCL CD4+. Este método se caracteriza porque comprende la detección de un compuesto que es capaz de unirse a una molécula de p140 (tal como la SEC ID N.º: 2 y/o la SEC ID N.º: 4). Tales compuestos se pueden usar como vectores polipeptídicos descritos anteriormente. Una forma fácil de implementar este método de identificación es proceder con moléculas r p140 inmovilizadas sobre un soporte sólido tal como una proteína A Sefarosa CL-4B. Los compuestos candidatos para la implementación del método notablemente comprenden sueros inmunizados contra p140.
- La invención se ilustra por los ejemplos, que no pretenden de ninguna manera restringir la invención a las

realizaciones particulares descritas más adelante. Las personas de habilidad normal en la técnica contemplan realizaciones alternativas y tales realizaciones alternativas derivadas del conocimiento común en la técnica están dentro del alcance de la invención. Los expertos en la técnica en particular aprecian que diversas técnicas inmunes estándar y diversas técnicas de biología molecular estándar están disponibles para ellos (véase por ejemplo, "Antibodies: a laboratory manual" Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; Maniatis 1982, "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory; "Current protocols in Immunology" protocols on CD-ROM, John Wiley, West Sussex, Inglaterra; "Immunological techniques made easy", editado por Olivier Cachet y cols., John Wiley, West Sussex, Inglaterra; y la publicación específicamente mencionada en la presente solicitud). El contenido de tales documentos de la técnica anterior se incorpora en el presente documento por referencia. También se entiende que los experimentos descritos en el presente documento en los detalles completos para una forma particular de CTCL CD4+ se pueden directamente transponer por los expertos en la técnica a cualquier otra forma de CTCL CD4+.

En estos ejemplos, se hace referencia a las siguientes figuras:

- Las figuras 1A, 1B ilustran la detección de moléculas de p140/KIR sobre líneas celulares de CTCL (figura 1A) y en linfocitos de tumores recientes (figura 1B). El análisis citométrico de flujo de inmunotinción doble se realizó como se describe en Bagot y cols. 1998 (Blood 91: 4331-4341) y en Poszepczynska y cols. 2000 (Blood 96: 1056-1063).

- La figura 2 ilustra el análisis bioquímico de las moléculas de p140: el clon AM61 de NK (p140+/p70-), derivadas de un donante sano y las líneas celulares de Pno y Cou-L se marcaron superficialmente con biotina y se inmunoprecipitaron con los mAb anti-p140 y anti-CD8. Las muestras se trataron (+) o no (-) con N-glicosidasa F y se analizaron en un 8 % (panel izquierdo) u 11 % (panel derecho) de SDS-PAGE en condiciones reductoras. Sefarosa Proteína-A sola representa el control negativo. Los marcadores de peso molecular (kD) se indican a la derecha.

- La figura 3 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas KIR3D cl. 24 (SEC ID 20 N.º: 2) y cl. 1.1 (SEC ID N.º: 4). Los aminoácidos que corresponden al péptido señal están en letras minúsculas, mientras que la región transmembrana está subrayada en la secuencia consenso. Los aminoácidos idénticos a la secuencia consenso se indican por puntos.

Ejemplo 1: P140 se expresa por células de CTCL CD4+, e identificación de una forma novedosa de P140

Los linfomas cutáneos de células T (CTCL) son un grupo heterogéneo de linfomas que implican principalmente la piel. Micosis fungoides (MF) se caracteriza por la invasión cutánea de los linfocitos T CD4+ malignos derivados clonalmente que se parecen fenotípicamente a células auxiliares T maduras. Una forma más agresiva de CTCL se desarrolla cuando la célula maligna se hace no epidermotrópica y se asocia con la implicación extracutáneas. El síndrome de Sézary (SS) es una forma más agresiva de CTCL que se caracteriza por una expansión clonal de células T CD4+/CD45RO+ y la aparición de estas células T malignas. La biología de la enfermedad permanece escasamente entendida, ya que es difícil identificar la célula maligna, debido a la carencia de marcadores celulares específicos de superficie. De este modo, en las lesiones cutáneas es difícil distinguir células de CTCL CD4+ de linfocitos T CD4+ que se infiltran en los reactivos. Bagot y cols. previamente describieron una única línea celular de T CD4+ derivada de lesiones de CTCL (Bagot y cols. 1998, Blood 91: 4331-4341); esta línea celular y las células tumorales in vivo expresaron un tamaño idéntico de la región 3 de determinación de complementariedad de transcripciones TCR-V β . Más recientemente, Poszepczynska y cols. (Blood 2000, 96: 1056 - 1063) caracterizaron de manera funcional la línea celular de T tumoral CD4+CD8 α + dependiente de IL-7, aislada de sangre de otro paciente con un CTCL eritrodérmico cutáneo. Esta línea celular de T tumorales era idéntica a las poblaciones de células T circulantes principales, como se demuestra por la expresión de TCR-V β 22 y la identidad de las secuencias de TCR β -VDJ.

Aquí, los autores de la presente invención muestran que estas dos líneas de CTCL diferentes expresan el receptor inhibidor de p140/KIR para los alelos HLA-A. De manera importante, este receptor se detecta en células tumorales aisladas recientemente derivadas del mismo paciente. Además, el p140/KIR también se coexpresó por un subconjunto principal de linfocitos CD4+ en otros siete pacientes con SS y por células CD4+ de piel tumorales en dos pacientes adicionales con MF avanzada. El p140/KIR se detecta en individuos normales en un subconjunto de células NK y o en células CD3+CD8+ de sangre periférica. Además, las células T obtenidas de piel en otras enfermedades dermatológicas tales como enfermedades cutáneas inflamatorias y necrosis epidérmica tóxica no expresaron este receptor (Le Cleach y cols. 2000, Clin. Exp. Immunol. 119: 225-230). De este modo, los hallazgos actuales de los autores de la presente invención demuestran que el p140/KIR representa un marcador adecuado sobre células CD4+ para la identificación de CTCL.

Materiales y métodos

Pacientes

Después de un consentimiento informado y aprobación por un comité ético, los autores de la presente invención obtuvieron muestras de piel y sangre de once pacientes con un CTCL. Ocho pacientes tenían un síndrome de

Sézary con 10 a 45 % de células de Sézary circulantes en la sangre. En siete casos, el fenotipo de las células tumorales era CD3+, CD4+, CD8-. En un caso, el fenotipo era CD3+, CD4+, CD8α+ (paciente Pno). Tres pacientes tenían una micosis fungoides transformada (Lez, Cou, Bic) y presentaban tumores cutáneos diseminados con un fenotipo CD3+, CD4+, CD8-. Todos los pacientes no estaban tratados previamente con quimioterapia.

5

Aislamiento de linfocitos tumorales

Las células tumorales recientes de CTCL se obtuvieron de fragmentos tumorales dispersados mecánicamente en suspensiones de células individuales (Bagot y cols. 1998, Blood 91: 4331-4341). Las células mononucleares se lavaron después y se congelaron en suero humano más 10 % de sulfóxido de dimetilo para uso posterior. Para los pacientes de síndrome de Sézary, se aislaron las células sanguíneas mononucleares por la técnica de Ficoll-Isopaque (Pharrnacia fine Chemicals, Piscataway, NJ).

10

Cultivo a largo plazo de líneas de células tumorales

15

Los autores de la presente invención establecieron el cultivo a largo plazo de la línea celular Pno (TCRVβ22+, CD3+, CD4+, CD8α+, MHC clase I+, MHC clase II-) in vitro de la sangre periférica del paciente como se ha descrito previamente (Bagot y cols. 1998, Blood 91: 4331-4341). Los autores de la presente invención demostraron que tanto el clon maligno circulante en la sangre del paciente como la línea celular de T cultivadas derivadas eran idénticos para su fenotipo de la superficie celular y para su tamaño y secuencia de la región TCRβ VDJ (Poszepszynska y cols. 2000, véase supra). Otras fuentes de líneas celulares de SS se pueden encontrar en la ATCC (por ejemplo, HUT 78 ATCC TIB-161).

20

La línea celular de Cou-L (TCRVβ13+) se cultivó in vitro con rIL-2 durante más de tres años. Corresponde al subclón de la línea de CTCL CD4+ Cou-LS descrito previamente (Bagot y cols. 1998, véase supra). La línea celular de Cou-L, la original TCRVβ13+, CTCL CD4+ Cou-LS y las células tumorales recientemente aisladas de la piel compartían el mismo tamaño y secuencia de la región TCRβ VDJ (Bagot y cols. 1998, véase supra).

25

Estudios de anticuerpos monoclonales (mAb) y de citometría de flujo

30

Se realizó análisis de inmunofluorescencia de uno y dos colores como se ha descrito previamente (Bagot y cols. 1998, véase supra). Anti-CD3 (Cell Analysis 2000 referencia de catálogo 6604629), anti-CD4 (Cell Analysis 2000 referencia de catálogo 6602138), anti-MHC Class I (Cell Analysis 2000 referencia de catálogo IMO107) y II (Cell Analysis 2000 referencia de catálogo IMO108) son obtenibles de Beckman Coulter (véase catálogo Cell Analysis 2000).

35

El mAb anti-TCRVβ13+ se compró de Bioadvance (Emerainville, Francia, referencia de catálogo TCR 1738) y el mAb anti-TCRVβ22+ se obtuvo de Beckman-Coulter (Marsella, Francia, Cell Analysis 2000 referencia de catálogo IM/1484/IM1365). El mAb anti-CD8 αβ 2ST6.5H7 es obtenible de Beckman Coulter (Cell Analysis 2000 referencia de catálogo 1M 2014. Como los mAb anti-p140, se han usado Q66 (IgM, anti-p140) y AZ1S8 (IgG2a, que reconocen tanto p70/NKBI como p140) que se han descrito en Pende y cols. 1996 (J. Exp. Med. 184: 505-518); sin embargo cualquier compuesto de unión de anti-140 es apropiado (por ejemplo, antisuero anti-p140, proteínas de fusión FcHLA-A11, Fc-HLA-A3). Los mAb Z27 (IgG1, anti-p70/NKB1), EB6 (IgG1, anti-p58.1/p50.1), GL183 (IgG1, anti-p58.2/p50.2), XA 185 (IgG1, anti-CD94), Z199 y Z270 (IgG2b y IgG2a respectivamente, anti-NKG2A) y B9.4 (IgG2b, anti-CD8) son todos obtenibles de Beckman Coulter (véase Cell Analysis 2000 referencias de catálogo IM2748, IM2277, IM2278, IM1610, IM2750, IM0102).

40

45

Los anti-ratón de cabra IgG FITC y anti-ratón de cabra IgM PE también se pueden obtener de Beckman Coulter (véase Cell Analysis referencias de catálogo IM08 e IMOSSS).

50

Caracterización bioquímica

Se incubaron 20×10^6 células (15' a 20 °C) en 1 ml de PBS pH 8 que contenía 250 µg de EZ-LINK SULFO-NHS-LC-LC-BIOTIN (Pierce, Rockford, IL) y se lavaron tres veces en tampón de lavado (10 mM TRIS pH 8, 0,14 M NaCl). Se lisaron después las células en 1 % de NP-40 y se inmunoprecipitaron con los mAb AZ 158 (IgG2a, anti-p70/140) o B9.4 (IgG2 b, anti-CD8) acoplados a Sepharosa-PA (Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE discontinuo bien no digeridas o bien digeridas con N-glicosidasa F (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania) y se transfirieron a Immobilon P (Millipore Corp, Bedford, MA). Después de teñir con Neutravidina (Pierce) se usó el kit Renaissance Chemiluminescence (NEN, Boston, MA) para la detección. Se obtuvieron clones de células NK por dilución limitante como se describe en Pende y cols. 1996 (J. Exp. Med. 184: 505-518).

55

60

Análisis de RT-PCR

El ARN total se extrajo de líneas celulares de Pno y de Cou-LCD8 αα de CTCL usando sistema de limpieza de ARN (AGS GmbH, Heidelberg, Alemania). Se realizó la síntesis de ADNc usando el cebado de oligodT. Los cebadores

65

usados para la amplificación de ADNc del ORF (marco abierto de lectura) completo de KIR que muestra tres dominios de tipo (1395 pares de bases) eran los siguientes: 5'CATGT(CT)GCTCA(CT)GGTCGTC (Ig3 UP; SEC ID N.º: 5) y 5'GGTTTTGAGACAGGGCTG (Ig3 DOWN; SEC ID N.º: 6). La amplificación se realizó durante 30 ciclos (30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 55 °C, 30 seg. a 12 °C), seguidos de una incubación durante 7 min. a 12 °C, utilizando

5 AmpliTAQ (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos PCR se subclonaron en el vector pcDNA3.1//V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó la secuenciación de ADN usando el Kit de Secuenciación de Ciclo d-Rodamina Terminator y un Secuenciador Automático 377 de Applied Biosystems Automatic Sequencer (Perkin Elmer-Applied Biosystems).

10 *Transfecciones transitorias*

Células COS-7 se transfectaron con pcDNA3.1 TOPO-KIR3D cl.24 o con pCR3-cl. 1.1 (Pende y cols. 1996, J. Exp. Med. 184: 505-518) utilizando Fugene 6 (Roche, 20 Monza Italia). En resumen, las células se sembraron a 5x10⁵/placa; 24 hr más tarde se incubaron con 6 µg de plásmido y 10 µl de reactivo Fugene-6 en DMEM/FCS al 10 %.

15 Después de 48 o 72 hrs, las células transfectadas se usaron para análisis citofluorométrico. Se tiñeron los transfectantes de células con los mAb Q66 y AZ158, seguidos de un anticuerpo de cabra conjugado a ficoeritrina para IgG2a o IgM de ratón y se analizaron por citometría de flujo usando un FACSort (Becton Dickinson, San José, CA).

20 Resultados

Se tiñen líneas celulares de CTCL por los mAb para el p140/K1R

Dos líneas tumorales de Pno de CTCL de largo plazo (marcadas con mAb anti-TCR-VB22) 30 (Poszepezynska y cols. 2000, véase supra) y Cou-L (marcada con mAb anti-CD3) (Bagot y cols. 1998, véase supra) se analizaron determinando la reactividad con diferentes mAb anti-KIR. Los autores de la presente invención encontraron que ambas líneas celulares eran reactivas con los mAb Q66 (véase la figura 9A) y AZ158, reconociendo ambos el p140/KIR. Por el contrario, estas líneas celulares no expresaban otros receptores inhibidores específicos para moléculas HLA clase I, incluyendo p58.1, p58.2, p70 KIR y el receptor de tipo lecitina CD94/NKG2A (Poszepezynska y cols. 2000, véase supra).

25 30

Linfocitos T tumorales aislados recientemente de pacientes CTCL se tiñen por los mAb anti-p140/KIR

Determinando si p140/KIR se expresaba por células tumorales aisladas recientemente, los autores de la presente invención ensayaron la reactividad de mAb Q66 con células tumorales aisladas de la sangre en Pno de paciente de SS y fragmentos de piel tumorales de Cou de paciente de MF. Los autores de la presente invención encontraron que la mayoría de las células tumorales se tiñeron por este mAb (figura 1B). En particular, los autores de la presente invención observaron que la mayoría de linfocitos tumorales TCRVB22+ aislados de la sangre del paciente Pno eran reactivos con anticuerpo Q66 y que la mayoría de linfocitos tumorales TCRV6 13+ aislados de la piel del paciente Cou se tiñeron por el mismo anticuerpo (figura 1B).

35 40

A continuación, los autores de la presente invención estudiaron el fenotipo de linfocitos T tumorales de la sangre de siete pacientes adicionales con un síndrome de Sézary, con las células malignas representando 10 al 45 % de linfocitos CD4+ circulantes y linfocitos T tumorales aislados de tumores de piel de otros dos pacientes con un MF. Notablemente, todos los pacientes ensayados mostraron una población significativa que coexpresaba CD4 y p140/KIR (véase la Tabla 2 más adelante).

45

Tabla 2: Linfocitos CD4+ teñidos con mAb anti-Q66 aislados de la piel de pacientes con micosis fungoides transformada y de sangre de pacientes con síndrome de Sézary.

Muestras de pacientes	Porcentaje de células positivas con	
	mAb anti-CD4	mAb anti-CD4 + Ab anti-Q66
<i>MF</i>		
Lez	65	29
Bic	53	44
<i>SS</i>		
Bri	85	35
Bar	90	18
Att	95	35
Ros	98	15
Can	78	36

Pet	45	9
Rib	98	19

Se debería indicar que todas las células Q66+ estaban incluidas en la población de células CD4+. De este modo, la expresión de p140/KIR, que en individuos normales está restringida a subconjuntos de linfocitos de las poblaciones de NK y CD8+, parece ser una característica de linfocitos T CD4+ de tumor de CTCL, tanto en la piel como en la sangre. Como control, linfocitos T de piel derivados de otra enfermedad dermatológica, necrosis epidérmica, que se mostró que contenían pequeños porcentajes de diversos linfocitos T que expresan KIR (Le Cleach y cols. 2000, Clin. Exp. Immunol. 119: 225-230), fallaron en expresar p140/KIR.

Caracterización molecular del receptor p140 expresado por CTCL.

Las líneas celulares de Pno y Cou-L se marcaron en superficie con biotina y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anti-p140 (mAb AZ 158). Como se muestra en la figura 2, este mAb inmunoprecipitado a partir de un clon de NK y de las líneas celulares de Pno y Cou-L traza una molécula con una masa molecular de aproximadamente 70 kD en condiciones reductoras. El tratamiento con N-glicosidasa reveló una estructura central de proteína de aproximadamente 50 kD con una movilidad ligeramente superior para Pno y Cou-L comparada con el clon de NK. Estos datos sugieren que el receptor inhibitor de p140 expresado por estas líneas de células tumorales de CTCL podría ser casi similar a aquel detectado previamente en las células NK normales (Pende y cols. 1996, J. Exp. Med. 184: 505-518).

A continuación, los investigadores determinaron si el ADNc que codifica la molécula reconocida por los mAb de Q66 y AZ158 sobre líneas celulares de Pno y Cou-L de CTCL correspondía a uno de los ADNc ya descritos que codifican p140/KIR (SEC ID N.º: 3). En este extremo, RT-PCR se realizó sobre ARN derivado de estas líneas celulares usando un conjunto de cebadores capaces de amplificar todo el ADNc que codifica KIR con tres dominios de tipo Ig. A partir de la línea de células de Pno, los autores de la presente invención aislaron un ADNc de longitud completa, denominada KIR3D cl.24 (SEC ID N.º: 1). La comparación de su secuencia de nucleótidos con las secuencias de ADN que codifican todas las KIR caracterizadas por tres dominios de tipo Ig extracelulares reveló que KIR3D cl.24 representa una forma alélica novedosa del receptor p140. En particular, su secuencia de nucleótidos muestra cinco diferencias comparada con la descrita previamente cl 1.1 ADNc (Pende y cols. 1996, J. Exp. Med. 184 : 505-518), que da como resultado cuatro sustituciones de aminoácido en la proteína madura (véase la figura 3; SEC ID N.º: 2: proteína del clon 24; SEC ID N.º: 4: proteína del clon 1.1) . Tres de las cuatro sustituciones se encuentran en el dominio de tipo Ig extracelular (pos. 20, 92 y 111 de la proteína madura), mientras que la otra está localizada en la región citoplasmática (pos. 401). RT-PCR realizada sobre la línea celular de Cou-L de CTCL reveló dos diferentes formas alélicas de p140/KIR una que corresponde a ADNc del cl. 1.1. y la otra idéntica a cl.24 de KIR3D (aislada de la línea celular de Pno). El ADNc derivado de las líneas celulares de CTCL se transfirió después de forma transitoria en células COS-7. Como se esperaba, todos los transfectantes de células se tiñeron de manera luminosa por mAb de Q66 y AZ158, mientras no eran reactivos con mAb Z27 específico de p70/KIR usado como un control negativo. Finalmente, RT-PCR se realizó sobre ARN extraído de PBL derivado de tres pacientes de SS (incluyendo paciente de Pno) y de células derivadas de la piel de un paciente adicional de MF. También en estas muestras una u otra isoforma alélica de p140/KIR descrita anteriormente se podría identificar.

Los mismos resultados se obtuvieron en células malignas de CTCL recogidas de pacientes.

Discusión

Lesiones cutáneas en CTCL contienen un infiltrado linfocítico heterogéneo compuesto de células T malignas, que son lo más a menudo linfocitos T de infiltración de tumores CD4+ y no neoplásicos. Los autores de la presente invención anteriormente reseñaron linfocitos T de infiltración de tumores CD4+ específicamente dirigidos contra línea celular de CD4+ de CTCL maligna autóloga. Sin embargo, ya que ningún tumor restringía la estructura de la superficie celular, además del TCR clonotrópico expresado por células tumorales, se han identificado sobre CTCL, es difícil usar métodos estándar para distinguir linfocitos CD4+ reactivos malignos de los no malignos.

En el presente estudio, los autores de la presente invención reseñaron por primera vez que las células tumorales de pacientes de MF y SS expresan el p140/KIR. Este receptor se ha identificado tanto en líneas celulares de la piel como de la sangre de pacientes de CTCL así como en dos líneas de CTCL de cultivo a largo plazo. Dos análisis de fluorescencia de color indicaron que la expresión de p140/KIR está restringida a células T caracterizadas por un TCRβ-VJD previamente identificado en células tumorales. De este modo, p140/KIR permite una rápida identificación de células tumorales de células reactivas tumorales entre la población de linfocitos T CD4+. Esto puede ser particularmente útil en pacientes de SS, en el que el clon de células T tumorales no siempre se identifica fácilmente dentro de la población de linfocitos CD4+ de sangre periférica. Además, durante el curso de la enfermedad o después de tratamiento, es crucial determinar si un incremento de la población CD4+ se debe a una expansión de la población de células tumorales o de linfocitos T reactivos. Ya que los mAb anti-p140/KIR parecen reconocer las células tumorales en todos los pacientes de CTCL analizados, se pueden considerar como una herramienta adecuada para la identificación directa de los CTCL. Además, el uso de la coexpresión de p140/KIR sobre células de

CTCL CD4+ proporciona una única herramienta para distinguir las células malignas de las células normales en cada paciente. Esto está en contraste con las determinaciones de TCR que es única para un paciente individual. Además, el p140/KIR representa un posible objetivo para el desarrollo de una inmunoterapia novedosa específica de CTCL.

5 Estudios anteriores indicaron que este receptor era capaz de generar señales inhibitoras tras el reconocimiento de los alelos HLA.A3 y HLA.A11. Sin embargo hay que hacer notar que la expresión de p140/KIR en los diversos pacientes analizados parece aparentemente independiente de su propio haplotipo de HLA Clase 1. No obstante, el papel real de p140/KIR en la patofisiología de CTCL es una característica importante que falta por estudiar teniendo en cuenta el papel potencial de este receptor en la tolerancia al mismo. En conclusión, el presente estudio
10 demuestra por primera vez la expresión del p140/KIR en células CD4+ CTCL y el aislamiento de una forma alélica de este receptor en células tumorales. Este hallazgo es un importante nuevo tema, tanto para la patofisiología como el tratamiento clínico de pacientes de CTCL.

15 Además, la expresión de p140 también se ha observado en la superficie de CD8+ CTCL tal como MF transformado de CD8+.

Ejemplo 2: producción de fármacos anti-CTCL

20 La persona de habilidad normal en la técnica es capaz de producir fármacos anti-CTCL siguiendo las siguientes directrices dadas para propósitos de ilustración:

- uso de mAb anti-p140 con una citocina tal como Interferón gamma o IL-2 estimulando el sistema inmune de las células en la proximidad de las células de CTCL,

25 - uso de mAb anti-p140 como vectores para la administración de ingredientes anti-CTCL en células de CTCL; ejemplos de ingredientes anti-CTCL comprenden compuestos estándar usados en quimioterapia tales como radioelementos, toxinas.

30 Los vectores de mAb para radioelementos se pueden producir siguiendo técnicas estándar (véase por ejemplo, Press OW y cols. "Phase two trial of iode131-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphoma", Lancet 1995 vol. 346 p. 336-340, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia).

35 Los vectores mAb para toxina se pueden producir siguiendo técnicas estándar (véase por ejemplo, Ghetie U y cols. "Large scale preparation of an immunoconjugate constructed with human recombinant CD4 and deglycosylated ricin A chain", J. Immunol. Methods 1990, vol. 126 p 135-141, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia).

40 - uso combinado de un profármaco antimetabólico y de vectores de mAb anti-p140 que distribuyen una enzima capaz de transformar un profármaco antimetabólico a la forma de fármaco activo (agente mitótico en una forma funcional).

45 Los vectores de mAb anti-p140 que distribuyen una enzima capaz de transformar un profármaco antimetabólico a la forma de fármaco activo se pueden producir siguiendo técnicas estándar aplicadas a un mAb anti-p140 (véase por ejemplo, la técnica ADEPT, para Tratamiento Enzimático con Profármaco Dirigido por Anticuerpo descrito en Plakey TC y cols. "Anti-tumor effects of an antibody-carboxypeptidase G2 conjugate in combination with phenol mustard prodrugs", British J. Cancer 1995 vol. 72 p 1083-1088, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia).

50 - uso de mAb anti-p140 como agonistas de ligando (estimulación de p140)

- uso de mAb anti-p140 como agente de reclutamiento de complemento.

Para los usos mencionados anteriormente, se prefieren los mAb con una doble especificidad anti-p140/anti-CD4.

55 - uso de anti-p140 (no necesaria especificidad de CD4+) como activadores de ADCC (Citotoxicidad de Células Dependiente de Anticuerpo): células polinucleares, macrófagos, células NK que llevan receptores de Fc que se activan por la parte de Fc del mAb de anti-SC5 y p-p140, por lo tanto estos mAb permiten la activación de ADCC en las proximidades de células de CTCL.

60 Abreviaturas

65 APC: Célula que Presenta Antígeno, CTCL: Linfoma cutáneo de células T, DIG: fracción enriquecida por glicolípidos insoluble en detergente, ILT: transcripción de tipo inmunoglobulina, KIR: receptor de inmunoglobulina de células asesinas, mAb: anticuerpo monoclonal, MF: micosis fungoides, PBL: linfocitos de sangre periférica, PBMC: células mononucleares de sangre periférica, PHA: fitohemaglutinina, PMA: forbol12 beta-miristato13 alfa-acetato, SS: síndrome de Sézary, TCR: receptor de células T.

Listado de secuencias

<110> I. N. S. E. R. M.
 5 <120> Medios novedosos para la detección y tratamiento de células T activadas y, en especial, de células T tumorales
 <130> 1209EPbensussan
 <140>
 <141>
 10 <160> 6
 <170> Patent In Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1395
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (65) .. (1369)
 <400> 1
 catgtcgtc actgtcgtca gcatggcgtg cggtgggttc ttcttctgtgc agggggcctg 60

 gcc a ct c at g ggt ggt cag gac aaa ccc ttc ctg tct gcc cgg ccc agc 109
 Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser
 1 5 10 15

 act gtg gtg cct caa gga gga cac gtg gct ctt cag tgt cac tat cgt 157
 Thr Val Val Pro Gln Gly Gly His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg
 20 25 30

 cgt ggg ttt aac aat ttc atg ctg tac aaa gaa gac aga agc cac gtt 205
 Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp Arg Ser His Val
 35 40 45

 ccc atc ttc cac ggc aga ata ttc cag gag agc ttc atc atg ggc cct 253
 Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe Ile Met Gly Pro
 50 55 60

 gtg acc cca gca cat gca ggg acc tac aga tgt cgg ggt tca cgc cca 301
 Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg Gly Ser Arg Pro
 65 70 75
 20

ES 2 387 969 T3

cac tcc ctc act ggg tgg tcg gca ccc agc aac ccc ctg gtg atc atg 349
His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro Leu Val Ile Met
80 85 90 95

gtc aca gga aac cac aga aaa cct tcc ctc ctg gcc cac cca ggg acc 397
Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Thr
100 105 110

ctg ctg aaa tca gga gag aca gtc atc ctg caa tgt tgg tca gat gtc 445
Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
115 120 125

atg ttt gag cac ttc ttt ctg cac aga gag ggg atc tct gag gac ccc 493
Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile Ser Glu Asp Pro
130 135 140

tca cgc ctc gtt gga cag atc cat gat ggg gtc tcc aag gcc aac ttc 541
Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
145 150 155

tcc atc ggt ccc ttg atg cct gtc ctt gca gga acc tac aga tgt tat 589
Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
160 165 170 175

ggt tct gtt cct cac tcc ccc tat cag ttg tca gct ccc agt gac ccc 637
Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
180 185 190

ctg gac atc gtg atc aca ggt cta tat gag aaa cct tct ctc tca gcc 685
Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
195 200 205

cag ccg ggc ccc acg gtt cag gca gga gag aac gtg acc ttg tcc tgt 733
Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys
210 215 220

agc tcc tgg agc tcc tat gac atc tac cat ctg tcc agg gaa ggg gag 781
Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
225 230 235

gcc cat gaa cgt agg ctc cgt gca gtg ccc aag gtc aac aga aca ttc 829
Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val Asn Arg Thr Phe
240 245 250 255

cag gca gac ttt cct ctg ggc cct gcc acc cac gga ggg acc tac aga 877
Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
260 265 270

ES 2 387 969 T3

Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Val Pro Gln Gly Gly His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg Arg
 20 25 30
 Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp Arg Ser His Val Pro
 35 40 45
 Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe Ile Met Gly Pro Val
 50 55 60
 Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg Gly Ser Arg Pro His
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro Leu Val Ile Met Val
 85 90 95
 Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met
 115 120 125
 Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile Ser Glu Asp Pro Ser
 130 135 140
 Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser
 145 150 155 160
 Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly
 165 170 175
 Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu
 180 185 190
 Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln
 195 200 205
 Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys Ser
 210 215 220
 Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu Ala
 225 230 235 240
 His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val Asn Arg Thr Phe Gln
 245 250 255
 Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg Cys
 260 265 270
 Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp Ser Asn Ser Ser Asp
 275 280 285
 Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser
 290 295 300
 Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys Arg His Leu His Val
 305 310 315 320
 Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe
 325 330 335
 Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met
 340 345 350
 Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp Arg Thr Val Asn Arg Gln Asp Ser Asp

ES 2 387 969 T3

```

          355                360                365
Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val
   370                375                380
Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro
385                390                395                400
Pro Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg
          405                410                415
Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln Ser Gly Leu Glu Gly
          420                425                430

```

```

Val Phe
<210> 3
<211> 1395
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (65)..(1369)
<400> 3

```

```

catgtcgcctc acggtcgtca gcatggcgtg cggtgggttc ttcttgctgc agggggcctg 60

gcc a ct c at g ggt ggt cag gac aaa ccc ttc ctg tct gcc cgg ccc agc 109
    Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser
      1                5                10                15

act gtg gtg cct cga gga gga cac gtg gct ctt cag tgt cac tat cgt 157
Thr Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg
          20                25                30

cgt ggg ttt aac aat ttc atg ctg tac aaa gaa gac aga agc cac gtt 205
Arg Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp Arg Ser His Val
          35                40                45

ccc atc ttc cac ggc aga ata ttc cag gag agc ttc atc atg ggc cct 253
Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe Ile Met Gly Pro
          50                55                60

gtg acc cca gca cat gca ggg acc tac aga tgt cgg ggt tca cgc cca 301
Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg Gly Ser Arg Pro
      65                70                75

cac tcc ctc act ggg tgg tcg gca ccc agc aac ccc gtg gtg atc atg 349
His Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro Val Val Ile Met
10 80                85                90                95

```

ES 2 387 969 T3

gtc aca gga aac cac aga aaa cct tcc ctc ctg gcc cac cca ggg ccc 397
 Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro
 100 105 110

ctg ctg aaa tca gga gag aca gtc atc ctg caa tgt tgg tca gat gtc 445
 Leu Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
 115 120 125

atg ttt gag cac ttc ttt ctg cac aga gag ggg atc tct gag gac ccc 493
 Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile Ser Glu Asp Pro
 130 135 140

tca cgc ctc gtt gga cag atc cat gat ggg gtc tcc aag gcc aac ttc 541
 Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
 145 150 155

tcc atc ggt ccc ttg atg cct gtc ctt gca gga acc tac aga tgt tat 589
 Ser Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
 160 165 170 175

ggt tct gtt cct cac tcc ccc tat cag ttg tca gct ccc agt gac ccc 637
 Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
 180 185 190

ctg gac atc gtg atc aca ggt cta tat gag aaa cct tct ctc tca gcc 685
 Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
 195 200 205

cag ccg ggc ccc acg gtt cag gca gga gag aac gtg acc ttg tcc tgt 733
 Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys
 210 215 220

agc tcc tgg agc tcc tat gac atc tac cat ctg tcc agg gaa ggg gag 781
 Ser Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
 225 230 235

gcc cat gaa cgt agg ctc cgt gca gtg ccc aag gtc aac aga aca ttc 829
 Ala His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val Asn Arg Thr Phe
 240 245 250 255

cag gca gac ttt cct ctg ggc cct gcc acc cac gga ggg acc tac aga 877
 Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
 260 265 270

tgc ttc ggc tct ttc cgt gcc ctg ccc tgc gtg tgg tca aac tca agt 925
 Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp Ser Asn Ser Ser
 275 280 285

ES 2 387 969 T3

gac cca ctg ctt gtt tct gtc aca gga aac cct tca agt agt tgg cct 973
 Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser Trp Pro
 290 295 300

tca ccc aca gaa cca agc tcc aaa tct ggt atc tgc aga cac ctg cat 1021
 Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys Arg His Leu His
 305 310 315

gtt ctg att ggg acc tca gtg gtc atc ttc ctc ttc atc ctc ctc ctc 1069
 Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu
 320 325 330 335

ttc ttt ctc ctt tat cgc tgg tgc tcc aac aaa aag aat gct gct gta 1117
 Phe Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val
 340 345 350

atg gac caa gag cct gcg ggg gac aga aca gtg aat agg cag gac tct 1165
 Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp Arg Thr Val Asn Arg Gln Asp Ser
 355 360 365

gat gaa caa gac cct cag gag gtg acg tac gca cag ttg gat cac tgc 1213
 Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys
 370 375 380

gtt ttc ata cag aga aaa atc agt cgc cct tct cag agg ccc aag aca 1261
 Val Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr
 385 390 395

ccc cta aca gat acc agc gtg tac acg gaa ctt cca aat gct gag ccc 1309
 Pro Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro
 400 405 410 415

aga tcc aaa gtt gtc tcc tgc cca cga gca cca cag tca ggt ctt gag 1357
 Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln Ser Gly Leu Glu
 420 425 430

ggg gtt ttc tag ggagacaaca gcctgtctc aaaacc 1395
 Gly Val Phe

435

<210> 4

<211> 434

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 387 969 T3

Leu Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser Ala Arg Pro Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Ala Leu Gln Cys His Tyr Arg Arg
 20 25 30
 Gly Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp Arg Ser His Val Pro
 35 40 45
 Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Ser Phe Ile Met Gly Pro Val
 50 55 60
 Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Arg Gly Ser Arg Pro His
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro Val Val Ile Met Val
 85 90 95
 Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Pro Leu
 100 105 110
 Leu Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val Met
 115 120 125
 Phe Glu His Phe Phe Leu His Arg Glu Gly Ile Ser Glu Asp Pro Ser
 130 135 140
 Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe Ser
 145 150 155 160
 Ile Gly Pro Leu Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly
 165 170 175
 Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu
 180 185 190
 Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln
 195 200 205
 Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys Ser
 210 215 220
 Ser Trp Ser Ser Tyr Asp Ile Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu Ala
 225 230 235 240
 His Glu Arg Arg Leu Arg Ala Val Pro Lys Val Asn Arg Thr Phe Gln
 245 250 255
 Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg Cys
 260 265 270
 Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Trp Ser Asn Ser Ser Asp
 275 280 285
 Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Ser Ser Trp Pro Ser
 290 295 300
 Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Ile Cys Arg His Leu His Val
 305 310 315 320
 Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe
 325 330 335
 Phe Leu Leu Tyr Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met
 340 345 350
 Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp
 355 360 365
 Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val
 370 375 380

 Phe Ile Gln Arg Lys Ile Ser Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro
 385 390 395 400
 Leu Thr Asp Thr Ser Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg
 405 410 415
 Ser Lys Val Val Ser Cys Pro Arg Ala Pro Gln Ser Gly Leu Glu Gly
 420 425 430
 Val Phe
 <210> 5

ES 2 387 969 T3

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial. Cebador SC5 hacia arriba
<400> 5
catgtctgct cactggctcgt c 21
<210> 6
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial. Cebador SC5 hacia abajo
<400> 6
15 ggtttgaga cagggctg 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo para preparar un fármaco para tratar un linfoma cutáneo de células T (CTCL), en el que dicho anticuerpo se une a una molécula KIR3DL2.
2. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está dirigido contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 2.
- 10 3. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está dirigido contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 4.
4. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 en el que el anticuerpo está dirigido contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 2 y contra una proteína que tiene la SEC ID N.º: 4.
- 15 5. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un elemento seleccionado del grupo que consta de toxinas tumorales y radioelementos.
- 20 6. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una enzima capaz de transformar un profármaco antimetabólico en una forma de fármaco activa, tal como una carboxipeptidasa.
7. Método para evaluar el porcentaje de células de CTCL CD4+ malignas presentes dentro de un cierto compartimiento del cuerpo de un paciente, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 25 - se mide el porcentaje de células CD4+ que expresa moléculas KIR3DL2 en una muestra biológica recogida de dicho paciente y
- el porcentaje de células de CTCL CD4+ malignas realmente presentes en dicho compartimiento del cuerpo se considera que cae dentro de un intervalo ± 10 % alrededor de dicho porcentaje medido.
- 30 8. Método para el diagnóstico de CTCL, caracterizado porque el porcentaje de células T que expresan moléculas KIR3DL2 se mide en una muestra biológica recogida de dicho paciente y se compara con el porcentaje promedio observado en seres humanos sin CTCL, decidiéndose un diagnóstico positivo de CTCL cuando el porcentaje medido es significativamente mayor que el porcentaje promedio.
- 35 9. Método para el diagnóstico de CTCL, caracterizado porque la presencia de células CD4+ que expresan KIR3DL2 se busca en una muestra biológica que comprende potencialmente células CTCL, concluyéndose un diagnóstico positivo de CTCL cuando tal presencia se detecta real y significativamente.
- 40 10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque dicha medición del porcentaje hace uso de un elemento seleccionado entre el grupo que consta de un anticuerpo que se une a KIR3DL2, a ADN de KIR3DL2, al ADN de las SEC ID N.º: 1 o 3 y a la proteína de la SEC ID N.º: 4.
- 45 11. Un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo que se une a la proteína KIR3DL2 de la SEC ID N.º: 2.
12. Un método in vitro para la identificación de un anticuerpo que es útil en la paliación, prevención, alivio, tratamiento de una proliferación de células de CTCL malignas, caracterizado porque comprende la detección de un anticuerpo que es capaz de unirse a una molécula KIR3DL2 tal como la SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 4.

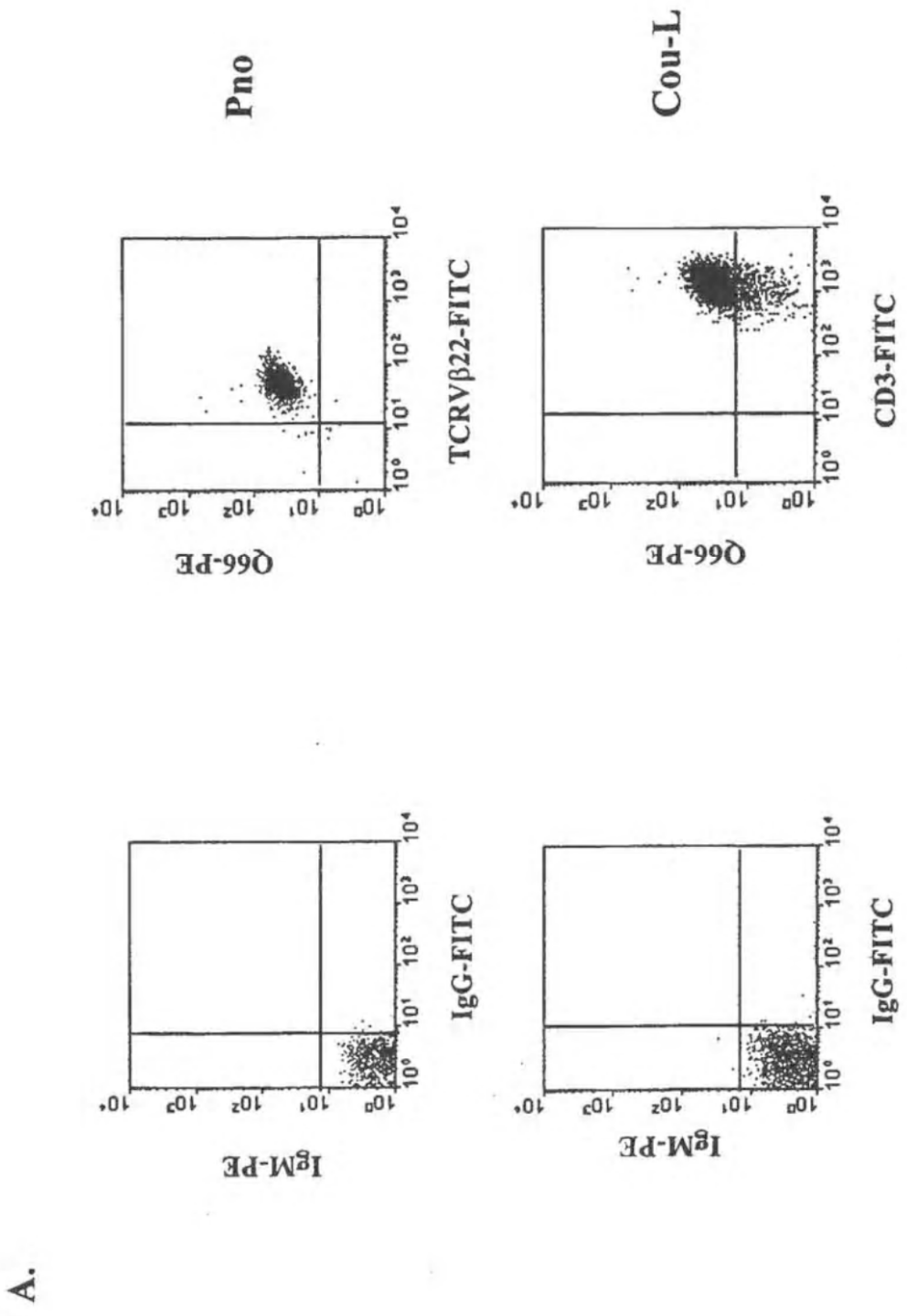


Figure 1A

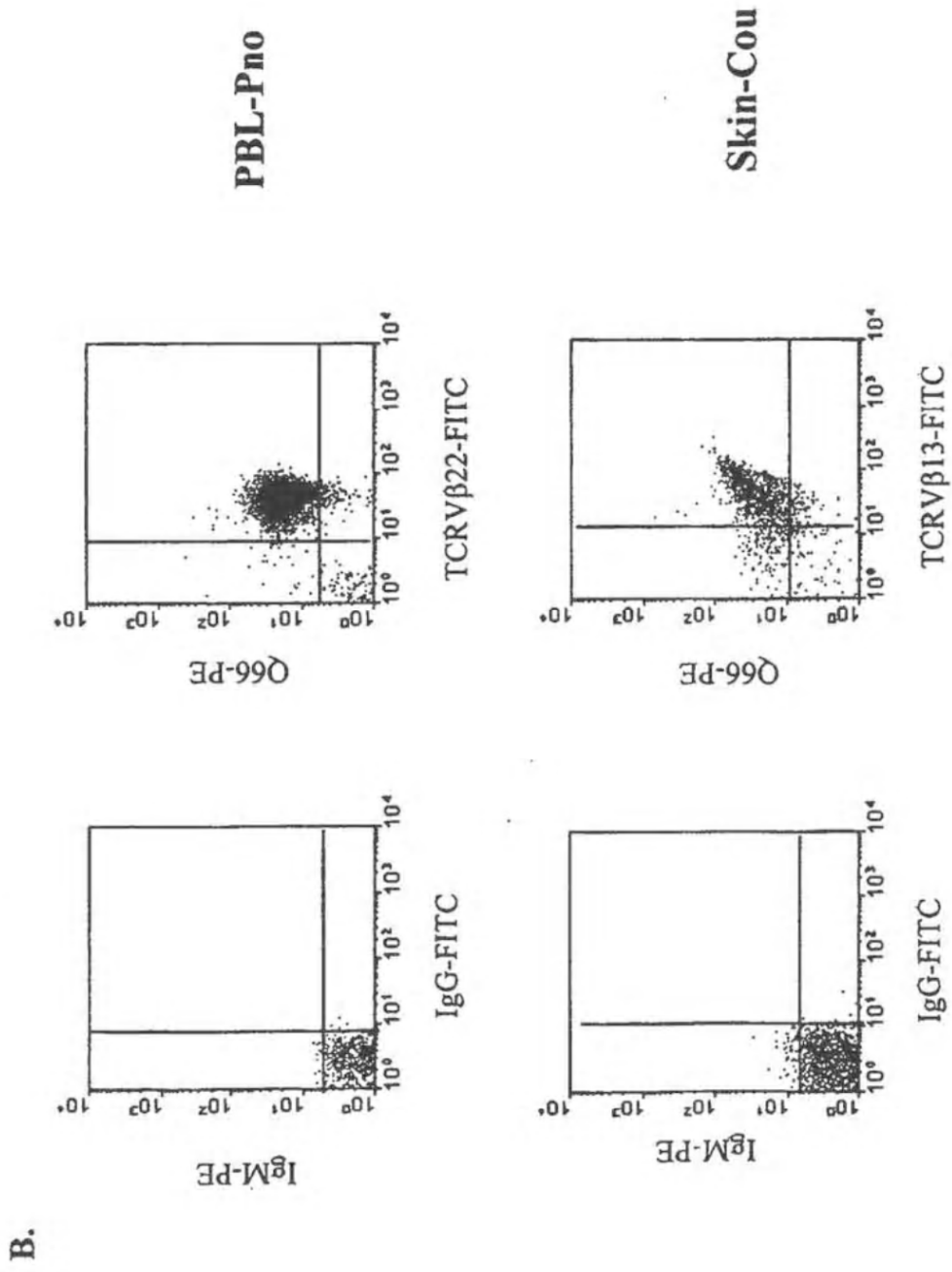


Figura 1B

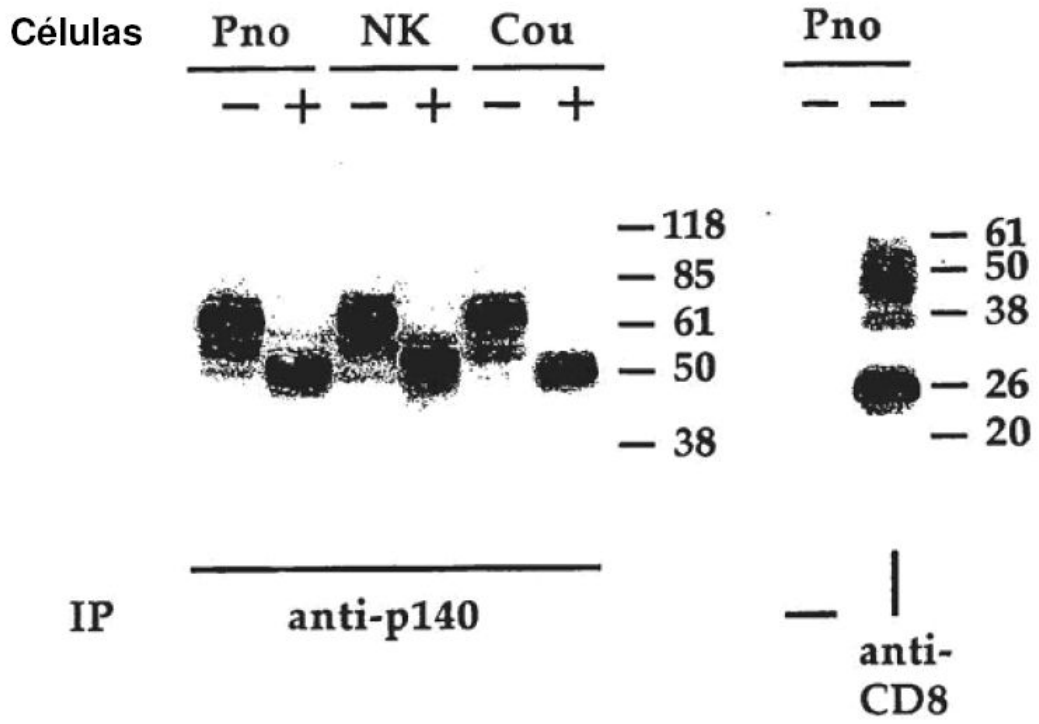


Figura 2

		1	
Consenso		msltvsmac	vgffllqgaw plmccdkpf lsarpsitvp .cghvaloch yrrgenfml ykdrshvpi fhgrifqesf imgpvtpha
KIR3D cl 24	69 Q.....
p140 cl 1.1	69 R.....
Consenso		GYRCGRSP	hsltwgaps np.vimvtgn hrkpslla hp.g.llksetv iloqwsdvme ehflhregi sedpsrlvgq ihdgvskane
KIR3D cl 24	159L..... .T.....
p140 cl 1.1	159V..... .P.....
Consenso		SIGLMPVLA	gyrcygvsp hspqslsaps dpldivitgl yekpslsaqp gptvoagenv tlscswnssy diyhlsrege aherrlravp
KIR3D cl 24	249
p140 cl 1.1	249
Consenso		KVARTFOADF	plgpathggt yrcfgsfral fcwnsnssdp llvsvtgnps sswpspteps sksgicrhlh vlightsvvif lfllllfll
KIR3D cl 24	339
p140 cl 1.1	339
Consenso		YRWC-SNKGNA	avmdoepagd rtvnrqdsde qdpoevtyaq ldhcvfiqrk isrpqrpkt p.tdtsvtye lpnaeprskv vscprafqsg
KIR3D cl 24	429P.....
p140 cl 1.1	429L.....
Consenso		LEGVF	434
KIR3D cl 24	434 SEC ID N.º:	2
p140 cl 1.1	434 SEC ID N.º:	4

Figura 3